



INSTYTUT CHEMII BIOORGANICZNEJ PAN
PRACOWNIA BIOCHEMII tRNA

Agata Tyczewska

Selekcja aptamerów RNA i ich zastosowanie
w badaniach funkcji biologicznych HIV-1 RT i Dicer
– białek specyficznie degradujących RNA

Rozprawa doktorska

Promotor: Prof. dr hab. Marek Figlerowicz

Poznań 2008

INSTYTUT CHEMII BIOORGANICZNEJ
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
ul. Z. Noskowskiego 12/14
61-704 Poznań, tel. 061 852-85-03
Regon 000849327

-9-

D-157

*Panu Prof. dr hab. Markowi Figlerowiczowi
Skladam serdeczne podziękowania
Za powierzenie mi interesującego tematu badań,
Wyrozumiałość i cenne wskazówki podczas jego realizacji.*

*Panu Prof. dr hab. Tomaszowi Twardowskiemu
Skladam serdeczne podziękowania
Za umożliwienie mi wykonania niniejszej pracy,
Życzliwość i wsparcie.*

Dziękuję za okazaną pomoc i współpracę:

*Dr hab. Janowi Wrześnińskiemu,
Dr Annie Kurzyńskiej – Kokorniak,
Dr hab. Elizie Wyszko,
Dr Jackowi Królowi,
Mgr Zofii Pietrusiewicz,
Mgr Markowi Żywickiemu,
Mgr Annie Kietrys,
Mgr Aleksandrze Szopie,
Mgr Jakubowi Pietruczukowi.*

*Pracownikom Zespołu Wirusologii Molekularnej Roślin
Dziękuję za miłą atmosferę i wszelką pomoc.*

Pani Krystynie Ludwiczak dziękuję za okazaną życzliwość.

*Wspaniałym koleżankom z Zespołu Biosyntezy Białka,
W szczególności Kamilli Żywickiej, Marcie Sikorze i Joannie Perła-Kaján,
Dziękuję za twórcze dyskusje i serdeczną atmosferę.*

Rodzicom i Siostrze dziękuję za wiarę w moje siły, zrozumienie i niezwykle wsparcie.

Einzelne Personen sind in der Regel nicht zu befragen, sondern nur die Gesamtheit.

Die Befragung ist ein Mittel, um die Meinungen der Befragten zu ermitteln. Sie kann durch Interviews, Fragebogen, Gruppendiskussionen, Fokusgruppen, etc. durchgeführt werden.

Die Befragung ist ein Mittel, um die Meinungen der Befragten zu ermitteln.

Die Befragung ist ein Mittel, um die Meinungen der Befragten zu ermitteln.

Die Befragung ist ein Mittel, um die Meinungen der Befragten zu ermitteln.

Die Befragung ist ein Mittel, um die Meinungen der Befragten zu ermitteln.

Die Befragung ist ein Mittel, um die Meinungen der Befragten zu ermitteln.

Die Befragung ist ein Mittel, um die Meinungen der Befragten zu ermitteln.

Die Befragung ist ein Mittel, um die Meinungen der Befragten zu ermitteln.

Die Befragung ist ein Mittel, um die Meinungen der Befragten zu ermitteln.

Die Befragung ist ein Mittel, um die Meinungen der Befragten zu ermitteln.

Die Befragung ist ein Mittel, um die Meinungen der Befragten zu ermitteln. Sie kann durch Interviews, Fragebogen, Gruppendiskussionen, Fokusgruppen, etc. durchgeführt werden.

Spis treści

1. WSTĘP	4
2. WPROWADZENIE LITERATUROWE	5
2.1 Niekodujące RNA	5
2.1.1 RNA regulatorowe	7
2.1.2 Interferencja RNA	11
2.1.2.1 Mechanizm RNAi	11
2.1.2.2 Rodzaje krótkich regulatorowych RNA	14
2.2 Rybonukleazy	18
2.2.1 Odwrotna transkryptaza	19
2.2.1.1 Budowa HIV-1 RT	21
2.2.1.1.1 Domena polimerazowa HIV-1 RT	22
2.2.1.1.2 Domena nukleazowa HIV-1 RT	24
2.2.2 Dicer	26
2.2.2.1 Budowa rybonukleazy Dicer pochodzącej z <i>G. intestinalis</i>	26
2.2.2.2 Funkcje dodatkowych domen rybonukleazy Dicer	28
2.2.2.3 Model działania rybonukleazy Dicer	29
2.2.2.4 Przekazywanie nici do kompleksu RISC	31
2.3 Aptamery	33
2.3.1 Selekcja <i>in vitro</i>	33
2.3.2 Zastosowanie aptamerów w terapii	35
3. CEL PRACY	37
4. MATERIAŁY I METODY	38
4.1 Materiały	38
4.1.1 Oligonukleotydy DNA i RNA	38
4.1.2 Enzymy	39
4.1.3 Plazmidy	39
4.1.4 Bakterie	39
4.1.6 Gotowe zestawy do badań biochemicznych	40
4.1.7 Odczynniki	40
4.1.8 Bufory	40
4.1.9 Roztwory	42
4.1.10 Pożywki	43
4.1.11 Żele	43
4.1.12 Wzorce długości DNA	44
4.1.13 Wzorce masy białek	44
4.2 Metody	45
4.2.1 Transformacja komórek bakteryjnych metodą elektroporacji	45
4.2.2 Transformacja komórek bakteryjnych metodą heat-shock	45
4.2.3 Przygotowanie stocku glicerolowego bakterii	45
4.2.4 Przygotowanie komórek kompetentnych do transformacji metodą heat-shock	46
4.2.5 Otrzymywanie plazmidów w małej skali metodą lizy w warunkach alkalicznych	46
4.2.6 Otrzymywanie HIV-RT (p66/p51) w małej skali	46
4.2.7 Otrzymywanie HIV-1 RT w dużej skali	47
4.2.8 Oczyszczanie białek - chromatografia powinowactwa	47
4.2.9 Oczyszczanie białek - chromatografia jonowymienna	48
4.2.10 Elektroforeza białek w żelach poliakryloamidowych	48
4.2.11 Amplifikacja DNA w dużej skali	48
4.2.12 Transkrypcja <i>in vitro</i>	49

1 WSTĘP.....

2 WPROWADZENIE LITERATURALNE.....

2.1 Niekodująca RNA.....

2.1.1 RNA regulacyjna.....

2.1.2 Interfercja RNA.....

2.1.2.1 Mochanizm RNAi.....

2.1.2.2 Rodzaje kodujących RNA.....

2.2 Rynolizacja.....

2.2.1 Odwrót transkrypcji.....

2.2.1.1 Budowa HIV-1 RT.....

2.2.1.1.1 Domena polimerazy HIV-1 RT.....

2.2.1.1.2 Domena odwrótnej transkrypcji HIV-1 RT.....

2.2.2 Dimer.....

2.2.2.1 Budowa rymolizacji.....

2.2.2.2 Rodzaje kodujących RNA.....

2.2.2.3 Model działania rymolizacji.....

2.2.2.4 Przekazywanie informacji.....

3.3 Annunty.....

3.3.1 Sólce w vitro.....

3.3.2 Kształowanie przestrzeni.....

4. CEL PRACY.....

4. MATERIAŁY I METODY.....

4.1 Metody.....

4.1.1 Oligonukleotydy (ON).....

4.1.2 Enzymy.....

4.1.3 Przemysł.....

4.1.4 Bakterie.....

4.1.6 Ciężar kolumny do badań biochemicznych.....

4.1.7 Odczyniki.....

4.1.8 Białka.....

4.1.9 Różnice.....

4.1.10 Pojemniki.....

4.1.11 Sól.....

4.1.12 Wzrosty tkanek.....

4.1.13 Wzrosty tkanek.....

4.2 Metody.....

4.2.1 Transkrypcja.....

4.2.2 Transkrypcja.....

4.2.3 Przekazywanie informacji.....

4.2.4 Przekazywanie informacji.....

4.2.5 Odczyniki.....

4.2.6 Odczyniki.....

4.2.7 Odczyniki.....

4.2.8 Odczyniki.....

4.2.9 Odczyniki.....

4.2.10 Odczyniki.....

4.2.11 Analityczna.....

4.2.12 Transkrypcja.....

4.2.13 Rozdział kwasów nukleinowych w żelu poliakryloamidowym i ich izolacja.....	50
4.2.14 Radioizotopowe znakowanie ssRNA na końcu 5'.....	50
4.2.15 Oczyszczanie RNA metodą fenol-chloroform.....	51
4.2.16 Selekcja aptamerów RNA wobec białek (HIV-RT i rybonukleazy Dicer).....	51
4.2.17 Odwrotna transkrypcja.....	52
4.2.18 Analiza kwasów nukleinowych w żelach poliakrylamidowych.....	52
4.2.19 Trawienie dsDNA enzymami restrykcyjnymi.....	53
4.2.20 Analiza produktów trawienia w żelu agarozowym.....	53
4.2.21 Ligacja.....	54
4.2.22 Sekwencjonowanie.....	54
4.2.23 Określanie stałej dysocjacji kompleksów HIV-1 RT-aptamer.....	55
4.2.24 Określanie stałej dysocjacji kompleksów Dicer-aptamer.....	56
4.2.25 Badanie wpływu aptamerów na aktywność nukleazową HIV-1 RT.....	56
4.2.26 Badanie aktywności RNazowej Mu-MLV RT i RNazy H z <i>E.coli</i> w obecności aptamerów.....	57
4.2.27 Badanie wpływu aptamerów na aktywność polimerazową HIV-1 RT.....	57
4.2.28 Badanie aktywności rekombinacyjnej HIV-1 RT w obecności aptamerów.....	58
4.2.29 Trawienie aptamerów rybonukleazą Dicer.....	60
4.2.30 Trawienie RNA rybonukleazą T1.....	60
4.2.31 Hydroliza alkaliczna RNA.....	61
4.2.32 Badanie wpływu aptamerów na aktywność ludzkiej rybonukleazy Dicer.....	61
4.2.33 Określenie mechanizmu inhibicji Dicer przez aptamery.....	62
4.2.34 Analiza bioinformatyczna.....	62
5. WYNIKI I DYSKUSJA.....	63
5.1 Selekcja aptamerów RNA wiążących się z HIV-1 RT i ocena ich właściwości inhibitorowych.....	63
5.1.1 Otrzymywanie HIV-1 RT (heterodimeru p66/p51).....	63
5.1.2 Przygotowanie biblioteki kombinatorycznej.....	66
5.1.3 Selekcja aptamerów RNA.....	67
5.1.4 Badanie wpływu aptamerów na aktywność nukleazową, polimerazową i rekombinacyjną HIV-1 RT.....	71
5.1.4.1 Aktywność nukleazowa HIV-1 RT.....	71
5.1.4.2 Aktywność polimerazowa HIV-1 RT.....	73
5.1.4.3 Aktywność rekombinacyjna HIV-1 RT.....	75
5.1.5 Badanie wpływu aptamerów na aktywność nukleazową Mu-MLV RT.....	78
5.1.6 Badanie wpływu aptamerów na aktywność nukleazową RNazy H z <i>E.coli</i>	79
5.1.7 Określenie stałej dysocjacji kompleksu aptamer-HIV-1 RT.....	80
5.1.8 Analiza bioinformatyczna.....	83
5.1.9 Dyskusja.....	84
5.2 Selekcja aptamerów RNA specyficznie wiążących Dicer.....	89
5.2.1 Przygotowanie biblioteki kombinatorycznej.....	89
5.2.2 Selekcja aptamerów wobec Dicer.....	90
5.2.3 Analiza sekwencji wyselekcjonowanych cząsteczek RNA.....	93
5.2.4 Charakterystyka wybranych aptamerów.....	96
5.2.4.1 Aptamery jako substraty rybonukleazy Dicer.....	98
5.2.4.2 Badanie wpływu aptamerów na aktywność ludzkiej rybonukleazy Dicer.....	100
5.2.4.3 Określanie stałej dysocjacji kompleksu ATD13.6-Dicer.....	106
5.2.4.4 Badania mechanizmu inhibicji działania aptamerów ATD15.52 i ATD13.6107.....	107
5.2.5 Analiza bioinformatyczna.....	113
5.2.6 Dyskusja.....	116

4.2.13	Rozkład kwasów nukleinowych w żelu poliakrylamidowym i ich izolacja	70
4.2.14	Radioizotopowe oznaczenie ssRNA na końcu 3'	70
4.2.15	Oczyszczanie RNA metodą fenol-chloroform	71
4.2.16	Selekcja aptamerów RNA wobec białek (HIV-RT i tyfonaklezy Dicer)	71
4.2.17	Odczytanie transkrypcji	72
4.2.18	Analiza kwasów nukleinowych w żelach poliakrylamidowych	72
4.2.19	Tworzenie dRNA enzymatycznie	73
4.2.20	Analiza produktów tworzenia w żelu agarozowym	73
4.2.21	Ligacja	74
4.2.22	Selekcjonowanie	74
4.2.23	Odczytanie etapy dysocjacji kompleksów HIV-1 RT-aptamer	75
4.2.24	Odczytanie etapy dysocjacji kompleksów Dicer-aptamer	76
4.2.25	Badanie wpływu aptamerów na aktywność nukleazowy HIV-1 RT	76
4.2.26	Badanie aktywności nukleazowej Nu-MLV RT i RNazy H x 5'OH w obecności aptamerów	77
4.2.27	Badanie wpływu aptamerów na aktywność polimerazową HIV-1 RT	77
4.2.28	Badanie aktywności rekombinacyjnej HIV-1 RT w obecności aptamerów	78
4.2.29	Tworzenie aptamerów tyfonaklezy Dicer	80
4.2.30	Tworzenie RNA tyfonaklezy I	80
4.2.31	Hybrydyzacja albelizacji RNA	81
4.2.32	Badanie wpływu aptamerów na aktywność białki tyfonaklezy Dicer	81
4.2.33	Odczytanie mechanizmu inhibicji Dicer przez aptamery	82
4.2.34	Analiza bioinformatyczna	82
2 WYMIKLI DYSKUSJA		
2.1	Selekcja aptamerów RNA wiążących się z HIV-1 RT i oznaczających właściwości kinetycznych	83
2.1.1	Oczyszczanie HIV-1 RT (białek i DNA)	83
2.1.2	Przygotowanie biblioteki kombinatorycznej	86
2.1.3	Selekcja aptamerów RNA	87
2.1.4	Badanie wpływu aptamerów na aktywność nukleazową polimerazową i rekombinacyjną HIV-1 RT	91
2.1.4.1	Aktywność nukleazową HIV-1 RT	91
2.1.4.2	Aktywność polimerazową HIV-1 RT	93
2.1.4.3	Aktywność rekombinacyjną HIV-1 RT	95
2.1.5	Badanie wpływu aptamerów na aktywność nukleazową Nu-MLV RT	98
2.1.6	Badanie wpływu aptamerów na aktywność nukleazową RNazy H x 5'OH	99
2.1.7	Odczytanie etapy dysocjacji kompleksu aptamer-HIV-1 RT	80
2.1.8	Analiza bioinformatyczna	83
2.1.9	Ogólnie	84
2.2	Selekcja aptamerów RNA specyficznych wiążących Dicer	89
2.2.1	Przygotowanie biblioteki kombinatorycznej	89
2.2.2	Selekcja aptamerów wobec Dicer	90
2.2.3	Analiza sekwencji wyselekcjonowanych cząsteczek RNA	93
2.2.4	Charakterystyka wyselekcjonowanych aptamerów	96
2.2.4.1	Aptamery jako selektywne tyfonaklezy Dicer	98
2.2.4.2	Badanie wpływu aptamerów na aktywność białki tyfonaklezy Dicer	100
2.2.4.3	Odczytanie etapy dysocjacji kompleksu ATO13-B-Dicer	106
2.2.4.4	Badanie mechanizmu inhibicji działania aptamerów ATO12.32 i ATO13.6	107
2.2.5	Analiza bioinformatyczna	113
2.2.6	Dyskusja	116

6. PODSUMOWANIE	121
7. WYKAZ TABEL.....	124
8. WYKAZ WYKRESÓW	125
9. WYKAZ RYSUNKÓW	126
10. LITERATURA	128
11. ANEKS 1	136
12. ANEKS 2.....	140
13. ANEKS 3 – DOROBEK NAUKOWY.....	149

6. PODSUMOWANIE 100
7. WYKAZ TABLI 100
8. WYKAZ WSKAŹNIKÓW 100
9. WYKAZ WYNIKÓW 100
10. LITERATURA 100
11. ANEKS 1 100
12. ANEKS 2 100
13. ANEKS 3 - KWADRANTY 100

1. WSTĘP

Odczytanie informacji zapisanej w genomach organizmów żywych to jedno z najważniejszych zadań stawianych współczesnej biologii molekularnej i bioinformatyce. Jeszcze do niedawna sądzono, że znając strukturę DNA, kod genetyczny, mechanizmy replikacji i transkrypcji genów, będzie można stosunkowo szybko uporać się z tym wyzwaniem. Stworzony w drugiej połowie XX wieku schemat ekspresji informacji genetycznej wydawał się być logiczny i spójny. W szczególności sposób akcentował on rolę DNA, jako nośnika informacji genetycznej oraz białek, będących zarówno głównymi produktami, jak i regulatorami procesu wyrażania genów. Dokonane w ostatnich latach obserwacje zrodziły jednak wiele wątpliwości, których nie udawało się rozwiązać w oparciu o przyjęte wcześniej założenia. Na przykład, nieprawdziwą okazała się być teoria, w myśl której jeden gen koduje tylko jedno białko. Wykazano bowiem, że pojedynczy gen może być źródłem wielu transkryptów, a z pojedynczego transkryptu może powstać wiele różnych mRNA. Nie stwierdzono ponadto, by istniała prosta korelacja pomiędzy wielkością genomu, a złożonością organizmu. Dodatkowo okazało się, że jedynie u bakterii i prostych organizmów zwierzęcych lub roślinnych większość genomu koduje białka. U organizmów wyższych sekwencje kodujące białka stanowią jedynie niewielką część materiału genetycznego (u człowieka mniej niż 5%). Co więcej, w wyniku poznania pełnej sekwencji genomu ludzkiego stwierdzono, iż wbrew wcześniejszym oczekiwaniom nie zawiera on 150 tysięcy, a jedynie około 25 tysięcy genów, a więc mniej więcej tyle samo, co prosta roślina modelowa *Arabidopsis thaliana*. Jednak prawdziwy przełom w myśleniu o mechanizmach rządzących procesem ekspresji informacji genetycznej dokonał się dopiero w ostatnich latach, głównie za sprawą nieoczekiwanego odkrycia zjawiska interferencji RNA (RNAi, ang. *RNA interference*) oraz krótkich regulatorowych RNA, w tym mikro RNA (miRNA).

Odczytanie informacji zawartej w sekwencji DNA i jej wykorzystanie do syntezy białek jest procesem niezwykle precyzyjnym i złożonym. W tym celu komórka musi posiadać odpowiednie mechanizmy regulacyjne, które umożliwiają kontrolowanie tempa i czasu trwania tych procesów. Jednym z takich mechanizmów jest regulacja ekspresji genów przez mikroRNA (miRNA).

miRNA to małe cząsteczki RNA o długości około 20-30 nukleotydów, które mogą wiązać się z mRNA i blokować jego translację lub przyspieszać jego degradację. Dzięki temu miRNA może skutecznie regulować poziom białek w komórce.

W tym rozdziale przedstawimy podstawowe zasady działania miRNA oraz omówimy najnowsze odkrycia dotyczące ich roli w procesach fizjologicznych i patologicznych.

Wskazemy również na potencjalne zastosowania miRNA w medycynie i biotechnologii.

2. WPROWADZENIE LITERATUROWE

2.1 Niekodujące RNA

Pod pojęciem niekodujące RNA (ncRNA, ang. *noncoding RNA*) kryją się takie cząsteczki kwasu rybonukleinowego, które nie stanowią matrycy do syntezy białka. Nie oznacza to jednak, że nie niosą one żadnych informacji czy też, że nie pełnią żadnych funkcji. Ostatnie badania wykazują, że duża część sekwencji genomowych organizmów wyższych przepisywana jest na ncRNA, które poddawane są enzymatycznej obróbce prowadzące do powstawania regulatorowych lub katalitycznych RNA [1].

Okolo 97-98% wszystkich transkryptów genomu ludzkiego to ncRNA [2]. Szacowanie to oparte jest na obserwacjach, że sekwencje intronowe stanowią okolo 95% pierwotnych transkryptów (pre-mRNA) [3, 4] oraz że w obrębie znacznej części transkryptów nie występują ORF. Na podstawie szczegółowych analiz konkretnych loci, na przykład genu β -globiny stwierdzono, że znaczny fragment kodowanego przez niego transkryptu jest źródłem ncRNA [5, 6]. Ponadto większość do tej pory odkrytych mikro-RNA (miRNA) pochodzi z rejonów międzygenowych, które wcześniej uważane były za sekwencje nie ulegające ekspresji [7, 8]. Analizy z wykorzystaniem mikromacierzy oligonukleotydowych ujawniły ponadto, że poziom ekspresji ludzkich chromosomów 21 i 22 jest o rząd wielkości wyższy niż określany tylko na podstawie obecności eksonów [9]. Ponadto znaczna część transkryptów zidentyfikowanych w bibliotekach cDNA myszy to niekodujące RNA, wiele z nich jest ewolucyjnie konserwatywna [10, 11]. Szacuje się, że całkowita liczba transkryptów u myszy jest co najmniej o jeden rząd wielkości wyższa niż liczba genów.

Dziś wiemy już, że cząsteczki RNA pełnią wiele istotnych funkcji. Niekodujące RNA uczestniczą w transkrypcyjnym i potranskrypcyjnym wyciszaniu ekspresji genów, modyfikacjach chromatyny, imprintingu, obróbce mRNA, regulacji translacji, a nawet translokacji i degradacji białek. Ponadto, jak stwierdzono, znaczna większość niekodujących RNA nie ulega ekspresji we wszystkich etapach rozwoju i różnicowania organizmu. Poziomy ekspresji genów kodujących poszczególne ncRNA różnią się w zależności od płci organizmu, rodzaju tkanki czy typu komórek [12, 13]. W związku z tym, liczba genów definiowanych jako segmenty genomu, w oparciu o które powstają funkcjonalne biomolekuły, może być wyższa niż szacowana do tej pory.

Wszystkie produkowane w organizmie cząsteczki RNA można podzielić na kodujące i niekodujące białka [14]. W obrębie tej drugiej grupy występują RNA, których geny ulegają ekspresji konstytutywnej. Odgrywają one bardzo istotne role w prawidłowym funkcjonowaniu

2.1. Niektóre RNA

Podjęto próbę zidentyfikowania RNA w cytoplazmie komórki, które mogłyby być związane z procesem transkrypcyjnym. Wykazano, że w cytoplazmie występują liczne cząsteczki RNA, które mogą być związane z procesem transkrypcyjnym. Wykazano, że w cytoplazmie występują liczne cząsteczki RNA, które mogą być związane z procesem transkrypcyjnym.

Wskazano, że w cytoplazmie występują liczne cząsteczki RNA, które mogą być związane z procesem transkrypcyjnym. Wykazano, że w cytoplazmie występują liczne cząsteczki RNA, które mogą być związane z procesem transkrypcyjnym.

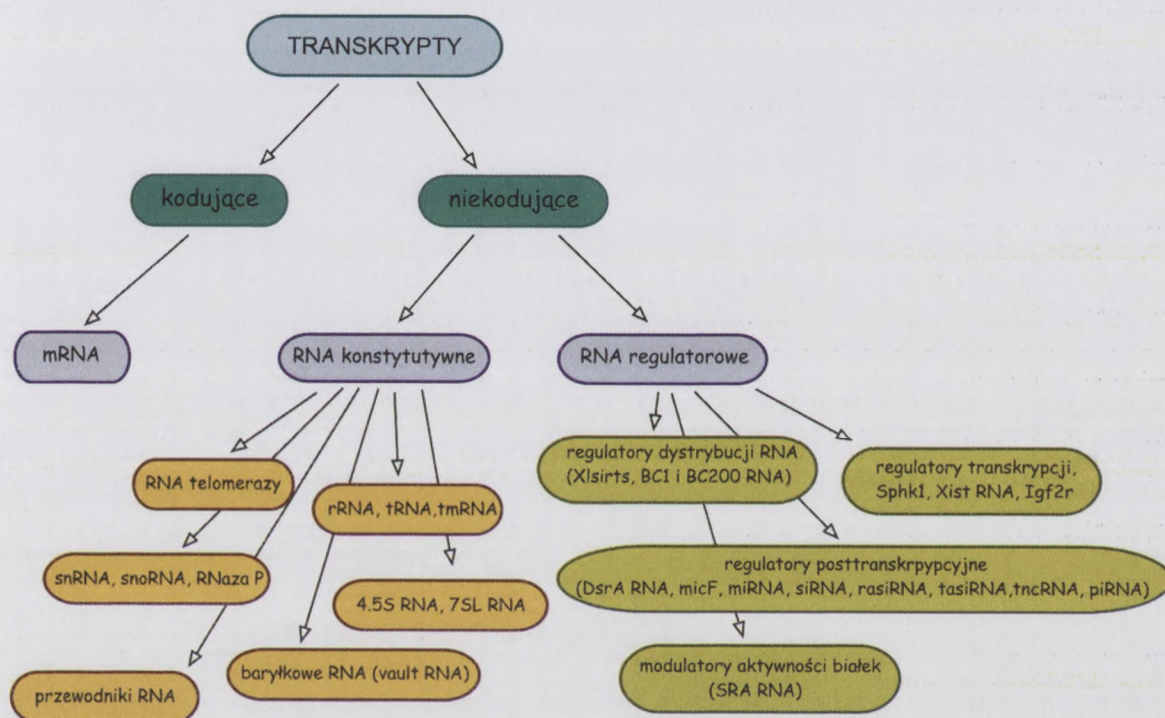
Wskazano, że w cytoplazmie występują liczne cząsteczki RNA, które mogą być związane z procesem transkrypcyjnym. Wykazano, że w cytoplazmie występują liczne cząsteczki RNA, które mogą być związane z procesem transkrypcyjnym.

Wskazano, że w cytoplazmie występują liczne cząsteczki RNA, które mogą być związane z procesem transkrypcyjnym. Wykazano, że w cytoplazmie występują liczne cząsteczki RNA, które mogą być związane z procesem transkrypcyjnym.

Wskazano, że w cytoplazmie występują liczne cząsteczki RNA, które mogą być związane z procesem transkrypcyjnym. Wykazano, że w cytoplazmie występują liczne cząsteczki RNA, które mogą być związane z procesem transkrypcyjnym.

Wskazano, że w cytoplazmie występują liczne cząsteczki RNA, które mogą być związane z procesem transkrypcyjnym. Wykazano, że w cytoplazmie występują liczne cząsteczki RNA, które mogą być związane z procesem transkrypcyjnym.

komórek, tak jak np.: rybosomalne RNA (rRNA), transferowe RNA (tRNA), małe jądrowe RNA (snRNA), małe jądkowe (snoRNA), przewodniki RNA (gRNA), RNA wchodzący w skład RNazy P, RNA telomerazowe, RNA pełniące istotne funkcje podczas kontroli procesu translacji u bakterii (tmRNA), czy też będące komponentami kompleksów rybonukleoproteinowych (4.5S RNA, vRNA) (Rysunek 1).



Rysunek 1. Kwasy rybonukleinowe i ich funkcje.

W ostatnich latach uwaga badaczy skoncentrowana została w szczególny sposób na niekodujące RNA pełniące funkcje regulatorowe i im też została poświęcona dalsza część tego rozdziału. Takie cząsteczki zidentyfikowano zarówno u Prokaryota, jak i Eukaryota. U Eukaryota, większość z nich przypomina mRNA, są transkrybowane przez polimerazę RNA II, posiadają czapkę na końcu 5' i są poliadenylowane, ale nie posiadają otwartych ramek odczytu.

komórki, tak jak one funkcjonują. W tym celu konieczne jest poznanie mechanizmów, które regulują ekspresję genów. W tym celu konieczne jest poznanie mechanizmów, które regulują ekspresję genów. W tym celu konieczne jest poznanie mechanizmów, które regulują ekspresję genów.



Rysunek 1. Klasyfikacja RNA.

W omawianym tekście nie omawiamy szczegółowo mechanizmów, które regulują ekspresję genów. W tym celu konieczne jest poznanie mechanizmów, które regulują ekspresję genów. W tym celu konieczne jest poznanie mechanizmów, które regulują ekspresję genów. W tym celu konieczne jest poznanie mechanizmów, które regulują ekspresję genów.

2.1.1 RNA regulatorowe

Regulatory transkrypcji

Jedną z funkcji niekodujących RNA jest regulacja ekspresji genów poprzez udział w modyfikacji epigenetycznej chromatyny. Dzięki temu cząsteczki RNA wpływają na strukturę konkretnych domen chromosomalnych, a także całych chromosomów. Najprostszą formą regulacji epigenetycznej jest metylacja/demetylacja reszt cytozyny w regionach promotorowych genów, prowadząca do włączenia/wyłączenia transkrypcji.

Kinaza sfingozyny (SPHK1) jest enzymem katalizującym powstanie fosforanu sfingozyny, zaangażowanego w wiele procesów biologicznych np.: mitogenezę i zapobieganie apoptozie [15]. Różne tkankowo-specyficzne izoformy SPHK1 powstają na skutek wykorzystania alternatywnych miejsc startu transkrypcji genu *Sphk1*. Proces ten jest kontrolowany przez wyspę CpG długości 3700 pz, w obrębie której zlokalizowany jest tkankowo-zależny, w różnym stopniu zmetylowany, region T-DMR (ang. *tissue-dependent differentially methylated region*). Poziom metylacji regionu T-DMR jest regulowany przez antysensowy transkrypt o długości 1290 nt (Kbps1), który pokrywa się z regionem T-DMR, a także z dwoma eksonami *Sphk1*. Wyspa CpG genu *Sphk1* jest zatem matrycą do syntezy sensowego i antysensowego transkryptu, można więc sadzić, że zawiera ona kilka promotorów, z których transkrypcja zachodzi w obu kierunkach. Stwierdzono, że pojawienie się Kbps1 indukuje demetylację miejsc CG oraz metylację cytozyn (tzw. non-CG) zlokalizowanych w pobliżu T-DMR. [16].

Inaktywacja chromosomu X u ssaków prowadzi do kompensacji dawki genów występujących na chromosomie X. Efekt ten jest osiągany poprzez wyciszenie transkrypcyjne jednego z chromosomów X w komórkach samic [17]. Kluczową rolę w tym procesie odgrywa rejon DNA zwany XIC (ang. *X-inactivation center*), z którego ekspresji ulega długi, podlegający splicingowi i poliadenylowany Xist RNA (ang. *X inactive-specific transcript*). Xist RNA znaczy miejsce wyciszenia poprzez hybrydyzację do DNA, dzięki czemu dochodzi do przyłączania białek odpowiedzialnych za modyfikacje i remodelowanie chromatyny [18, 19]. Ekspresja Xist RNA z allelu matczynego zależy od ekspresji innego niekodującego RNA – Tsix, który częściowo pokrywa się z Xist w orientacji antysensowej. Tsix najprawdopodobniej hamuje transkrypcję Xist, indukując modyfikację chromatyny [20].

Według podobnego mechanizmu zachodzi regulacja ekspresji genu receptora insulinopodobnego czynnika wzrostu typu 2 - *Igf2r* (ang. *insulin-like growth factor type-2 receptor*). U myszy ekspresja *Igf2r* i dwóch innych genów (*Slc22a2*, *Slc22a3*) zlokalizowanych

na chromosomie 17, zależna jest od obecności elementu kontrolującego imprinting (ang. *imprinting control element*, ICE), zwanego Regionem 2, o długości 3.7 kbp. Jest on zlokalizowany w drugim intronie *Igf2r* i posiada zmetylowaną wyspę CpG, która służy jako promotor do transkrypcji antysensownego Air RNA (ang. *antisense Igf2r RNA*). Air RNA ma długość 108 kbp i ulega ekspresji tylko z allelu ojcowskiego [21]. Obejmuje on około 30 kbp genu *Igf2r*, jego promotor i rozciąga się na 70 kbp powyżej genu. Air RNA jest wymagany nie tylko do represji *Igf2r*, ale także do wyciszania *Sc122a2* i *Sc122a3* zlokalizowanych 110 i 155 kbp poniżej genu *Igf2r*. Zaproponowano, że Air RNA funkcjonuje jako dwukierunkowy wyciszacz, ponieważ rejony promotorowe regulowanych genów zlokalizowane są po obu stronach startu transkrypcji Air RNA [22].

Regulatory lokalizacji RNA

Kolejną funkcją regulatorowych RNA jest wpływ na lokalizację mRNA w komórkach, szczególnie w takich, które charakteryzuje wysoki poziom specjalizacji.

U wielu organizmów polarność oocytów określana jest potranskrypcyjnie poprzez subkomórkową lokalizację RNA. Xisirts (ang. *Xenopus laevis short interspersed repeat transcripts*) to zidentyfikowana u żaby szponiastej *Xenopus laevis* rodzina niekodujących RNA, o długości 79-81 nukleotydów zaangażowana w inaktywację chromosomu X. Xisirts posiadają specyficzne sekwencje powtórzone, dzięki którym uczestniczą w dystrybucji RNA. Xisirt RNA w stadium I oocytów transportowane są z jądra do ciałek Balbianiego w mitochondriach. We wczesnym stadium III oocytów RNA te są przenoszone do kory wegetatywnej. Egzogenne Xisirt RNA, podane do oocytów, przemieszczają się w miejsce występowania endogennych Xisirt RNA [23].

BC1 i BC200 RNA (ang. *brain cytoplasmic 1 RNA*) są mózgowo-specyficznymi transkryptami syntetyzowanymi przez polimerazę III RNA. BC1 RNA ma długość 152 nukleotydów, po raz pierwszy zidentyfikowany został w komórkach nerwowych hipokampa podczas początkowych etapów tworzenia synaps, a później także w rybonukleoproteinach (RNP) ekstrahowanych z mózgu gryzoni. Gen kodujący BC1 RNA powstał prawdopodobnie na skutek retropozycji genu tRNA^{Ala}. Gen BC200 RNA powstał niezależnie przez retropozycję monomerycznego elementu Alu w locus, z którego ekspresja zachodziła w neuronach. Pomimo różnego pochodzenia, obie cząsteczki RNA wykazują podobieństwa strukturalne i funkcjonalne [24]. Zarówno BC1, jak i BC200 zapewniają dendrytyczną lokalizację wybranych mRNA. Najprawdopodobniej uczestniczą w tym procesie także białka, które razem z RNA tworzą kompleksy rybonukleoproteinowe (BC1/BC200 RNP) [25]. Stwierdzono,

na chromosomach 17, natomiast w innych organizmach jest to chromosom 10. W tym miejscu należy zaznaczyć, że w organizmach prokariotycznych nie ma analogicznych genów. W organizmach eukariotycznych geny te są rozmieszczone w różnych miejscach genomu. W organizmach ssaków geny te znajdują się na chromosomach 17 i 10. W organizmach ptaków geny te znajdują się na chromosomach 17 i 10. W organizmach ryb geny te znajdują się na chromosomach 17 i 10. W organizmach płazów geny te znajdują się na chromosomach 17 i 10. W organizmach gadów geny te znajdują się na chromosomach 17 i 10. W organizmach bezkręgowców geny te znajdują się na chromosomach 17 i 10.

Regulatory iolabiny i BCL-2

Kolejną funkcją iolabiny jest regulacja ekspresji genów BCL-2. Iolabina jest czynnikiem transkrypcyjnym, który wiąże się z promotorem genów BCL-2 i zwiększa ich ekspresję. W organizmach ssaków iolabina jest wyrażana w wielu tkankach, w tym w tkance tłuszczowej, mięśniach i kości. W organizmach ptaków iolabina jest wyrażana w tkance tłuszczowej i mięśniach. W organizmach ryb iolabina jest wyrażana w tkance tłuszczowej i mięśniach. W organizmach płazów iolabina jest wyrażana w tkance tłuszczowej i mięśniach. W organizmach gadów iolabina jest wyrażana w tkance tłuszczowej i mięśniach. W organizmach bezkręgowców iolabina jest wyrażana w tkance tłuszczowej i mięśniach.

BCL-1 i BCL-2

BCL-1 i BCL-2 to czynniki transkrypcyjne, które regulują ekspresję genów BCL-2. BCL-1 jest czynnikiem transkrypcyjnym, który wiąże się z promotorem genów BCL-2 i zwiększa ich ekspresję. BCL-2 jest czynnikiem transkrypcyjnym, który wiąże się z promotorem genów BCL-2 i zmniejsza ich ekspresję. W organizmach ssaków BCL-1 jest wyrażany w tkance tłuszczowej i mięśniach, natomiast BCL-2 jest wyrażany w tkance tłuszczowej i mięśniach. W organizmach ptaków BCL-1 jest wyrażany w tkance tłuszczowej i mięśniach, natomiast BCL-2 jest wyrażany w tkance tłuszczowej i mięśniach. W organizmach ryb BCL-1 jest wyrażany w tkance tłuszczowej i mięśniach, natomiast BCL-2 jest wyrażany w tkance tłuszczowej i mięśniach. W organizmach płazów BCL-1 jest wyrażany w tkance tłuszczowej i mięśniach, natomiast BCL-2 jest wyrażany w tkance tłuszczowej i mięśniach. W organizmach gadów BCL-1 jest wyrażany w tkance tłuszczowej i mięśniach, natomiast BCL-2 jest wyrażany w tkance tłuszczowej i mięśniach. W organizmach bezkręgowców BCL-1 jest wyrażany w tkance tłuszczowej i mięśniach, natomiast BCL-2 jest wyrażany w tkance tłuszczowej i mięśniach.

że za dendrytyczną lokalizację odpowiedzialny jest krótki rejon zlokalizowany przy końcu 5' RNA, do którego wiążą się przejściowo białka pur α i pur β (regulatory relakacji i transkrypcji DNA) [26]. Kolejnym białkiem specyficznie wiążącym BC1 i BC200 jest translatyna. Pur α i pur β uczestniczą najprawdopodobniej w procesie przyłączania BC1 RNP do mikrotubul, następnie oddysocjują od kompleksu, a ich rolę przejmuje translatyna [27]. Niedawno wykazano, że BC1 i BC200 RNA uczestniczą także w regulacji translacyjnej, wpływając na lokalną syntezę białka w dendrytach [28].

Regulatory posttranskrypcyjne

DsrA jest regulatorowym ncRNA o długości 87 nukleotydów, zidentyfikowanym u *E. coli*, zaangażowanym w obronę komórek przed szokiem wywołanym niskimi temperaturami (ang. *cold shock response*). O ile szok powodowany wysokimi temperaturami prowadzi do zwiększonej produkcji białek (szaperony i proteazy), o tyle w przypadku obniżenia temperatury, uaktywnione zostają specyficzne RNA i białka wiążące RNA.

DsrA RNA wiąże dwa rodzaje mRNA. Pierwszy koduje czynnik sigma polimerazy RNA (σ^{38}) - RpoS (ang. *RNA polymerase sigma factor*), odpowiedzialny za globalną aktywację transkrypcji, drugi koduje H-NS (ang. *histonelike nucleoid structuring protein*) – antagonistę RpoS [29]. Miejsce wiązania w RpoS jest zlokalizowane w 5'UTR (ang. *untranslated region*), około 70-80 nukleotydów powyżej kodonu start, w rejonie stabilnej spinki zbudowanej m.in. z sekwencji RBS (ang. *ribosome binding site*). DsrA RNA wiążąc RpoS mRNA, odblokuje RBS, przez co indukuje translację RpoS. Natomiast wiązanie H-NS mRNA w rejonie 3' i 5'UTR powoduje hamowanie translacji. W efekcie dochodzi do zwiększenia i zmniejszenia poziomu odpowiednio RpoS i H-NS w komórkach [29, 30]. Na aktywność DsrA wpływa także białko opiekuńcze wiążące RNA – Hfq. Jest ono niezbędne dla regulacji ekspresji H-NS i RpoS zależnej od DsrA [31].

micF jest genem odpowiedzi na czynniki stresowe u *E. coli* i innych bakterii. Koduje 93-nukleotydowy RNA, który wiąże produkt transkrypcji genu *ompF* (ang. *outer membrane porin protein F*). Obniżenie ekspresji *ompF* jest głównym mechanizmem odpowiedzi komórek na toksyczne warunki środowiska, ponieważ szybka kontrola przepuszczalności błony komórkowej jest kluczowa dla przetrwania. Sekwencja *micF* jest częściowo komplementarna do *ompF* mRNA. Regulacja ekspresji kodującego go genu odbywa się przez inhibicję translacji i indukcję degradacji docelowego mRNA. Stwierdzono, że ekspresja genu *micF* jest kontrolowana zarówno przez stres środowiskowy, jak i wewnątrzkomórkowy. Znane są

ponadto cztery regulatory wiążące specyficznie rejon promotorowy *micF* i aktywujące jego ekspresję [32].

Modulatory aktywności białek

Niekodujące RNA mogą wpływać na ekspresję genów także na poziomie transkrypcji jako modulatory aktywności czynników transkrypcyjnych. SRA RNA (ang. *steroid receptor activator RNA*) jest jednym z pierwszych odkrytych ncRNA wpływających na aktywność czynników transkrypcyjnych. Został zidentyfikowany jako poliadenylowany, ulegający splicingowi transkrypt, będący koaktywatorem hormonów steroidowych (progesteron, estrogenów, androgenów, glukokortykoidów) [33]. SRA RNA występuje w kilku wariantach powstałych na drodze alternatywnego splicingu, wszystkie posiadają wspólny konserwatywny trzon, otoczony przez zmienne sekwencje flankujące. Stwierdzono, że mutacje zaburzające strukturę drugorzędową trzonu redukują aktywność SRA RNA [34]. SRA RNA wykazuje powinowactwo do subrodziny białek wiążących RNA (p72/68), posiadających kasetę DEAD, która pośredniczy najprawdopodobniej w łączeniu SRA RNA z SRC-1 (ang. *steroid receptor coactivator 1*) [35]. SRA RNA wiąże ponadto indukowany hormonami transkrypcyjny represor SHARP (ang. *SMRT/HDAC1 associated repressor proteins*). Jest to białko odpowiedzialne za dobór odpowiednich deacetylaz histonowych. Współzawodnictwo między aktywatorem a represorem może stanowić podstawę regulacji ekspresji genów kodujących hormony [36]. Częsteczka SRA RNA to również przykład na to, że z jednego genu mogą powstawać dwa różne końcowe produkty, jednym jest mRNA, z którego powstają funkcjonalne białka, drugim jest ncRNA.

6S RNA to niekodujący RNA zidentyfikowany u *E.coli*, który wiąże holoenzym polimerazy RNA σ^{70} i reguluje ekspresję genów w odpowiedzi na przejście komórki z fazy wzrostu eksponencjalnego do stacjonarnego. Stwierdzono, że 6S RNA akumuluje się w miarę osiągania przez komórki fazy stacjonarnej wzrostu i pośredniczy w specyficznych zmianach związanych z przejściem z jednej fazy do drugiej. Hamuje ekspresję genów z promotorów zależnych od σ^{70} [37]. Najważniejsze dla aktywności *in vivo* oraz *in vitro* tej cząsteczki RNA jest jednoniciowe centralne wybrzuszenie, które otoczone jest strukturami dwuniciowymi [38].

2.1.2 Interferencja RNA

Interferencja RNA (ang. *RNA interference*) to proces polegający na wyciszaniu ekspresji genu pod wpływem dwuniciowego RNA (dsRNA). Zjawisko to odkryto w 1998 roku u *Caenorhabditis elegans* [39]. Badania Fire i Mello, nagrodzone w 2006 r. Nagrodą Nobla, poprzedzone zostały odkryciem, że u *Nematode* zarówno sensowe, jak i antysensowe RNA zdolne są do supresji genów. Stwierdzono, że równoczesne podanie sensowej i antysensowej cząsteczki RNA wycisza ekspresję genów 10-krotnie silniej niż każda z nici osobno [39]. Wyciszanie osiągnano poprzez iniekcje RNA do gonad *C. elegans* lub podanie go razem z pokarmem. Stwierdzono, że ekspozycja osobników rodzicielskich na bardzo niewielkie ilości dsRNA (kilka cząsteczek na komórkę) indukowała wyciszanie genów zarówno u rodziców, jak i ich potomstwa (pokolenie F1).

Kilka lat wcześniej prowadzono badania zmierzające do uzyskania intensywniejszej barwy kwiatów u petunii (*Petunia hybrida*). Do komórek wprowadzano dodatkową kopię genu syntazy chalkonowej. Okazało się, że zamiast intensywnie fioletowej barwy, większość kwiatów miała barwę od fioletowego do białego [40]. Nie znając podstaw molekularnych obserwowanego zjawiska stwierdzono, że wprowadzenie dodatkowej kopii genu do komórek hamuje zarówno ekspresję transgenu, jak i endogenu, a więc kosupresję. Podobne zjawiska zaobserwowano u *Neurospora*, a także u *Drosophila* czy ssaków [41, 42]. Równolegle wykazano, że w zainfekowanych wirusami roślinach dochodzi do specyficznej degradacji wytwarzanych przez patogena RNA [43-45]. Dalsze badania genetyczne i biochemiczne potwierdziły, że RNAi, kosupresja i PTGS wykazują duże podobieństwa, a także, że zjawiska te są charakterystyczne dla większości, o ile nie dla wszystkich organizmów eukariotycznych.

2.1.2.1 Mechanizm RNAi

Ogólny schemat biogenezy krótkich regulatorowych RNA (ang. *small regulatory RNA*, srRNA) jest podobny dla wszystkich tego typu cząsteczek tj: siRNA, miRNA, tasiRNA, rasiRNA, tncRNA, piRNA. Dwuniciowe cząsteczki RNA są cięte, w wyniku czego powstają około 21-23 nukleotydowe dupleksy [46, 47]. Posiadają one dwa niesparowane nukleotydy na końcu 3'. Cięcie przeprowadzane jest przez białko posiadające kilka aktywności enzymatycznych, nazwane Dicer (dokładny opis w rozdziale 2.2.2). Dupleks RNA jest przekazywany od domeny PAZ Dicer do domeny PAZ białka Argonaute wchodzącego w skład kompleksu białkowego RISC (ang. *RNA induced silencing complex*). Jedna z nici dupleksu jest następnie usuwana [47, 48], a druga funkcjonuje jako sonda umożliwiająca rozpoznawanie docelowej cząsteczki mRNA [49, 50]. Po sparowaniu z nią, może dochodzić do cięcia wiązania

2.1.2. Interakcja RNA

Interakcja RNA z białkami jest jednym z najważniejszych aspektów biologii molekularnej. Wiele białek wiąże się z RNA, co umożliwia im kontrolowanie jego funkcji. W tym celu białka rozpoznają specyficzne sekwencje RNA, które mogą być elementami strukturalnymi lub sygnałami. Wskazano, że białka takie jak ribozymy i białka wiążące RNA (RBP) odgrywają kluczową rolę w procesach takich jak transport, przetwarzanie i regulacja ekspresji genów. Wskazano również, że białka mogą wpływać na strukturę i stabilność RNA, co ma istotne znaczenie dla jego funkcji biologicznych.

Wskazano, że białka wiążące RNA (RBP) odgrywają kluczową rolę w procesach takich jak transport, przetwarzanie i regulacja ekspresji genów. Wskazano również, że białka mogą wpływać na strukturę i stabilność RNA, co ma istotne znaczenie dla jego funkcji biologicznych. Wskazano, że białka wiążące RNA (RBP) odgrywają kluczową rolę w procesach takich jak transport, przetwarzanie i regulacja ekspresji genów. Wskazano również, że białka mogą wpływać na strukturę i stabilność RNA, co ma istotne znaczenie dla jego funkcji biologicznych.

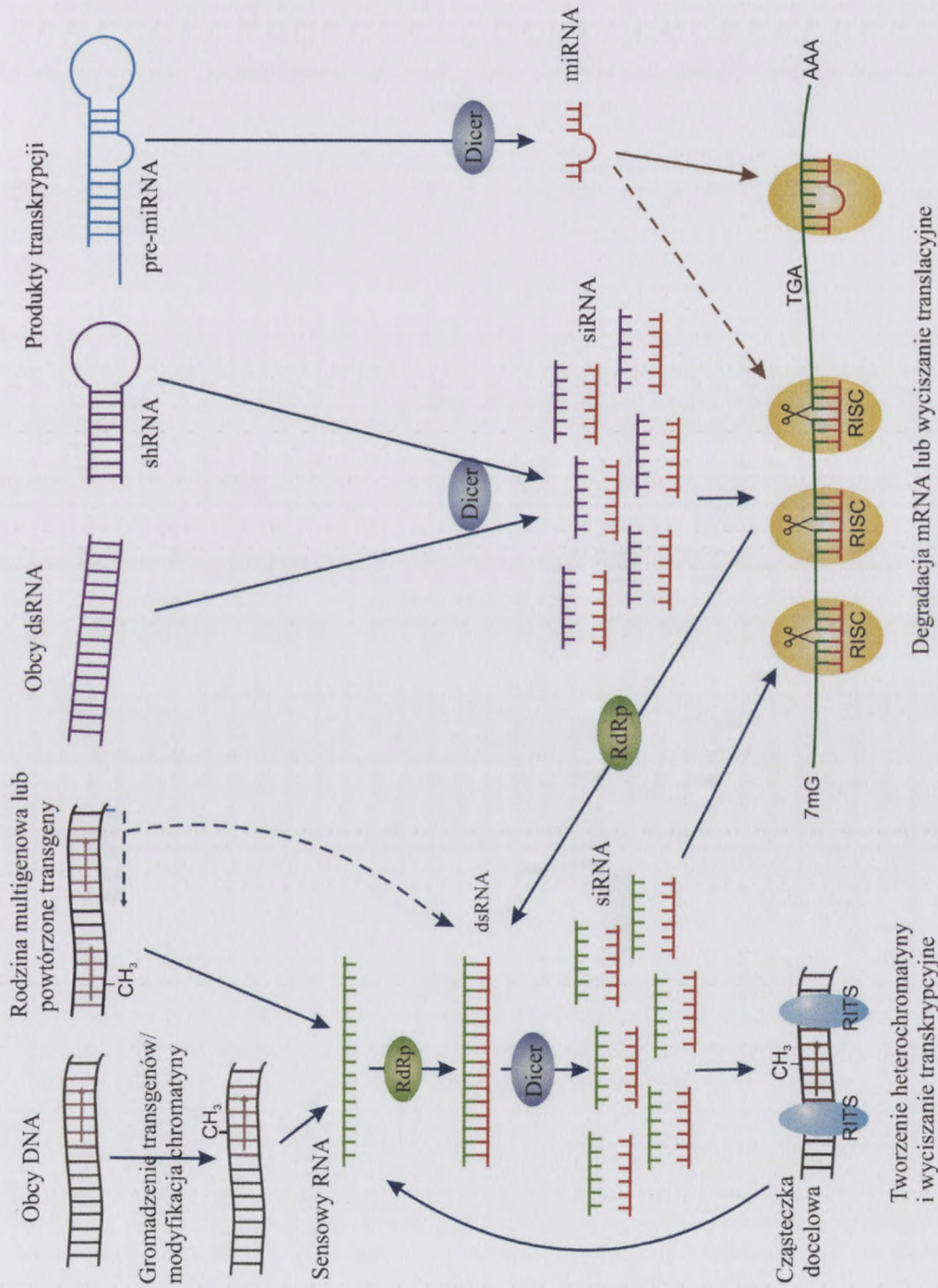
2.1.2.1. Mechanizm RNA

Opisując mechanizm RNA, należy wziąć pod uwagę jego strukturę trójwymiarową i sposób, w jaki umożliwia ona wiązanie białek. RNA może przyjmować różne konformacje, które są stabilizowane przez wiązania wodorowe i interakcje hydrofobowe. Wskazano, że białka wiążące RNA (RBP) odgrywają kluczową rolę w procesach takich jak transport, przetwarzanie i regulacja ekspresji genów. Wskazano również, że białka mogą wpływać na strukturę i stabilność RNA, co ma istotne znaczenie dla jego funkcji biologicznych.

fosfodiesterowego w mRNA, położonego między 10 i 11 nukleotydem duplexu srRNA/mRNA [51]. Trawienie mRNA ma miejsce tylko wtedy, gdy większa część sekwencji srRNA paruje z sekwencją mRNA, tworząc przynajmniej jeden skręt helisy A [52, 53]. Dostarczenie energii w postaci ATP jest wymagane, aby zaszło cięcie i uwolnienie zhydrolizowanego mRNA z kompleksu [52, 54]. W tym etapie uczestniczą prawdopodobnie także dodatkowe białka. Stwierdzono bowiem, że Ago2 może przeprowadzić tylko jedno wydajne cięcie, ale nie katalizuje dalszych cykli. Sugeruje się, że jest to wynikiem pozostawiania srRNA i zhydrolizowanego mRNA w kompleksie z Ago2 [55]. Fragment 3' powstały po cięciu mRNA jest hydrolizowany w cytoplazmie przez endonukleazę Xrn1, a fragment 5' jest degradowany przez egzozom za pomocą egzozonukleaz 3'→5' [56]. U roślin i zwierząt do powstałego w wyniku cięcia fragmentu 5' mRNA może zostać dobudowywany krótki ogon poliurydynowy (poli(U)) na końcu 3'. Jest to związane z procesem usuwania struktury czapeczki i hydrolizy za pomocą egzozonukleaz w kierunku 5'→3'. Wydaje się zatem, iż mogą istnieć dwie alternatywne drogi degradacji w egzozomie [57].

Podczas niepełnego parowania krótkich RNA z cząsteczkami docelowymi, nie dochodzi do hydrolizy mRNA, ale do hamowania translacji [58, 59]. Jednakże samo wiązanie pojedynczej cząsteczki srRNA nie jest wystarczające do efektywnej inhibicji, w związku z tym najczęściej kilka krótkich RNA wiąże jedną cząsteczkę mRNA [60]. Wykazano, że krótkie RNA, w kompleksie z białkiem Ago2, mogą uczestniczyć w przenoszeniu mRNA z cytozolu do miejsc degradacji, zwanych ciałkami P (ang. *Processing body*) [61, 62]. W ciałkach P najprawdopodobniej dochodzi do usuwania struktury czapeczki z końca 5' i hydrolizy mRNA. Dodatkowo ciałka P zapewniają izolację matrycowego mRNA od rybosomów i w ten sposób uniemożliwiają translację. Postuluje się istnienie dwóch dróg degradacji mRNA w ciałkach P. Pierwszej, polegającej na powolnej hydrolizie mRNA, w związku z czym może on być zawracany do cytoplazmy i uczestniczyć w translacji. Drugiej - szybkiej, podczas której enzym Dcp1/2 usuwa czapeczkę z mRNA, po czym następuje jego trawienie przez egzozonukleazę Xrn1.

foliobionty w mRNA...
[51] Tabela mRNA...
z sekwencją mRNA...
w postaci ATP...
z kompleksu 17.5...
Stwierdzono...
katalizuje...
i zhydrolizuje...
mRNA jest...
degradacji...
do powstania...
polinukleotydowy...
części i...
innych...
Foliar...
nie...
wzrost...
w...
Wzrost...
w...
body [51, 61].
z kodem 2...
od...
degradacji...
w...
-...
tworzenie...



Rysunek 2. Wyciszenie ekspresji genów za pomocą RNA.



The diagram shows the synthesis of DNA strands at a replication fork. The leading strand is synthesized continuously towards the fork, while the lagging strand is synthesized discontinuously as Okazaki fragments. The RNA primer is used to initiate synthesis on the lagging strand.

2.1.2.2 Rodzaje krótkich regulatorowych RNA

Analizy krótkich regulatorowych RNA doprowadziły do podzielenia ich na kilka klas, w zależności od pochodzenia lub sposobu działania. Znaczna część srRNA jest kodowana w genomie, ich źródłem może być też obcy materiał genetyczny, np.: wirusowy. Krótsze cząsteczki (20-23 nt) uczestniczą w degradacji mRNA i hamowaniu translacji, podczas gdy dłuższe (24 - 28 nt) wpływają na modyfikacje struktury DNA. Obecnie wyróżnia się następujące klasy krótkich srRNA: siRNA (ang. *small interfering RNA*), tasiRNA (ang. *trans-acting small interfering RNA*), rasiRNA (ang. *repeat-associated small interfering RNA*), tncRNA (ang. *tiny noncoding RNA*), mikroRNA (ang. *microRNA*, *miRNA*). W ostatnim czasie zidentyfikowano również piRNA (ang. *Piwi-interacting RNA*).

siRNA

Małe interferujące RNA mają długość około 22 nukleotydów, tworzone są z długich dwuniciowych cząsteczek prekursorowych o różnym pochodzeniu. siRNA mogą powstawać pod wpływem wprowadzenia do organizmu dsRNA lub na skutek ekspresji transgenów. Wydaje się, że endogenne źródła siRNA są stosunkowo rzadkie.

U roślin funkcją siRNA jest ochrona organizmu przed infekcjami wirusowymi i ekspresją transgenów, uczestniczą one także w organizowaniu struktury chromosomów i wyciszaniu ekspresji genów na drodze metylacji DNA [63, 64]. Pokazano, iż w obronie przed wirusami uczestniczy także kodowana przez rośliny polimeraza RNA zależna od RNA. Syntetyzuje ona dsRNA wykorzystując wirusowy RNA jako matrycę. Powstały produkt jest następnie trawiony przez Dicer [65]. W rezultacie powstaje duża liczba siRNA skierowanych przeciwko wirusowym RNA [66].

siRNA biorą także udział w modyfikacji chromatyny. Na przykład gen *FWA* u *A. thaliana* posiada dwa powtórzenia tandemowe, które jak stwierdzono są niezbędne w metylacji DNA *de novo*. Endogenny *FWA* może przyjmować dwa stany epigenetycznie – metylowany, czyli wyciszony, bądź niemetylowany, czyli aktywny. Stwierdzono, że w regulacji ekspresji genu *FWA* uczestniczą siRNA poprzez mechanizm zależnej od RNA metylacji reszt cytozynowych [67]. Wykazano także, że u drożdży *S. pombe*, kompleks RITS (ang. *RNA induced transcriptional silencing*), w skład którego wchodzi między innymi białko Argonaute, rybonukleaza Dicer i polimeraza RNA zależna od RNA oraz siRNA, jest niezbędny do tworzenia heterochromatyny. Metylacja reszty lizyny w pozycji 9 histonu H3 (H3-K9) powoduje wiązanie RITS do chromatyny, pozwalając maszynerii RNAi działać w układzie *cis* [68].

2.1.2.2. Role funkcji regulacyjnych RNA

Analizy funkcji regulacyjnych RNA doprowadziły do podziału ich na kilka klas w zależności od pochodzenia lub sposobu działania. Znaczną część RNA jest kodowana w genomie, ich źródłem może być też odczyt maszynki genetycznej, np.: wirusowy. Klasyfikacja (20-23 nt) ukształtowania w doświadczeniach mRNA i hamowania translacji, podczas gdy długość (24 - 28 nt) wpływa na modyfikację struktury DNA. Obecnie wyróżnia się następujące klasy: siRNA (ang. small interfering RNA), tasiRNA (ang. trans-acting siRNA), miRNA (ang. microRNA), piRNA (ang. piwi-interacting RNA), lincRNA (ang. long non-coding RNA), snoRNA (ang. small nucleolar RNA). W ostatnim czasie zalecanych jest również piRNA (ang. piwi-interacting RNA).

siRNA

Małe interferujące RNA mają długość około 22 nukleotydów, tworzone są z dwójki domenowych cząsteczek proteinowych o różnym pochodzeniu. siRNA mogą powstawać pod wpływem wprowadzenia do organizmu dsRNA lub na skutek ekspresji transgenów. Wyróżnia się ze względu na źródło: siRNA endogenne i siRNA eksogenne.

Endogenna siRNA jest obecna w organizmie przed infekcją wirusową i ekspresją transgenów, uczestniczy one także w organizowaniu struktury chromosomów i wyciszaniu ekspresji genów na drodze metylacji DNA [65, 66]. Pokazano, iż w obronie przed wirusami uczestniczą także kodowane przez rośliny polimerazy RNA zależna od RNA. Syntetyzują one dsRNA wykorzystując wirusowy RNA jako matrycę. Powstały produkt jest następnie rozkładany przez Dicer [65]. W rezultacie powstaje duża liczba siRNA składowanych przeciwko wirusowi RNA [66].

siRNA biorą także udział w modyfikacji chromosomów. Na przykład gen FWA u Arabidopsis posiada dwa powtórzenia tandemowe, które jak stwierdzono są niezbędne w aktywacji DNA do nasienia. Endogenne FWA może przycinać dwa stany epigenetyczne - metylowany czyli wyciszony, bądź nie-metylowany, czyli aktywny. Stwierdzono, że w regulacji ekspresji genu FWA uczestniczą siRNA poprzez mechanizm zależny od RNA [67]. Wykazano także, że u drożdży 2 powtórzenia RITS (ang. RNA induced silencing complex) w skład którego wchodzi między innymi białko Argonaute, rybonukleaza Dicer i polimeraza RNA zależna od RNA oraz siRNA, jest niezbędny do tworzenia heterodimeru. Metylacja tercyli history w pozycji 9 histonu H3 (H3K9) powoduje wiązanie RITS do chromosomów, pozwalając nasyceniu RNAi działac w układzie cis [68].

tasiRNA

tasiRNA zidentyfikowano u roślin jako endogenne siRNA, kodowane przez geny jądrowe *TAS*. Sekwencje poszczególnych tasiRNA sąsiadują ze sobą w genomie, ale na siebie nie nachodzą. Znajdują się one między sekwencjami kodującymi białka i transkrybowane są najprawdopodobniej przy udziale polimerazy RNA III [69]. Stwierdzono, że w tworzenie tasiRNA zaangażowane są miRNA, a także RDR6, SGS3 (ang. *suppressor of gene silencing 3*) oraz DCL4 (ang. *Dicer-like protein 4*). Wykazano, że specyficzne miRNA rozpoznając *TAS* mRNA, doprowadzają do ich degradacji. Powstałe w ten sposób cząsteczki służą jako matryca dla roślinnej polimerazy RNA zależnej od RNA. Po dobudowaniu drugiej nici, powstały dsRNA jest cięty przez rybonukleazę Dicer, tworząc tasiRNA. Uczestniczą one w degradacji innych mRNA, niż te, z których powstały, stąd ich nazwa – siRNA działające w układzie *trans* [63].

Wykazano między innymi, że tasiRNA transkrybowane z genu *TAS3* są komplementarne do transkryptów ARF 1, 2, 3 (ang. *auxin response factor 1, 2, 3*) [69]. Stwierdzono także, że tasiRNA transkrybowane z genu *TAS2* uczestniczą w regulacji ekspresji genów kodujących białka z rodziny PPR (ang. *pentatricopeptide repeat protein*) [70].

rasiRNA

rasiRNA powstają u roślin i niższych organizmów zwierzęcych, najprawdopodobniej w wyniku degradacji długich komplementarnych transkryptów. Różnią się od pozostałych krótkich regulatorowych RNA długością wynoszącą 24 - 28 nukleotydów.

U *Drosophila* rasiRNA zapewniają stabilność genetyczną poprzez wyciszenie retrotranspozonów i sekwencji powtórzonych. Stwierdzono, że rasiRNA związane z białkami Piwi (ang. *P-element induced wimpy testis*) oraz Aub (ang. *aubergine*) – należącymi do rodziny białek Ago – powstają z nici antysensowej, natomiast te związane z Ago3 - z nici sensowej retrotranspozonów. Zaproponowano model, według którego za tworzenie końców 5' cząsteczek rasiRNA odpowiedzialne są rasiRNA utworzone z nici antysensowej, przy udziale białek Slicer oraz PIWI. W powstawanie rasiRNA u *Drosophila* najprawdopodobniej nie jest zaangażowana ani rybonukleaza Dicer-1 (tworzy miRNA) ani Dicer-2 (zaangażowana w produkcję siRNA) [71].

U *A. thaliana* rasiRNA powstają przy udziale polimerazy RDR6 i DCL3 (ang. *Dicer-like protein 3*). W kompleksie z białkiem Ago4 uczestniczą one w modyfikacji heterochromatyny na drodze zależnej od metylotransferazy KYP (ang. *kryptonite histone H3 lysine 9 (H3K9) methyltransferase*) metylacji histonów oraz zależnej od metylazy CMT3 (ang.

W tym celu wykorzystano metodę Southern blotting. DNA z bakterii *E. coli* transformowanych przez plazmidy zawierające geny *lacZ* i *lacA* podlegało trawieniu endonukleazą EcoRI. Fragmenty DNA o długości ok. 1000 bp podlegały separacji na żel agarozowy i transferowi na membranę nitrocelulozową. Następnie membrana była inkubowana z sondą DNA zawierającą sekwencję 5'-GGG TTT GGG-3' (kodujący dla reszty histyliny) i sondą RNA zawierającą sekwencję 5'-GGG TTT GGG-3' (kodujący dla reszty histyliny). Wyniki analizy przedstawiono na rysunku 1. Widać, że w DNA transformantów występuje fragment o długości ok. 1000 bp, który jest identyczny z sondą DNA i RNA. Wyniki te dowodzą na to, że geny *lacZ* i *lacA* zostały w całości wkomponowane do genomu bakterii transformowanych.

W celu sprawdzenia, czy bakterie transformowane przez plazmidy zawierające geny *lacZ* i *lacA* są zdolne do produkcji białek, wykonano analizy immunoblotowe. W tym celu wykorzystano metodę Western blotting. Wykres 2 przedstawia wyniki analizy immunoblotowej. Widać, że w białkach transformantów występują białka o masach cząsteczkowych ok. 10000 i 15000, które są identyczne z białkami produkowanymi przez bakterie transformowane przez plazmidy zawierające geny *lacZ* i *lacA*.

W celu sprawdzenia, czy bakterie transformowane przez plazmidy zawierające geny *lacZ* i *lacA* są zdolne do produkcji białek, wykonano analizy immunoblotowe. W tym celu wykorzystano metodę Western blotting. Wykres 2 przedstawia wyniki analizy immunoblotowej. Widać, że w białkach transformantów występują białka o masach cząsteczkowych ok. 10000 i 15000, które są identyczne z białkami produkowanymi przez bakterie transformowane przez plazmidy zawierające geny *lacZ* i *lacA*.

W celu sprawdzenia, czy bakterie transformowane przez plazmidy zawierające geny *lacZ* i *lacA* są zdolne do produkcji białek, wykonano analizy immunoblotowe. W tym celu wykorzystano metodę Western blotting. Wykres 2 przedstawia wyniki analizy immunoblotowej. Widać, że w białkach transformantów występują białka o masach cząsteczkowych ok. 10000 i 15000, które są identyczne z białkami produkowanymi przez bakterie transformowane przez plazmidy zawierające geny *lacZ* i *lacA*.

W celu sprawdzenia, czy bakterie transformowane przez plazmidy zawierające geny *lacZ* i *lacA* są zdolne do produkcji białek, wykonano analizy immunoblotowe. W tym celu wykorzystano metodę Western blotting. Wykres 2 przedstawia wyniki analizy immunoblotowej. Widać, że w białkach transformantów występują białka o masach cząsteczkowych ok. 10000 i 15000, które są identyczne z białkami produkowanymi przez bakterie transformowane przez plazmidy zawierające geny *lacZ* i *lacA*.

W celu sprawdzenia, czy bakterie transformowane przez plazmidy zawierające geny *lacZ* i *lacA* są zdolne do produkcji białek, wykonano analizy immunoblotowe. W tym celu wykorzystano metodę Western blotting. Wykres 2 przedstawia wyniki analizy immunoblotowej. Widać, że w białkach transformantów występują białka o masach cząsteczkowych ok. 10000 i 15000, które są identyczne z białkami produkowanymi przez bakterie transformowane przez plazmidy zawierające geny *lacZ* i *lacA*.

chromomethylase3) i metylotransferazy DRM (ang. *domains-rearranged methyltransferase*) metylacji reszt cytydynowych w DNA [72].

tncRNA

tncRNA zostały zidentyfikowane u *C. elegans*. Badając cDNA krótkich niekodujących RNA stwierdzono, że niektóre z nich przypominają miRNA, ponieważ wywodzą się z rejonów niekodujących, jednak różnią się od nich strukturą drugorzędową, w związku z czym sklasyfikowano je jako odrębną grupę. Stwierdzono, że *tncRNA* zależą od aktywności rybonukleazy Dicer. Przypuszcza się, że przynajmniej część z nich powstaje z długich jednoniciowych bądź dwuniciowych RNA oraz, że niektóre *tncRNA* mogą być syntetyzowane jako bardzo krótkie pierwotne transkrypty, mają ok. 20-22 nt długości. Kilka z nich może tworzyć struktury drugorzędowe przypominające spinki do włosów. Nie stwierdzono, by *tncRNA* były zachowawcze ewolucyjnie, co może poddawać w wątpliwość ich istotność jako cząsteczek regulatorowych. Wykazują one jednak bardzo interesujące czasowe profile ekspresji, sugerując, że mogą uczestniczyć w ścieżkach rozwojowych. Wykazano, że *tncRNA* są antysensowe wobec sekwencji niektórych cDNA, co sugeruje, iż mogą to być cząsteczki siRNA-podobne. Do tej pory nie została jednak poznana funkcja *tncRNA* [73].

miRNA

miRNA są to najpowszechniej występujące w komórkach roślinnych i zwierzęcych i zarazem najlepiej poznane krótkie regulatorowe RNA. Ich przeciętna długość to 22 nukleotydy (ale waha się między 19 a 25 nt). Geny miRNA są transkrybowane głównie przez polimerazę RNA II [60, 74]. Pierwotne transkrypty miRNA, zwane pri-miRNA, posiadają czapkę (ang. *cap*) na końcu 5' oraz ogon poli(A) (ang. *poly(A) tail*) na końcu 3'. W jądrze komórkowym podlegają wstępnej obróbce przy udziale kompleksu enzymatycznego zwanego Drosha/Pasha. W rezultacie powstają pre-miRNA, które przenoszone są do cytoplazmy przez eksportynę 5. W wyniku cięcia kolejnym enzymem – Dicer - powstają dojrzałe cząsteczki miRNA [75].

Rozmieszczenie genów miRNA w genomie nie jest przypadkowe. Ponad połowa zidentyfikowanych miRNA zakodowana jest w sekwencjach intronowych, ale kodowane są także w eksonach [13, 74, 76-79]. Stwierdzono, że zarówno lokalizacja niektórych intronowych miRNA, jak i poziom ich ekspresji jest ewolucyjnie zachowawczy. Na przykład mir-126 jest zlokalizowany w intronie genu *EGFL7* i ulega ekspresji na podobnym poziomie w komórkach śródbłonna serca i naczyń krwionośnych u myszy, człowieka i tropikalnej ryby

chromosomach) i metylometylaza DNMT (ang. domain-methyltransferase) przyczyniają się do cytylowania w DNA [72].

miRNA

miRNA zostały zidentyfikowane u C. elegans. Badając cDNA krótkich niekodujących RNA stwierdzono, że niektóre z nich przypominają miRNA, ponieważ wywodzi się z regionów niekodujących, jednak różni się od nich strukturą drugorzędową, w związku z czym sklasyfikowano je jako odrębną grupę. Stwierdzono, że miRNA zależy od aktywności enzymu Dicer. Przypuszcza się, że przynajmniej część z nich powstaje z długich jednocząsteczkowych RNA oraz, że niektóre miRNA mogą być syntetyzowane jako bardzo krótkie pierwiastki transkrypcyjne, mające ok. 20-32 nt długości. Kilka z nich może tworzyć strukturę drugorzędową przypominającą spiralę do wiązania. Nie stwierdzono, by miRNA były kodowane ewolucyjnie, co może podważać wagi ich roli. Istotność jako czynniki regulacyjne. Wykazują one jednak bardzo intensywny charakter. Istotność czynniki regulacyjne. Istotność w niektórych organizmach. Wykazano, że miRNA są syntetyzowane w obrębie niekodującej cDNA, co sugeruje, iż mogą to być czynniki miRNA-podobne. Do tej pory nie zostało jednak poznane funkcja miRNA [73].

miRNA

miRNA są to najnowszymi odkrytymi w komórkach roślinnych i zwierzęcych i są to najkrótsze czynniki regulacyjne RNA. Ich przeciętne długość to 22 nukleotydy (nie waha się między 19 a 25 nt). Cząstki miRNA są transkrybowane głównie przez polimerazę RNA II [66, 74]. Pierwotnie transkrypcja miRNA zwana pre-miRNA, powstaje cząstkami (ang. copy) na każdym 7. oraz 8. miejscu (ang. poly(A) tail) na końcu 3'. W jądze komórkowym podlega wiązaniu z białkami kompleksu enzymatycznego zwanego Drosha/DGCR8. W rezultacie powstaje pre-miRNA, która przenoszona do cytoplazmy przez ekspertyzę 5'. W wyniku cięcia kolejnym enzymem – Dicer – powstaje dalsze cząstki miRNA [75].

Różnicowanie genów miRNA w genomie nie jest przypadkowe. Ponad połowa zidentyfikowanych miRNA zakodowana jest w sekwencjach intronowych, ale kodowane są także w sekwencjach [13, 74, 76-79]. Stwierdzono, że zarówno lokalizacja niektórych intronowych miRNA, jak i poziom ich ekspresji jest ewolucyjnie zachowawczy. Na przykład mi-156 jest lokalizowany w intronie genu EGFL3 i ulega ekspresji na podobnym poziomie w komórkach różniących się i między krwionośnymi a myszy, człowieka i makiakami [76].

Danio rerio [80]. Taka wysoka homologia sugeruje ważną i zachowawczą rolę miRNA. Wykazano również, że niektóre ssacze miRNA pochodzą z sekwencji powtórzonych, głównie transpozonów [81]. Część miRNA powstaje także z pseudogenów [82]. Niektóre z genów miRNA podlegają ekspresji konstytutywnej na stałym poziomie w trakcie całego cyklu rozwojowego organizmu, inne transkrybowane są tylko w ściśle określonych warunkach, w pewnym etapie rozwoju.

Wykazano, że miRNA pełnią bardzo istotne funkcje podczas procesów rozwojowych, podziałów komórek, apoptozy, metabolizmu tłuszczu, różnicowania mięśni, podziałów komórek macierzystych czy morfogenezie mózgu [13, 83, 84]. Stwierdzono, że wszelkim zmianom zachodzącym w komórkach (zarówno fizjologicznym, jak i patologicznym) towarzyszą istotne zmiany w składzie krótkich regulatorowych RNA. Wzór ekspresji genów miRNA różni się znacznie w komórkach zdrowych i w poszczególnych typach komórek nowotworowych [85-87]. Profile akumulacji miRNA okazały się bardzo informatywne w diagnostyce medycznej, stwierdzono bowiem, że nowotwory wywodzące się z tego samego typu tkanki mają podobne profile miRNA. W rezultacie, analizując profile ekspresji genów miRNA, można identyfikować różne rodzaje nowotworów.

piRNA

piRNA są to jednoniciowe cząsteczki RNA o długości 26 - 31 nukleotydów. Do tej pory zidentyfikowano od 100 do 200 loci dla genów piRNA u myszy, szczura i człowieka. Mechanizm powstawania piRNA nie jest jeszcze poznany, do tej pory nie zidentyfikowano żadnych dwuniciowych prekursorów tych cząsteczek. Według jednego z modeli piRNA mogą powstawać z długich transkryptów trawionych na krótkie fragmenty. Długość piRNA sugeruje jednak, że w ich tworzenie nie jest zaangażowana rybonukleaza Dicer.

Po raz pierwszy piRNA zidentyfikowano w kompleksach z białkiem Miwi [88] i Riwi [89] (mysie i szczurze odpowiedniki ludzkiego Piwi). Rodzina białek Piwi uczestniczy w mejozie i podtrzymaniu linii zarodkowych komórek macierzystych, jednak dokładna ich rola nie jest jeszcze znana. Geny piRNA wykazują zróżnicowaną lokalizację w genomie, są przeważnie pogrupowane w klastry od 20 do 90 kpz. Zazwyczaj tylko jedna z nici DNA koduje piRNA, może się jednak zdarzyć, że są kodowane na drugiej, komplementarnej nici. Jak dotąd funkcja piRNA nie została poznana. Jednakże prawdopodobna wydaje się być hipoteza, iż uczestniczą one w gametogenezie [88]. Sugeruje się, że produkcja piRNA jest wysoce konserwatywna, jednak sekwencyjnie nie są one zachowawcze. Wspiera to model, według którego piRNA wpływają na ekspresję tych samych loci, z których powstają [89].

2.2 Rybonukleazy

Są to enzymy, należące do klasy hydrolaz (EC3) [<http://www.ebi.ac.uk/intenz/query?cmd=SearchEC&ec=3.1>]. Ich funkcją jest cięcie kwasów rybonukleinowych. Enzymy te odgrywają bardzo istotną rolę np.: uczestniczą w obróbce pre-RNA oraz regulacji ekspresji genów, degradują nieprawidłowo zsyntetyzowane RNA. Wiele rybonukleaz może odgrywać podwójną rolę w komórkach. Z jednej strony degradują RNA, a z drugiej uczestniczą w obróbce, dojrzewaniu i kontroli ustrukturyzowania RNA. Proponuje się nawet, że to struktura RNA może być odpowiedzialna za wybór drogi dojrzewania czy też degradacji [90].

Ze względu na sposób trawienia RNA, rybonukleazy zostały podzielone na dwie mniejsze grupy: endo- i egz nukleazy; endonukleazy tną wewnątrz cząsteczki RNA, a egz nukleazy rozpoczynają cięcie od końców. Do endorybonukleaz zalicza się między innymi RNazy: A, P, H, III, T1, T2, U2, V, V1, I, L czy PhyM, a do egzorybonukleaz RNazy: PH, II, R, D, T, a także fosforylazę polinukleotydową (PNPaza), oligorybonukleazę, czy też egzorybonukleazy I i II. Enzymy te najczęściej wykazują specyficzną cięcia kwasów rybonukleinowych i przez to znacznie się między sobą różnią. Substratami dla nich mogą być jednoniciowe lub dwuniciowe cząsteczki RNA, duplekty zbudowane z RNA i DNA. Rybonukleazy mogą wykazywać specyficzną sekwencyjną (T1, T2, U2) lub też jej brak np.: RNaza L niespecyficznie degraduje znajdujący się w komórkach RNA .

Zasadnicze znaczenie dla niniejszej pracy mają dwa białka, które ze względu na posiadane aktywności można zaliczyć do rybonukleaz. Są to odwrotna transkryptaza ludzkiego wirusa upośledzenia odporności (ang. *Human Immunodeficiency Virus 1 reverse transcriptase*, HIV-1 RT) i ludzka rybonukleaza Dicer.

HIV-1 RT jest enzymem wielofunkcyjnym, oprócz aktywności polimerazowej posiada również aktywność nukleazy – RNazy H, której funkcją jest rozpoznawanie dupleksów RNA/DNA i degradowanie nici RNA. Jest niespecyficzną endonukleazą pozostawiającą grupę fosforanową na końcu 3' cząsteczki RNA.

Dicer charakteryzuje natomiast obecność dwóch domen RNazy III. Trawi ona duplekty RNA/RNA. Powstałe produkty posiadają grupę fosforanową na końcu 5' i dwa niesparowane nukleotydy na końcu 3'.

2.2 Rysunek

W tym celu należy skorzystać z funkcji `plot` w pakiecie `ggplot2`. Należy przygotować dane i wykonać odpowiednie kroki, aby uzyskać oczekiwany efekt. W tym celu należy skorzystać z funkcji `ggplot` i `aes`.

W tym celu należy skorzystać z funkcji `ggplot` i `aes`. Należy przygotować dane i wykonać odpowiednie kroki, aby uzyskać oczekiwany efekt. W tym celu należy skorzystać z funkcji `ggplot` i `aes`.

W tym celu należy skorzystać z funkcji `ggplot` i `aes`. Należy przygotować dane i wykonać odpowiednie kroki, aby uzyskać oczekiwany efekt. W tym celu należy skorzystać z funkcji `ggplot` i `aes`.

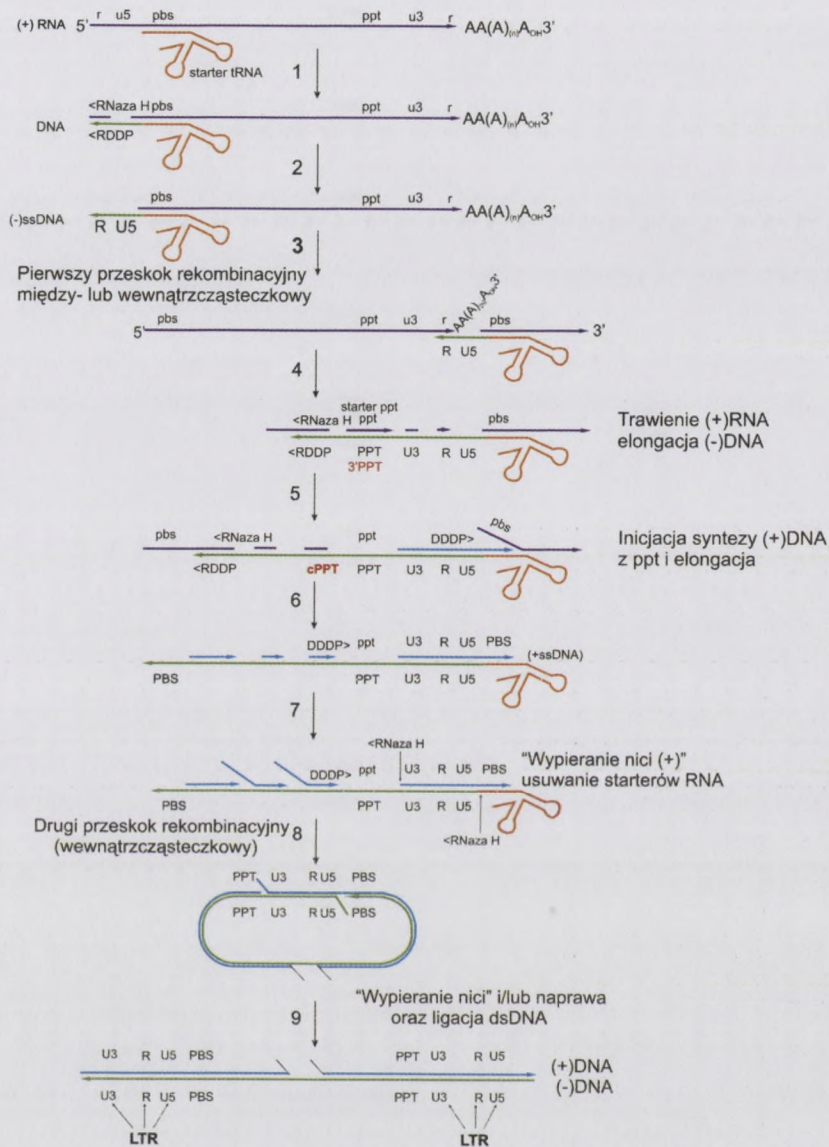
W tym celu należy skorzystać z funkcji `ggplot` i `aes`. Należy przygotować dane i wykonać odpowiednie kroki, aby uzyskać oczekiwany efekt. W tym celu należy skorzystać z funkcji `ggplot` i `aes`.

W tym celu należy skorzystać z funkcji `ggplot` i `aes`. Należy przygotować dane i wykonać odpowiednie kroki, aby uzyskać oczekiwany efekt. W tym celu należy skorzystać z funkcji `ggplot` i `aes`.

2.2.1 Odwrotna transkryptaza

Odwrotne transkryptazy katalizują proces syntezy DNA na matrycy RNA lub DNA. Do rozpoczęcia reakcji wymagana jest obecność startera (ssDNA lub ssRNA), ponieważ nie potrafią one inicjować syntezy *de novo*. Na podstawie badań strukturalnych stwierdzono, że wszystkie polimerazy, pomimo różnic w sekwencji aminokwasowej, charakteryzują się podobną budową przestrzenną [91]. Domena polimerazowa strukturą trzeciorzędową przypomina prawą dłoń, stąd tworzące ją poddomeny nazwane zostały: kciukiem (ang. *thumb*), dłonią (ang. *palm*) i palcami (ang. *fingers*). Oprócz aktywności polimerazowej, RT posiadają także aktywność RNazy H, która pozwala na rozpoznanie heterodupleksów RNA/DNA i specyficzne trawienie nici RNA.

Podstawową funkcją HIV-1 RT jest przepisanie jednoniciowego genomowego RNA na prowirusowy dsDNA. Proces ten schematycznie przedstawiono na Rysunku 3.



Rysunek 3. Proces odwrotnej transkrypcji wirusa HIV-1.

W każdej części wirusowej obecne są dwa identyczne lub prawie identyczne genomowe (+)RNA. Genomowe RNA syntetyzowane są przez komórkową polimerazę RNA II, dlatego posiadają strukturę kapu (*ang. cap*) na końcu 5' oraz ogon poli(A) na końcu 3'. Ponadto na obu końcach genomowego RNA obecne są rejon identycznych powtórzeń (r). Małymi literami oznaczono sekwencje obecne w genomowym RNA (fioletowe linie), dużymi - w potomnym dsDNA (zielone linie). Synteza (-)DNA rozpoczyna się w pobliżu końca 5' cząsteczki genomowej hybridyzacją tRNA^{Lys3} do miejsca wiążącego starter (pbs).

Etapy odwrotnej transkrypcji: 1) Synteza nici potomnej (-)DNA w kierunku 5' genomowego (+)RNA oraz powstanie pierwszego produktu (-) s-s DNA w wyniku zatrzymania RT na końcu matrycy. 2) Usunięcie RNA w nowopowstałym hybrydzie RNA/DNA przez RNazę H, w rezultacie powstaje jednoniciowy DNA. 3) Nowopowstały produkt zostaje przeniesiony na koniec 3' tej samej lub homologicznej cząsteczki genomowej. Jest to możliwe dzięki obecności rejonów identycznych powtórzeń (r) na obu końcach genomu. 4) Kontynuacja syntezy (-)DNA na matrycy (+)RNA (RDDP – *ang. RNA-dependent DNA polymerization*), tworzenie starterów ppt do syntezy (+)DNA na matrycy (-)DNA (DDDP – *ang. DNA-dependent DNA polymerization*). 5) Dalsza synteza (-)DNA oraz usuwanie RNA przez RNazę H. 6) Powstawanie dodatkowych starterów do rozpoczęcia syntezy (+)DNA, w przypadku HIV-1 synteza nici (+)DNA odbywa się z dwóch starterów: cPPT oraz 3'PPT. 7) Zatrzymanie syntezy (+)DNA po skopiowaniu sekwencji startera (PBS) oraz powstanie (+) s-s DNA w wyniku zatrzymania RT na końcu matrycy. Usunięcie tRNA przez RNazę H. 8) Sekwencje PBS umożliwiają drugi przeskok RT oraz kontynuację syntezy DNA. 9) Kopiowanie rejonu U3-R-U5 dzięki zdolności RT do tzw. „wypierania nici” i tworzenie liniowej, prowirusowej cząsteczki, posiadającej wydłużone końce (LTRs – *ang. long terminal repeats*) w porównaniu z cząsteczką genomową. Brak ciągłości (+)DNA, wynikający z zapoczątkowania jego syntezy z więcej niż jednego startera, jest najprawdopodobniej usuwany przez komórkowe enzymy gospodarza.



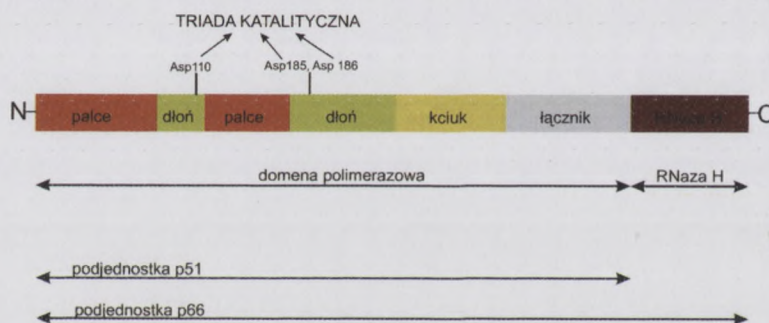
Rysunek 1. Proces odwrotnej transkrypcji wirusa HIV-1.

W celu zapewnienia sobie przetrwania i rozmnożenia, wirus HIV musi najpierw przetrwać wewnątrz komórki gospodarza. Wirus HIV posiada dwa kopie genomu dwuniciowego RNA. Po wniknięciu do komórki gospodarza, wirus HIV musi najpierw uwolnić swój genom dwuniciowy RNA z otoczenia wirusowego. Następnie, w celu przetrwania i rozmnożenia, wirus HIV musi najpierw uwolnić swój genom dwuniciowy RNA z otoczenia wirusowego. Następnie, w celu przetrwania i rozmnożenia, wirus HIV musi najpierw uwolnić swój genom dwuniciowy RNA z otoczenia wirusowego.

Proces odwrotnej transkrypcji (RT) rozpoczyna się od przyłączenia się do genomu dwuniciowego RNA. Następnie, w celu przetrwania i rozmnożenia, wirus HIV musi najpierw uwolnić swój genom dwuniciowy RNA z otoczenia wirusowego. Następnie, w celu przetrwania i rozmnożenia, wirus HIV musi najpierw uwolnić swój genom dwuniciowy RNA z otoczenia wirusowego. Następnie, w celu przetrwania i rozmnożenia, wirus HIV musi najpierw uwolnić swój genom dwuniciowy RNA z otoczenia wirusowego.

2.2.1.1 Budowa HIV-1 RT

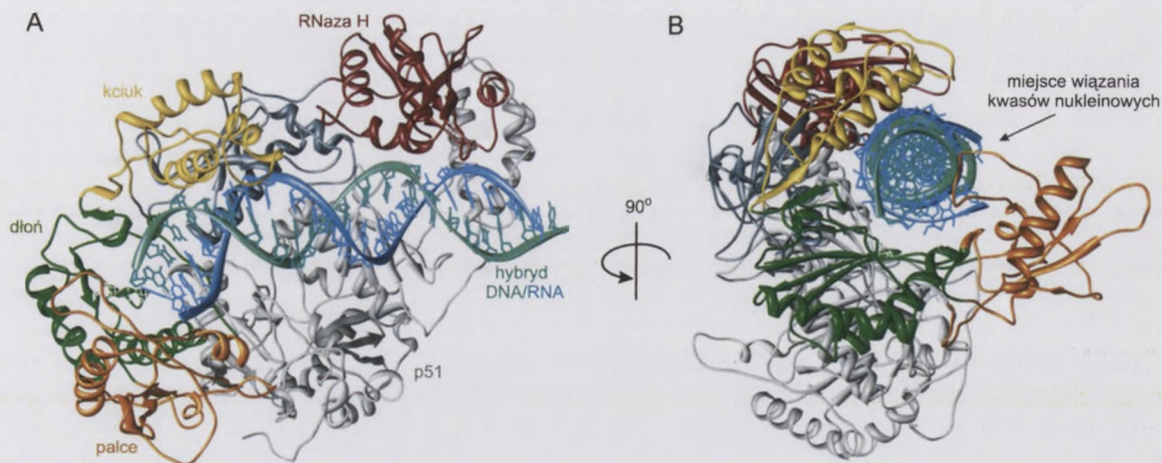
Odwrotna transkryptaza wirusa HIV-1 (HIV-1 RT) jest heterodimerem zbudowanym z dwóch podjednostek o masie cząsteczkowej odpowiednio: 66 kDa i 51 kDa (oznaczanych p66 i p51). Enzym powstaje z poliproteiny Gag-Pol ($\text{Pr160}^{\text{gag-pol}}$) podczas tworzenia wirionów potomnych. Proces ten katalizuje wirusowa proteaza. Początkowo z poliproteiny wycinane są podjednostki p66 (zbudowane z 560 aminokwasów), które tworzą homodimery. Po odcięciu 120 aminokwasów z końca karboksylowego jednej z podjednostek powstaje heterodimer p66/p51. Domenę polimerazową tworzy 440 aminokwasów z końca aminowego p66, a domenę RNazy H ostatnich 120 aminokwasów. p51 odpowiada więc domenie polimerazowej podjednostki p66. Heterodimer p66/p51 i homodimer p66/p66 posiadają aktywność polimerazową i RNazową. Homodimer p51/p51 nie jest aktywny [92, 93]. Na Rysunku 4 przedstawiono schematycznie budowę poszczególnych podjednostek HIV-1 RT.



Rysunek 4. Schematyczne przedstawienie budowy HIV-1 RT.

HIV-1 RT powstaje z poliproteiny Gag-Pol w reakcji katalizowanej przez wirusową proteazę. Początkowo powstaje homodimer p66/p66, następnie wirusowa proteaza odcina domenę RNazy H w jednej z podjednostek. W ten sposób powstaje heterodimer p66/p51. Trzeciorzędowa struktura domeny polimerazowej p66 przypomina prawą dłoń, dlatego jej poszczególne poddomeny zostały nazwane: palcami (pomarańczowe), dłonią (zielone) oraz kciukiem (żółty). Domena polimerazowa połączona jest z domeną RNazy H (brązowa) przy pomocy poddomeny łącznika (szary). Zaznaczone reszty aminokwasowe, Asp110, Asp185, Asp186, tworzą tryadę katalityczną.

Podjednostki p66 oraz p51 ułożone są względem siebie w orientacji „głowa do ogona”. Domena polimerazowa ma wymiary $110 \times 30 \times 45 \text{ \AA}$ (Rysunek 5). Chociaż obie podjednostki p66 i p51 zawierają poddomeny: palców (reszty 1-85, 118-155), dłoni (reszty 86-117, 156-237), kciuka (238-318) oraz łącznika (319-426), ich przestrzenne ułożenie jest różne. Dodatkowo w podjednostce p66 wyróżniamy domenę RNazy H, zbudowaną przez reszty aminokwasowe 427-560 [94]. Centra aktywności polimerazowej i nukleazowej odwrotnej transkryptazy są zlokalizowane na dwóch końcach cząsteczki. Dzielący je dystans odpowiada długości osiemnastonukleotydowego dupleksu RNA/DNA [95]. Stwierdzono, że obie aktywności RT są od siebie zależne, mutacje w domenie polimerazowej mogą wpływać na aktywność nukleazową i odwrotnie.



Rysunek 5. Struktura krystaliczna odwrotnej transkryptazy wirusa HIV-1.

Struktura pokazana została w dwóch rzutach:

A. Poddomeny palców, dłoni, kciuka oraz łącznika domeny polimerazowej podjednostki p66. Podjednostkę p51 HIV-1 RT zaznaczono na szaro.

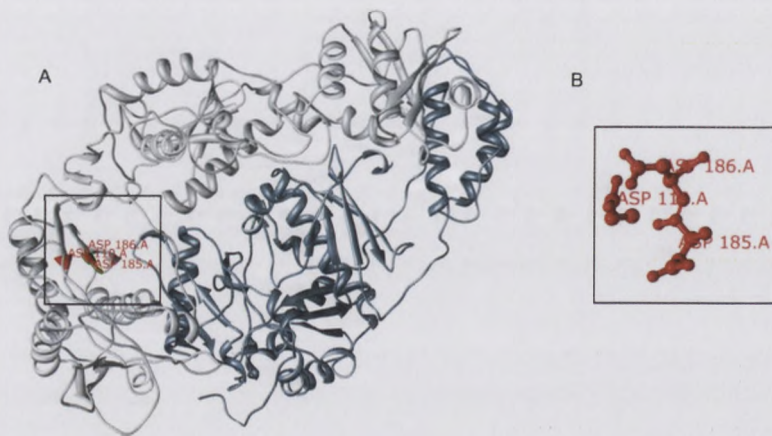
B. Szczelina wiążąca kwasy nukleinowe.

Rysunek wykonano w oparciu o dane krystalograficzne z Protein Data Bank (PDB), kod: 1HYS, [<http://www.rcsb.org/pdb/>].

2.2.1.1.1 Domena polimerazowa HIV-1 RT

Badania krystalograficzne wykazały, iż podczas syntezy DNA kompleks matryca:starter wiąże się do dużej szczeliny tworzonej przez palce, dłoni i kciuk podjednostki p66. Znaczną część podstawy szczeliny tworzy poddomena łącznikowa p66 i p51, a także kciuk p51. Stwierdzono, że tylko kilka reszt aminokwasowych tych poddomen jest bezpośrednio zaangażowanych w tworzenie wiązań z DNA lub RNA i tak: arkusz $\beta 18$ p66 oddziałuje z matrycą i starterem, helisa αL p51 ze starterem, a arkusz $\beta 20$ p51 z nicią matrycową. Są to najprawdopodobniej jedyne miejsca oddziaływania podjednostki p51 z kwasem nukleinowym.

Poddomena dłoni p66 zawiera miejsce aktywne polimerazy, zlokalizowane są tam reszty aminokwasowe Tyr183-Met184-Asp185-Asp186. Są one wysoce konserwatywne we wszystkich polimerazach DNA. Do aktywności katalitycznej wymagana jest także Asp110, która razem z Asp185 i Asp186 tworzy triadę katalityczną (Rysunek 6). Dwie helisy α podjednostki p66, znajdujące się w poddomenie kciuka i dłoni, stanowią zawias starterowy zapewniający właściwe usytuowanie kompleksu matryca:starter w miejscu aktywnym enzymu. Dzięki temu grupa 3'-OH startera znajduje się w pobliżu triady katalitycznej Asp110-Asp185-Asp186 i jest gotowa do ataku nukleofilowego na atom fosforu α przyłączanego trójfosforanu deoksynukleozydowego [95].



Rysunek 6. Triada katalityczna HIV-1 RT.

A. Struktura krystalograficzna HIV-1 RT z zaznaczoną triadą katalityczną. Tworzą ją aminokwasy Asp110-Asp185-Asp186.

B. Triada katalityczna.

Rysunek wykonano w oparciu o dane krystalograficzne z Protein Data Bank (PDB), kod: 1HYS, [<http://www.rcsb.org/pdb/>].

Struktura nazwana zawiasem matrycowym składa się z reszt aminokwasowych, które wchodzi w skład poddomen dłoni i palców podjednostki p66 i oddziałują z nukleotydami nici matrycowej. Aminokwasy te usytuowane są w arkuszu $\beta 4$ i helisie αB poddomeny palców, arkuszu $\beta 8$, helisie αE pętli łączącej i arkuszu $\beta 5a$ poddomeny dłoni. Szczególnie istotne wydają się być reszty aminokwasowe poddomeny palców, które odpowiedzialne są najprawdopodobniej za odpowiednie usytuowanie matrycy podczas procesu syntezy łańcucha DNA. Pełnią one również bardzo istotne funkcje w wiernym powielaniu cząsteczki matrycowej. Wykazano, że poddomena dłoni zamyka się, gdy wszystkie substraty niezbędne do utworzenia kolejnego wiązania międzynukleotydowego są związane z miejscem aktywnym. Zmiana konformacyjna wywołana przyłączeniem substratów powoduje zbliżenie uczestniczących w katalizie reszt Asp do grupy 3'-OH startera. [91].

Najbardziej elastycznym elementem struktury HIV-1 RT jest poddomena kciuka podjednostki p66, która w zależności od obecności lub braku substratu może być bardziej lub mniej odgięta. Poddomena ta zbudowana jest z wiązki helis. Stwierdzono, że helisa αH oddziałuje ze szkieletem cukrowo-fosforanowym startera, a antyrównoległa helisa αI ze szkieletem nici matrycowej. Helisy te uczestniczą najprawdopodobniej w translokacji kompleksu matryca – starter [95]. Rejony otaczające miejsce aktywne polimerazy wykazują podobieństwa do rejonów konserwatywnych występujących w polimerazach, a w szczególności do fragmentu Klenowa polimerazy I DNA z *E. coli* [96].

W porównaniu z pozycją zajmowaną w podjednostce p66, kciuk p51 jest nieco odsunięty od dłoni i oddziałuje z domeną RNazy H. Poddomena łącznika p51 związa się w kierunku poddomeny dłoni między poddomenami palców i kciuka, co powoduje, że w p51

1987

Journal of the American Medical Association

Volume 257, Number 12, December 8, 1987

Pages 1600-1700

Editorial: The Role of the General Practitioner in the Management of the Elderly Patient

Management of the Elderly Patient with Depression

Richard A. Grune, MD, and Robert M. G. Rothenberger, MD

Depression in the elderly is a common and often overlooked condition. It is characterized by a persistent feeling of sadness and loss of interest in activities that were once enjoyed. The symptoms of depression in the elderly are similar to those in younger adults, but the presentation and course may differ.

Depression in the elderly is often associated with physical illness, particularly chronic conditions such as heart disease, diabetes, and arthritis. The physical illness may contribute to the development of depression, and the depression may, in turn, worsen the physical illness.

The diagnosis of depression in the elderly is often difficult because the symptoms may be attributed to the physical illness or to the normal aging process. A thorough history and physical examination, as well as a careful review of the patient's medical history, are essential for an accurate diagnosis.

The management of depression in the elderly is often challenging because of the patient's physical condition and the potential for drug interactions. A combination of psychotherapy and antidepressant medication is often the most effective approach.

Psychotherapy, such as cognitive-behavioral therapy, can help the elderly patient to identify and change negative thought patterns and behaviors. Antidepressant medication, such as tricyclic antidepressants or selective serotonin reuptake inhibitors, can also be effective in treating depression in the elderly.

It is important to monitor the elderly patient closely during treatment, particularly for side effects and drug interactions. Regular follow-up visits are essential to ensure that the patient is responding to treatment and to adjust the treatment plan as needed.

In conclusion, depression in the elderly is a common and often overlooked condition. It is characterized by a persistent feeling of sadness and loss of interest in activities that were once enjoyed. The symptoms of depression in the elderly are similar to those in younger adults, but the presentation and course may differ.

The diagnosis of depression in the elderly is often difficult because the symptoms may be attributed to the physical illness or to the normal aging process. A thorough history and physical examination, as well as a careful review of the patient's medical history, are essential for an accurate diagnosis.

The management of depression in the elderly is often challenging because of the patient's physical condition and the potential for drug interactions. A combination of psychotherapy and antidepressant medication is often the most effective approach.

Psychotherapy, such as cognitive-behavioral therapy, can help the elderly patient to identify and change negative thought patterns and behaviors. Antidepressant medication, such as tricyclic antidepressants or selective serotonin reuptake inhibitors, can also be effective in treating depression in the elderly.

It is important to monitor the elderly patient closely during treatment, particularly for side effects and drug interactions. Regular follow-up visits are essential to ensure that the patient is responding to treatment and to adjust the treatment plan as needed.

In conclusion, depression in the elderly is a common and often overlooked condition. It is characterized by a persistent feeling of sadness and loss of interest in activities that were once enjoyed. The symptoms of depression in the elderly are similar to those in younger adults, but the presentation and course may differ.

The diagnosis of depression in the elderly is often difficult because the symptoms may be attributed to the physical illness or to the normal aging process. A thorough history and physical examination, as well as a careful review of the patient's medical history, are essential for an accurate diagnosis.

The management of depression in the elderly is often challenging because of the patient's physical condition and the potential for drug interactions. A combination of psychotherapy and antidepressant medication is often the most effective approach.

Psychotherapy, such as cognitive-behavioral therapy, can help the elderly patient to identify and change negative thought patterns and behaviors. Antidepressant medication, such as tricyclic antidepressants or selective serotonin reuptake inhibitors, can also be effective in treating depression in the elderly.

It is important to monitor the elderly patient closely during treatment, particularly for side effects and drug interactions. Regular follow-up visits are essential to ensure that the patient is responding to treatment and to adjust the treatment plan as needed.

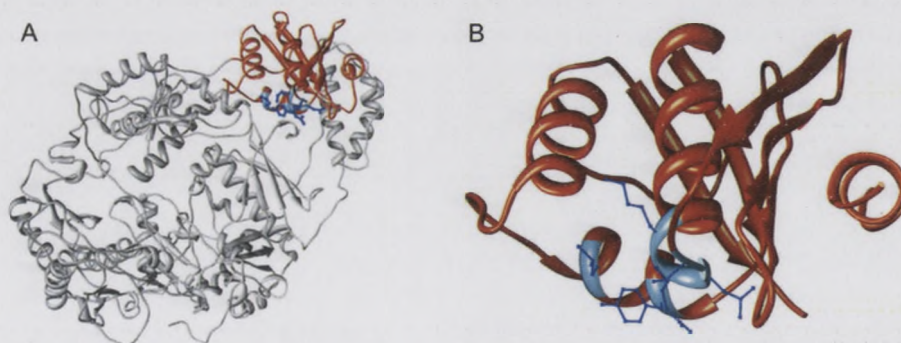
In conclusion, depression in the elderly is a common and often overlooked condition. It is characterized by a persistent feeling of sadness and loss of interest in activities that were once enjoyed. The symptoms of depression in the elderly are similar to those in younger adults, but the presentation and course may differ.

nie występuje szczelina wiążąca kwasy nukleinowe. W rezultacie podjednostka p51 pozbawiona jest aktywności polimerazowej [95].

W centrum aktywnym HIV-1 RT (p66) dwie konserwatywne reszty Asp poddomeny dłoni koordynują dwa kationy Mg^{2+} . Jeden z kationów oddziałuje z wszystkimi trzema grupami fosforanowymi (α , β , γ) nadchodzącego trójfosforanu deoksynukleotydowego, drugi tylko z grupą fosforanową α oraz z grupą 3' hydroksylową startera. W ten sposób kationy Mg^{2+} aktywując koniec 3'-OH startera, przygotowują go do nukleofilowego ataku na atom fosforu α przyłączanego deoksynukleotydu oraz stabilizują powstający pirofosforan [91]. Wiązanie innych kationów dwuwartościowych niż Mg^{2+} (np. Mn^{2+}) do centrum katalitycznego polimerazy powoduje osłabienie selektywności procesu syntezy DNA [97].

2.2.1.1.2 Domena nukleazowa HIV-1 RT

RNaza H jest enzymem, który selektywnie degraduje nić RNA w obrębie hybrydów RNA/DNA. Przyjmuje taką samą strukturę niezależnie od tego czy występuje jako poddomena, czy jako odrębne białko [94, 95, 98, 99]. Wyróżniono w niej centralną strukturę arkusza β (utworzoną z pięciu nici) otoczoną przez 4 helisy i 8 pętli łączących (Rysunek 7). W centrum aktywnym znajdują się trzy wysoce konserwatywne aminokwasy Asp443, Glu478 i Asp498. Mutacja któregokolwiek z tych aminokwasów znosi aktywność enzymu. RNaza H do aktywności enzymatycznej wymaga obecności dwuwartościowych kationów metali (Mg^{2+} lub Mn^{2+}). W przeciwieństwie jednak do RNazy H pochodzącej z *E. coli*, RNaza H odwrotnej transkryptazy HIV-1 wiąże w centrum aktywnym dwa jony metalu, które są koordynowane przez reszty Asp443, Glu478, Asp498 i Asp 549 [100]. Deprotonacja cząsteczki wody prowadzi do utworzenia nukleofilowej grupy hydroksylowej, która atakuje grupę fosforanową RNA.



Rysunek 7. Struktura krystaliczna domeny RNazy H odwrotnej transkryptazy wirusa HIV-1.

A. HIV-1 RT z zaznaczoną domeną RNazy H.

B. Domena RNazy H.

Na niebiesko zaznaczono konserwatywne aminokwasy istotne w kontroli toru przesuwania matrycy.

Rysunek wykonano w oparciu o dane krystalograficzne z Protein Data Bank (PDB), kod: 1HYS, [<http://www.rcsb.org/pdb/>].

W domenie RNazy H zidentyfikowano rejon oddziaływania ze starterem RNA. Aminokwasami istotnymi w kontroli toru przesuwania się matrycy RNA do miejsca katalitycznego domeny nukleazowej są Thr473-Asn474-Gln475-Lys476, a także Tyr501 i Ile505 [101] (Rysunek 7B). Wykazano, że są one konserwatywne także u innych retrowirusowych i bakteryjnych RNaz H, a mutacje w tym rejonie prowadzą do obniżenia aktywności enzymu.

Odwrotna transkryptaza wirusa HIV-1 wykazuje dużą wewnętrzną elastyczność konformacyjną, która jest niezbędna dla prawidłowego funkcjonowania zarówno domeny polimerazowej, jak i nukleazowej. Ruchy domeny RNazy H ułatwiają otwieranie i zamykanie szczeliny wiążącej.

2.2.2 Dicer

Enzymy należące do rodziny RNaz III to endorybonukleazy, które specyficznie tną dwuniciowe cząsteczki RNA. Wszystkie enzymy należące do tej rodziny charakteryzuje obecność domeny rybonukleazowej, zwyczajowo zwanej domeną RNazy III. W wyniku jej działania powstają specyficzne produkty posiadające na końcu 5' grupę fosforanową i dwa niesparowane nukleotydy na końcu 3'. RNazy III różnią się wielkością, mają od 200 – 2000 aminokwasów. Podzielono je na trzy klasy.

RNazy klasy 1 są najmniejsze i mają najprostszą budowę. Posiadają jedną domenę RNazy III i jedną domenę wiążącą dwuniciowy RNA – dsRBD (ang. *double-stranded RNA binding domain*). Tego typu białka są kodowane przez bakterie, grzyby i bakteriofagi. U *E. coli* RNaza III pełni istotną rolę w obróbce prekursorów rRNA (pre-rRNA) i regulacji translacji, oddziałując z mRNA. Enzymy należące do klasy 1 funkcjonują jako homodimery. Stwierdzono, że dwie domeny rybonukleazowe oddziałują ze sobą i tworzą jedno centrum aktywne, w którym każda domena hydrolizuje jedną z nici dupleksu RNA [102].

Drosha reprezentuje klasę 2 RNaz III. Jest to enzym zaangażowany w obróbkę ludzkich pre-rRNA, odgrywa również bardzo istotną rolę w dojrzewaniu miRNA. Prekursorami miRNA są długie transkrypty, zwane pri-miRNA, w obrębie których występują struktury szpilki do włosów. Drosha wycina z nich pojedyncze struktury spinkowe, tzw. pre-miRNA [103]. Do tej pory nie poznano struktury rybonukleazy Drosha, ani żadnego blisko z nią spokrewnionego białka. Na podstawie danych uzyskanych z doświadczeń biochemicznych stwierdzono, że Drosha funkcjonuje jako monomer, w którym występują dwie domeny rybonukleazowe [104].

Klasa 3 RNaz III reprezentowana jest przez rybonukleazę Dicer. Trawi ona dwuniciowe dsRNA na krótsze, 19-27-nukleotydowe dupleksy. Krótkie RNA generowane przez Dicer służą jako sondy pozwalające odnaleźć docelowe mRNA. W 2006 roku opisano strukturę krystaliczną rybonukleazy Dicer pochodzącej z ludzkiego pasożyta *Giardia intestinalis* [105]. Organizm ten jako jeden z pierwszych w ewolucji oddzielił się od członków królestwa eukariotycznego. Przypuszcza się więc, że pierwotnie wszystkie organizmy posiadały bardzo proste w budowie enzymy Diceropodobne, zbliżone do rybonukleazy występującej u *G. intestinalis*.

2.2.2.1 Budowa rybonukleazy Dicer pochodzącej z *G. intestinalis*

Dicer pochodząca z *G. intestinalis* posiada domenę PAZ i dwie domeny RNazy III. Tworzy wydłużoną strukturę o długości 100 Å i szerokości 30-50 Å (Rysunek 8).

2.2.2 Dicer

Enzymy należące do rodziny RNaz III to endonukleazy, które specyficznie na dwuniciowe cząsteczki RNA. Wszystkie czynniki należące do tej rodziny charakteryzują się obecnością domeny typonukleazowej, zwanej domeną RNazy III. W wyniku jej działania powstają specyficzne produkty posiadające na końcu 3' RNazy III rotnia się wzdłuż, mają od 200 – 3000 nieparzystych nukleotydów na końcu 3'. RNazy III rotnia się wzdłuż, mają od 200 – 3000 aminokwasów. Podział jest na trzy klasy.

RNazy klasy I są najstarsze i mają najprostszą budowę. Posiadają jeden domenę RNazy III i jedną domenę wiążącą dwuniciowy RNA – dsRBD (ang. double-stranded RNA binding domain). Też typy białek są kodowane przez białka grupy 1 i białka grupy 2. U E. coli RNaza III pełni istotną rolę w obronie przed wirusami (pr-vRNA) i regulacji nasilonej ekspresji z mRNA. Enzymy należące do klasy I funkcjonują jako homodimery. Związkiem, że dwie domeny typonukleazowe oddziałują ze sobą i tworzą jedną całość. W krótkim kłucie domenę typonukleazową jedną z nich duplikacja RNA [102].

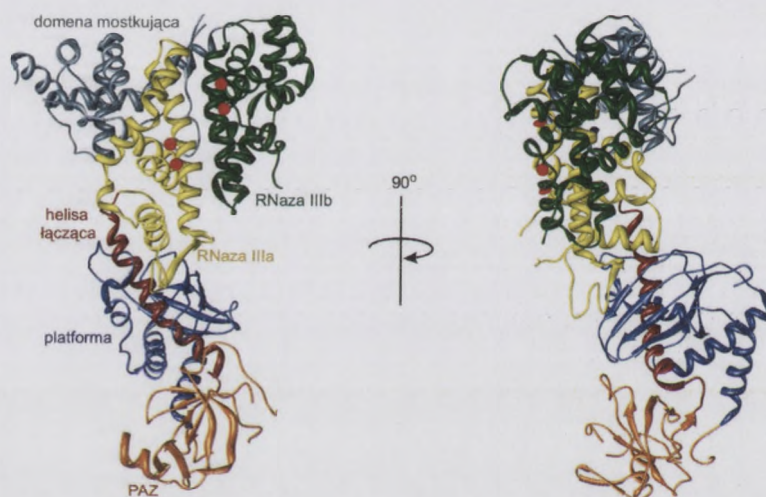
Dziana reprezentująca klasę 2 RNazy III jest to czynnik zaangażowany w obronie przed pr-vRNA, odgrywa również bardzo istotną rolę w dojrzewaniu miRNA. Różni się od RNazy III o długości 1000-1500, zwanej pr-miRNA, w obszarze końcówki występującej struktury szpiczastej do wstępu. Dziana wykona z nich podobnyce struktury szpiczaste, tzw. pr-miRNA [103]. Do tej grupy nie pozostaje struktury typonukleazowej Dicer, ani żadnego białka z nią powiązanego. Nie posiada białek w obszarze białek z doświadczeń biochemicznych. Wskazano, że Dicer funkcjonuje jako koenzym, w którym występują dwie domeny typonukleazowe [104].

Klasa 3 RNazy III reprezentowana jest przez typonukleazę Dicer. Tęż ma dwuniciową dimerową budowę. 19-27-nukleotydowe duplikaty. Koduje białko generowane przez Dicer jest jako sondy pozwalające określić doświadczenia miRNA. W 2006 roku opisano struktury krystaliczne typonukleazy Dicer pochodzącej z ludzkiego państwa Götterle wstępu [105]. Organizm ten jako jeden z pierwszych w ewolucji oddzielił się od członków protostaw eukariotycznego. Przynajmniej się więc, że pierwotnie występował organizm posiadający bardzo prostą w budowie enzymy Diceropodobne, zdolne do typonukleazy występującej u G. intestinalis.

2.2.2.1 Budowa typonukleazy Dicer pochodzącej z G. intestinalis

Dicer pochodzący z G. intestinalis posiada domenę PAZ i dwie domeny RNazy III. Tworzy wybitnie struktury o długości 100 Å i szerokości 30-50 Å (rysunek 8).

W przeciwieństwie do endorybonukleaz klasy 1, enzym ten funkcjonuje jako monomer posiadający dwie domeny RNazy III, które asocjują ze sobą tworząc centrum katalityczne. Kształtem Dicer przypomina topór (ang. *hatchet*), gdzie domeny RNazowe tworzą ostrze, a domena PAZ podstawę uchwytu. PAZ jest połączona z domenami RNaz za pomocą długiej helisy α , zwanej helisą łączącą (ang. *connector helix*), która biegnie wzdłuż uchwytu struktury topora. Helisa łącząca jest otoczona przez domenę platformy (ang. *platform domain*) zbudowaną z antyrównoległych arkuszy β i trzech helis α . Duża domena mostkująca (ang. *bridging domain*) łączy dwie domeny RNazy III i tworzy tylną część ostrza topora (obuch) [105].



Rysunek 8. Struktura krystaliczna rybonukleazy Dicer pochodzącej z *G. intestinalis*.

Na rysunku przedstawione jest położenie domeny PAZ (pomarańczowy), domen RNazy IIIa (żółty) i IIIb (zielony), a także platformy (granatowy), helisy łączącej (czerwony) i domeny mostkującej (szary). Struktura pokazana została w dwóch rzutach. Rysunek wykonano w oparciu o dane krystalograficzne z Protein Data Bank (PDB), kod: 2 FFL [<http://www.rcsb.org/pdb/>].

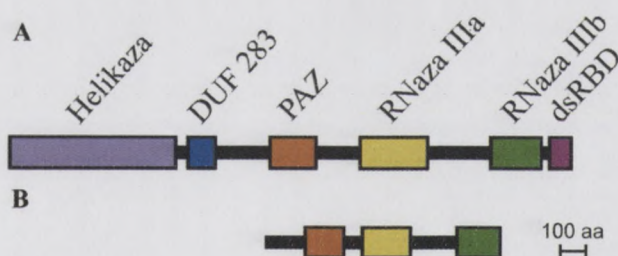
Na podstawie wstępnych badań sugerowano istnienie jednego miejsca wiązania jonu metalu w każdej domenie RNazowej. Dokładne analizy krystalograficzne pozwoliły na identyfikację dwóch takich miejsc – M1 i M2 [105]. M1 znajduje się między czterema wysoce konserwatywnymi kwaśnymi aminokwasowymi (Glu40, Asp44, Asp107, Glu110), co odpowiada wcześniej zidentyfikowanym miejscom wiązania Mn^{2+} w bakteryjnych RNazach III. Drugie miejsce wiązania M2 znajduje się w pobliżu pierwszego, lecz poza grupą kwaśnych aminokwasów. Dystans pomiędzy M1 i M2 w domenach RIIIa i RIIIb wynosi odpowiednio około 4.2 Å i 5.5 Å. Natomiast miejsca wiązania jonów metali w poszczególnych domenach oddziela przestrzeń długości około 17.5 Å, co odpowiada szerokości brzozy, w której wiązany jest dwuniciowy RNA [105].

PAZ (ang. *Pinwheel-Argonaute-Zwille*) jest to domena wiążąca RNA zidentyfikowana u rybonukleaz Dicer i białek należących do rodziny Argonaute, wchodzących w skład

kompleksu RISC. W ramach wcześniejszych badań, w domenie PAZ zidentyfikowano motyw wiążący oligonukleotydy/oligosacharydy (ang. *oligonucleotide/oligosaccharide-binding fold*), który specyficznie rozpoznaje dsRNA zawierające niesparowane nukleotydy na końcu 3' [106]. Stwierdzono, że domena PAZ oddziałuje bezpośrednio z grupami 2'-OH rybozy, co sugeruje, że może odróżniać cząsteczki RNA od DNA [107]. Istotne funkcje w wiązaniu PAZ pełni najprawdopodobniej także monofosforan znajdujący się na końcu 5' dsRNA. Nałożenie na siebie struktur domen PAZ pochodzących z rybonukleazy Dicer *G. intestinalis* i ludzkiego białka Argonaute1 ujawniło, że charakteryzuje je bardzo podobny skręt, a także obecność kieszeni wiążącej dwa niesparowane nukleotydy na końcu dupletu RNA. W domenie PAZ rybonukleazy Dicer zidentyfikowano konserwatywną wydłużoną pętlę, która nie występuje u białek z rodziny Argonaute. Obecność dodatkowej pętli zbudowanej z aminokwasów zasadowych drastycznie zmienia potencjał elektrostatyczny w jej otoczeniu. Sugeruje się, że może to mieć wpływ na rozpoznawanie RNA [105]. Domena PAZ jest prawdopodobnie także miejscem oddziaływań z białkami z rodziny Argonaute na dalszych etapach procesu RNAi [108-110].

2.2.2.2 Funkcje dodatkowych domen rybonukleazy Dicer

Struktura rybonukleazy z *G. intestinalis* reprezentuje najprawdopodobniej trzon wspólny dla wszystkich enzymów typu Dicer. To małe i stosunkowo proste białko jest w pełni aktywne i zdolne do cięcia dsRNA *in vitro* i *in vivo*. Jednakże u wyższych eukariontów rybonukleaza Dicer posiada kilka dodatkowych domen (Rysunek 9).



Rysunek 9. Domeny rybonukleazy Dicer ludzkiej (A) i pochodzącej z *G. Intestinalis* (B).

Rybonukleaza Dicer pochodząca z *Giardia intestinalis* posiada 3 domeny wspólne z ludzką Dicer – PAZ, RNazy IIIa i IIIb. Ludzka Dicer posiada dodatkowo domenę helikazową, domenę o nieznanym –DUF 283 i domenę wiążącą dwuniciowy RNA.

Jedną z nich jest helikazowa domena DExD (typu DExH/DEAH box), zlokalizowana przy końcu N Dicer występującej u ssaków, insektów, nicieni, roślin i grzybów. Pomimo wysokiej konserwatywności tej domeny, jak dotąd nie udało się poznać jej funkcji.

kompleks RISC. W ramach wcześniejszych badań, w domenie PAX zidentyfikowano motyw wiążący oligonukleotydowy (ang. oligonucleotide-binding fold). Motyw specyficznie rozpoznaje dsRNA zawierając nieparzyste nukleotydy na końcu 3' [108]. Stwierdzono, że domena PAX oddziałuje bezpośrednio z grupami 2'-OH tykozy, co sugeruje, że może katalizować cząstkę RNA od DNA [107]. Istotne funkcje w witaminie PAX pełni najprawdopodobniej także motywowa znajdująca się na końcu 5' dsRNA. Należy tu także wskazać domena PAX pochodzących z tykozylary Dicer G. Należy tu także i bliźnię bliźni Argonauci, które charakteryzują je bardzo podobny skład i obecność bliźni wiążący dwa nieparzyste nukleotydy na końcu dupletu RNA. W domenie PAX tykozylary Dicer zidentyfikowano konserwatywną wydłużoną pętlę, która nie występuje u bliźni z rodziny Argonauci. Obecność dodatkowej pętli zbudowanej z aminokwasów zasadowych charakteryzuje aminia początek bliźni w jej odczynie. Sugeruje się, że może to mieć wpływ na rozpoznawanie RNA [107]. Domena PAX jest prawdopodobnie także miejscem oddziaływania z białkami rodziny Argonauci, na przykład z białkiem Rps27A [108-110].

3.2.2.2. Funkcje dodatkowych domen tykozylary Dicer

Struktura tykozylary z G. Należy tu także i konserwatywną najprawdopodobniej trzon wspólny dla wszystkich enzymów typu Dicer. To trzon i stanowiąc prosty białko jest w pełni aktywne i zdolne do cięcia dsRNA *in vitro* i *in vivo*. Jednakże u wyższych eukariotów tykozylary Dicer posiada kilka dodatkowych domen (Rysunek 5).



Rysunek 5. Domeny tykozylary Dicer (A) i pochodzący z G. Należy tu także i konserwatywną trzon wspólny dla wszystkich enzymów typu Dicer - PAX, RNase IIIa i IIIb. Wykazuje sekwencję domen: DUT-20, PAX, RNase IIIb, RNase IIIa, DUT-21. DUT-20 i DUT-21 to domeny wiążące dsRNA, a RNase IIIa i IIIb to domeny katalizujące cięcie dsRNA.

Jedną z nich jest białkowa domena DEXD (typu DEXH/DEAH box), zlokalizowana przy końcu N Dicer występująca u ssaków, inseków, roślin i grzybów. Pomimo wysokiej konserwatywności tej domeny, jak dotąd nie udało się poznać jej funkcji.

Zidentyfikowano w niej siedem motywów charakterystycznych dla rodziny II helikaz [111, 112]. Na podstawie badań analogicznych białek ustalono, że motyw I zaangażowany jest w wiązanie ATP, motywy II i VI w hydrolizę ATP, a motyw III w rozplatanie RNA [113]. Sugeruje się więc, że domena DExD może rozwijać dupleksy siRNA, przemieszczać enzym wzdłuż dwuniciowego substratu, a także ułatwiać przekazywanie substratów i/lub produktów innym komponentom ścieżki RNAi. Usunięcie domeny helikazy nie wpływa znacząco na stabilność enzymu, sugerując, że struktura rdzenia rybonukleazy nie jest zaburzona. Taka skrócona wersja Dicer wykazuje aktywność porównywalną z dzikim typem białka w testach *in vitro*, w obecności i przy braku ATP. Zakłada się, iż domena helikazowa ułatwia funkcjonowanie enzymu *in vivo* [114]. Według tego modelu, dsRNA będący substratem dla rybonukleazy Dicer jest związany z różnymi czynnikami komórkowymi. Domena helikazowa może pomagać usuwać lub przemieszczać te czynniki i dzięki temu umożliwiać wiązanie i obróbkę dsRNA przez enzym.

Rybonukleaza Dicer wymaga obecności ATP do wiązania egzogennej siRNA, podczas gdy tzw. rekombinowany enzym wiąże siRNA przy braku ATP [115, 116]. Wykazano także, że ATP stymuluje aktywność rybonukleazy Dicer w lizatach embrjonalnych komórek nowotworopodobnych [117] oraz, iż jest wymagane przy obróbce dsRNA u *D. melanogaster* [118]. Wydaje się zatem, że domena helikazowa może pełnić wiele funkcji, które decydują o różnicach pomiędzy rybonukleazami Dicer pochodzącymi z różnych organizmów.

Rybonukleaza Dicer pochodząca z *G. intestinalis* nie posiada domeny wiążącej dwuniciowy RNA – dsRBD, zlokalizowanej przy końcu C ortologów występujących u wyższych eukariontów. Jej funkcja nie jest jak dotąd poznana, wydaje się jednak, że może być zaangażowana w wiązanie substratu dsRNA w sposób podobny, jak czynią to bakteryjne RNazy III [114].

Rybonukleazy Dicer wyższych eukariontów posiadają także konserwatywny rejon o długości około 100 aminokwasów, nazwany domeną o nieznanym celu – DUF283 (ang. *Domain of Unknown Function 283*), zlokalizowany między domenami helikazy i PAZ. Stwierdzono istnienie niewielkiej homologii między DUF283 a rejonem N-końcowym rybonukleazy z *G. intestinalis*. Przypuszcza się więc, że DUF283 może uczestniczyć w tworzeniu platformy podobnej do tej występującej u Dicer z *G. intestinalis* [105].

2.2.2.3 Model działania rybonukleazy Dicer

Zaproponowano kilka modeli generowania przez Dicer fragmentów RNA o odpowiedniej długości [119-121]. W oparciu o dane biochemiczne stwierdzono, że ludzka

Wydawnictwo Uniwersytetu Wrocławskiego, Wrocław 1987.

112] In polskiej literaturze naukowej, w tym w literaturze z zakresu...

w tymże zakresie, w tymże zakresie, w tymże zakresie...

W tymże zakresie, w tymże zakresie, w tymże zakresie...

W tymże zakresie, w tymże zakresie, w tymże zakresie...

W tymże zakresie, w tymże zakresie, w tymże zakresie...

W tymże zakresie, w tymże zakresie, w tymże zakresie...

W tymże zakresie, w tymże zakresie, w tymże zakresie...

W tymże zakresie, w tymże zakresie, w tymże zakresie...

W tymże zakresie, w tymże zakresie, w tymże zakresie...

W tymże zakresie, w tymże zakresie, w tymże zakresie...

W tymże zakresie, w tymże zakresie, w tymże zakresie...

W tymże zakresie, w tymże zakresie, w tymże zakresie...

W tymże zakresie, w tymże zakresie, w tymże zakresie...

W tymże zakresie, w tymże zakresie, w tymże zakresie...

W tymże zakresie, w tymże zakresie, w tymże zakresie...

W tymże zakresie, w tymże zakresie, w tymże zakresie...

W tymże zakresie, w tymże zakresie, w tymże zakresie...

W tymże zakresie, w tymże zakresie, w tymże zakresie...

W tymże zakresie, w tymże zakresie, w tymże zakresie...

W tymże zakresie, w tymże zakresie, w tymże zakresie...

W tymże zakresie, w tymże zakresie, w tymże zakresie...

W tymże zakresie, w tymże zakresie, w tymże zakresie...

W tymże zakresie, w tymże zakresie, w tymże zakresie...

W tymże zakresie, w tymże zakresie, w tymże zakresie...

W tymże zakresie, w tymże zakresie, w tymże zakresie...

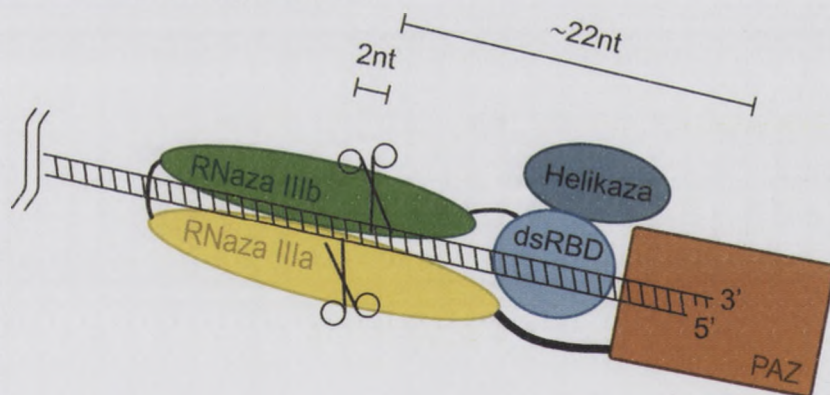
W tymże zakresie, w tymże zakresie, w tymże zakresie...

W tymże zakresie, w tymże zakresie, w tymże zakresie...

W tymże zakresie, w tymże zakresie, w tymże zakresie...

W tymże zakresie, w tymże zakresie, w tymże zakresie...

rybonukleaza Dicer i bakteryjna RNaza III zawierają tylko jedno centrum aktywne, w którym dochodzi do cięcia obu nici RNA. Wykazano jednak, że w przypadku ludzkiej Dicer każda domena RNazowa tnije tylko jedną z nici dupleksu, działając niezależnie od siebie. Mutacje reszt aminokwasowych Asp44 i Glu110 w jednej z domen RNazowych prowadzą do braku jej aktywności katalitycznej, nie wpływając na aktywność drugiej i odwrotnie. Miejsca katalityczne utworzone są przez cztery reszty aminokwasowe – Glu40, Asp44, Asp107, Glu110, które koordynują po jednym dwuwartościowym kationie (Mg^{2+} lub Mn^{2+}). Zaproponowano także, że rolą domeny PAZ jest rozpoznawanie i wiązanie niesparowanych nukleotydów na 3'-końcu dupleksu RNA. Wykazano, że zastąpienie domeny PAZ domeną wiążącą RNA z białka U1A, prowadzi do rozpoznawania i cięcia substratów dsRNA zawierających sekwencję rozpoznawaną przez U1A [122]. Wydaje się, że jedna z domen RNazowych – RNaza IIIa, najprawdopodobniej razem z domeną PAZ odmierzają miejsce cięcia [121, 122]. RNaza IIIa jest dużo dłuższa od RNazy IIIb i od innych typowych katalitycznych domen RNazowych. Umieszczenie domen RNazowych powoduje asymetrię rejonu katalitycznego, gdzie RIIIa tnije tą z nici RNA, która niesie grupę 3'-OH, a RIIIb nie posiadającą 5'-fosforan [121] (Rysunek 10).



Rysunek 10. Model działania rybonukleazy Dicer.

Domena wiążąca dsRNA (dsRBD) rozpoznaje dsRNA, PAZ rozpoznaje dwa niesparowane nukleotydy na 3'-końcach dsRNA i wiąże się do nich. Miejsce cięcia wyznaczone jest przez odległość między domenami RNaza IIIa i domeny PAZ, następuje przecięcie za 21., 22. lub 23. nukleotydem. W końcowym etapie domena helikazowa usuwa jedną z nici RNA.

Poznanie struktury krystalicznej rybonukleazy Dicer z *G. intestinalis* pozwoliło zaproponować prawdopodobny mechanizm działania wszystkich enzymów z tej grupy. Wykazano, że odległość między miejscem aktywnym domeny RNazy IIIa a szczeliną domeny PAZ wiążącej niesparowane nukleotydy na końcu 3' RNA, wynosi $\sim 65\text{\AA}$, jest to długość 25 pz w dsRNA. Aby stworzyć model wiązania dwuniciowej cząsteczki RNA przez Dicer, w strukturę krystaliczną enzymu wmodelowano formę A dsRNA. W miejsce wiązania jonów metali M1 i M2 w domenach RIIIa i RIIIb wbudowano dwie reszty fosforanowe idealnej helisy

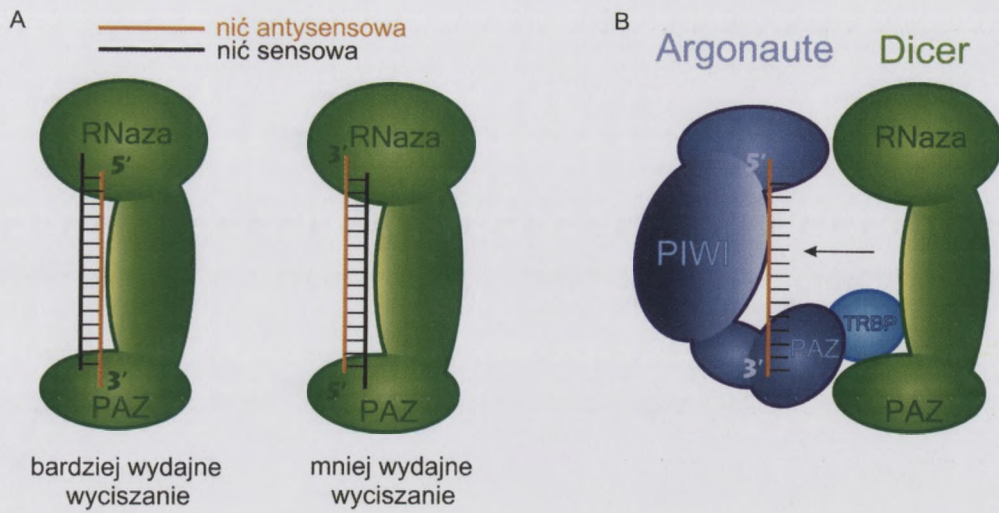
A RNA. dsRNA rozciąga się dalej wzdłuż płaskiej powierzchni tworzonej przez domenę platformy. Rejon ten charakteryzuje obecność dodatnio naładowanych reszt aminokwasowych, które najprawdopodobniej bezpośrednio oddziałują z ujemnie naładowanym szkieletem fosfodiestrowym helisy RNA. Niesparowane nukleotydy na końcu 3' dupletu RNA wpasowują się w kieszeń domeny PAZ, a koniec 5' przylega do pętli domeny PAZ, specyficznej dla białek z rodziny Dicer. Pomiędzy końcem 3' helisy związanej przez PAZ, a grupą fosforanową związaną przez RNAzę IIIa jest dokładnie 25 nukleotydów. Długość produkowanych przez Dicer fragmentów RNA zależy więc od odległości jaka dzieli domeny RNaz i PAZ, czyli tak naprawdę od długości helisy łączącej [105].

2.2.2.4 Przekazywanie nici do kompleksu RISC

Postuluje się, iż dodatkową aktywnością rybonukleazy Dicer jest przekazywanie jednej z nici zhydrolizowanego RNA do kompleksu RISC. Dicer z prekursora pre-miRNA wycina duplet, który składa się z nici aktywnej - srRNA i nieaktywnej - srRNA*. Aktywny produkt może być wycinany z obu stron trzonu cząsteczki prekursorowej, zarówno ze strony 3', jak i 5'.

U *D. melanogaster* zidentyfikowano tzw. ładujący kompleks RISC (ang. *RISC loading complex*), który u człowieka ma wielkość ~500kDa i zbudowany jest z rybonukleazy Dicer, białek TRBP (ang. *transactivating response RNA-binding protein*) i PACT przyłączonych do Argonaute 2 [123-125]. O wyborze aktywnej nici srRNA decyduje stabilność termodynamiczna wyciętego przez Dicer dupletu. Nicia, która będzie wskazywać miejsce wyciszenia, jest ta, której koniec 5' jest mniej stabilnie związany [50, 126]. Wykazano, że przy braku asymetrii termodynamicznej krótkiego dupletu, do kompleksu RISC znacznie częściej przekazywana jest ta nić, której koniec 3' jest związany z domeną PAZ. Wiadomo także, że w kompleksie RISC koniec 3' nici służącej jako sonda jest związany z domeną PAZ białka Argonaute. Sugeruje się więc, że krótki duplet srRNA jest przekazywany od domeny PAZ rybonukleazy Dicer do domeny PAZ białka Argonaute. Domeny rybonukleazowe w tym modelu znajdują się naprzeciw domeny PIWI białka Argonaute. TRBP, który może oddziaływać zarówno z Dicer, jak i Argonaute, najprawdopodobniej funkcjonuje analogicznie do R2D2 u *D. melanogaster*, wyczuwając termodynamiczną asymetrię dupletu RNA [114]. Stwierdzono, że kompleks Dicer/TRBP/Ago2 wykazuje nie tylko zdolność do wyboru aktywnej nici srRNA, ale i degradacji nici nieaktywnej, najprawdopodobniej przez białko Ago2 [127].

A RNA...
 katony...
 kine...
 kiel...
 w...
 s...
 a...
 p...
 R...
 2...
 P...
 P...
 x...
 d...
 m...
 p...
 U...
 c...
 b...
 d...
 m...
 w...
 z...
 e...
 t...
 b...
 P...
 m...
 o...
 d...
 S...
 o...



Rysunek 11. Mechanizm przekazywania aktywnej nici srRNA do kompleksu RISC.

A. Wyciszenie jest efektywniejsze, gdy koniec 3' nici aktywnej jest związany przez domenę PAZ.

B. Model przekazywania aktywnej nici srRNA.



Wynek II. Mechanizm powstania argonutle z RNA w komplecie RISC
A. Wykresonowanie argonutle z RNA. B. Model powstania argonutle z RNA.

2.3. Aptamery

Aptamery są to krótkie fragmenty kwasów nukleinowych lub białek wykazujące wysokie powinowactwo i specyficzność wiązania cząsteczek, wobec których były selekcionowane. Określenie aptamer pochodzi od łacińskiego słowa „aptus”, co oznacza „pasować”. Aptamery są najczęściej identyfikowane metodą selekcji *in vitro* (SELEX, ang. *Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*).

Obecnie aptamery wykorzystuje się w medycynie, biologii molekularnej oraz biotechnologii. Mogą one pełnić rolę inhibitorów enzymów posiadających zdolność rozpoznawania i oddziaływania z kwasami nukleinowymi (np.: polimeraz), a także białek, które w warunkach fizjologicznych nie oddziałują z RNA. Mogą również funkcjonować jako ligandy wiążące inne molekuly (aminokwasy, nukleotydy, antybiotyki, witaminy), czy też jako enzymy (rybozymy). Do tej pory uzyskano bardzo wiele aptamerów oddziałujących z szeregiem różnych indywiduów, począwszy od małych nieorganicznych cząsteczek, a skończywszy na organizmach jednokomórkowych. Specyficzność i wysokie powinowactwo (stała dysocjacji rzędu nano- lub pikomoli) powoduje, że aptamery często porównuje się do przeciwciał. Masa molekularna aptameru to średnio 10-15 kDa, czyli około 10 razy mniej niż masa pojedynczego przeciwciała [128], co pozwala im na efektywną penetrację w organizmie oraz umożliwia szybsze usuwanie ich z krwiobiegu.

2.3.1 Selekcja *in vitro*

Istotą metody jest wyodrębnienie oligonukleotydów, które wykazują wysokie powinowactwo do cząsteczki, wobec której prowadzi się selekcję (cząsteczki docelowej – CD) i oddzielenie ich od pozostałych, które nie wiążą się z CD. Po raz pierwszy SELEX opisano na początku lat dziewięćdziesiątych XX wieku [129, 130]. W metodzie tej wyróżnić można trzy etapy:

1. synteza biblioteki kombinatorycznej oligorybonukleotydów,
2. selekcja specyficznych oligorybonukleotydów,
3. identyfikacja wyselekcjonowanych aptamerów.

Oligonukleotydy (RNA lub DNA) izoluje się z bibliotek kombinatorycznych. Są one zbiorem wszystkich możliwych do zsyntetyzowania oligonukleotydów o długości n . Każdy oligonukleotyd zawiera odcinki o znanej sekwencji zlokalizowane na końcach 3' i 5'. Wykorzystuje się je do amplifikacji i klonowania selekcjonowanych cząsteczek. Pomiedzy sekwencjami znanymi występuje najistotniejszy w procesie selekcji fragment środkowy o przypadkowej sekwencji (ang. *random sequence*). Pula oligonukleotydów, które tworzą

Ammoniumnitrat (AN) ist ein wichtiger Stickstoffdünger, der in der Landwirtschaft weit verbreitet ist. Er wird durch die Reaktion von Ammoniak mit Salpetersäure hergestellt. Die chemische Struktur von AN ist NH_4NO_3 . AN ist ein weißes, kristallines Pulver, das leicht löslich in Wasser ist. Es wird in der Regel in Form von Granulat oder Pellets für die Düngung verwendet. AN ist ein starkes Oxidationsmittel und kann bei unsachgemäßer Handhabung explosionsgefährlich sein. Es wird in der Regel in geschlossenen Behältern transportiert und gelagert.

Die Herstellung von AN erfolgt in mehreren Schritten. Zunächst wird Ammoniak (NH_3) aus Luftstickstoff durch die Haber-Bosch-Fermentation hergestellt. Dieses Ammoniak wird dann mit Salpetersäure (HNO_3) umgesetzt, um AN zu bilden. Die Salpetersäure wird wiederum aus Stickstoffdioxid (NO_2) durch Oxidation von Stickstoffmonoxid (NO) hergestellt. Stickstoffmonoxid wird durch die Oxidation von Stickstoff (N_2) bei hohen Temperaturen und unter Verwendung von Sauerstoff erzeugt.

AN wird in der Landwirtschaft hauptsächlich als Stickstoffdünger für Getreide, Mais und andere Nutzpflanzen eingesetzt. Es liefert Stickstoff in Form von Ammonium- und Nitrat-Ionen, die von den Pflanzen aufgenommen werden können. AN ist ein wichtiger Bestandteil der Stickstoffdüngemittelherstellung. Die Verwendung von AN ist jedoch mit Risiken verbunden, insbesondere bei unsachgemäßer Lagerung und Handhabung. AN kann bei Kontakt mit organischen Materialien oder bei Erhitzen explosionsgefährlich werden. Daher ist eine sorgfältige Handhabung und Lagerung von AN erforderlich.

2.1.1.1. Stickstoffdüngemittel

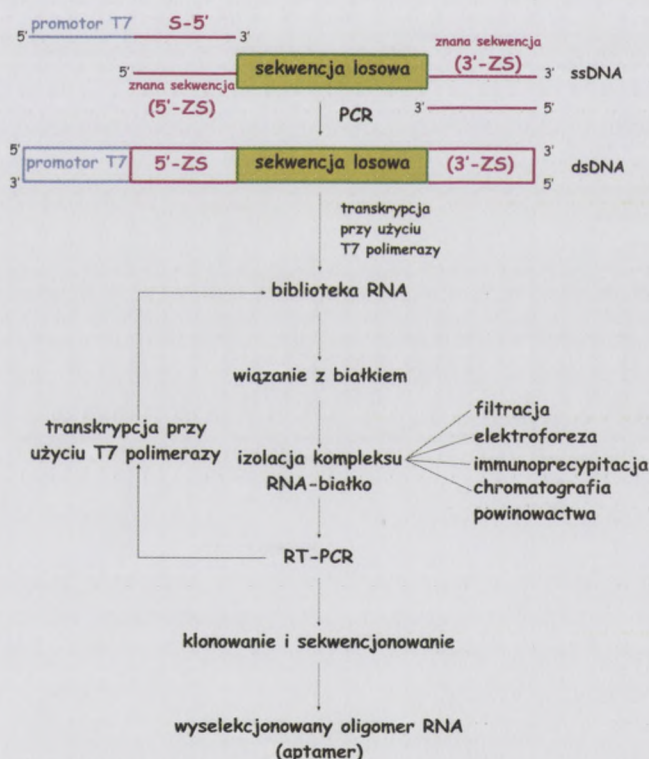
Stickstoffdüngemittel sind wichtige Bestandteile der Düngemittelherstellung. Sie liefern Stickstoff, ein essentielles Element für das Pflanzenwachstum. Stickstoffdüngemittel werden in verschiedenen Formen hergestellt, darunter Ammoniumnitrat, Ammoniumsulfat, Harnstoff und Stickstoffflüssigkeit. Die Wahl des Düngemittels hängt von den Bodenbedingungen, der Pflanzensorte und den klimatischen Bedingungen ab. Stickstoffdüngemittel sind in der Regel in Form von Granulat oder Pellets für die Düngung geeignet. Die Anwendung von Stickstoffdüngemitteln erfolgt in der Regel durch Streuen oder Spritzen auf die Pflanzen.

1. Ammoniumnitrat
2. Ammoniumsulfat
3. Harnstoff

Stickstoffdüngemittel sind in der Landwirtschaft weit verbreitet. Sie sind ein wichtiger Bestandteil der Düngemittelherstellung. Die Verwendung von Stickstoffdüngemitteln ist jedoch mit Risiken verbunden, insbesondere bei unsachgemäßer Handhabung und Lagerung. Stickstoffdüngemittel können bei Kontakt mit organischen Materialien oder bei Erhitzen explosionsgefährlich werden. Daher ist eine sorgfältige Handhabung und Lagerung von Stickstoffdüngemitteln erforderlich. Stickstoffdüngemittel sind ein wichtiger Bestandteil der Düngemittelherstellung. Sie liefern Stickstoff, ein essentielles Element für das Pflanzenwachstum. Die Wahl des Düngemittels hängt von den Bodenbedingungen, der Pflanzensorte und den klimatischen Bedingungen ab. Stickstoffdüngemittel sind in der Regel in Form von Granulat oder Pellets für die Düngung geeignet. Die Anwendung von Stickstoffdüngemitteln erfolgt in der Regel durch Streuen oder Spritzen auf die Pflanzen.

bibliotekę kombinatoryczną jest ograniczona przez długość sekwencji losowej, tzn. im jest ona dłuższa, tym większa liczba możliwych do zsyntetyzowania cząsteczek. W każdej pozycji sekwencji losowej może występować jeden z czterech nukleotydów A, G, C lub U/T. W przypadku n-nukleotydowej cząsteczki daje to 4^n możliwych kombinacji.

Cząsteczkę docelową inkubuje się z syntetyzowaną biblioteką oligonukleotydotową, następnie odmywa się niezwiązane ligandy i izoluje kompleks oligo-CD. Ligandy odseparowane od CD wykorzystywane są jako matryce do syntezy cząsteczek używanych w kolejnym cyklu selekcji. W ten sposób po każdym cyklu otrzymuje się zawężoną pulę oligonukleotydów, która jest ponownie poddawana selekcji. Po przeprowadzeniu zaplanowanej liczby cykli selekcyjnych cząsteczki przepisywane są na dsDNA, który wklonowywany jest do wektora, namnażany w komórkach bakteryjnych, po czym pojedyncze klony poddawane są sekwencjonowaniu (Rysunek 12).



Rysunek 12. Schematyczne przedstawienie metody SELEX.

W pierwszym etapie projektowana jest biblioteka kombinatoryczna jednoniciowych fragmentów DNA. Następnie w oparciu o uzyskaną na drodze syntezy chemicznej bibliotekę ssDNA otrzymywany jest dsDNA metodą PCR, z zastosowaniem starterów s-5' i s-3'. Nowootrzymany dsDNA stanowi matrycę w reakcji transkrypcji *in vitro*. Uzyskaną pulę RNA wykorzystuje się w procesie selekcji względem wybranej cechy, np.: zdolności do wiązania z białkiem. W tym celu przeprowadza się hybrydyzację RNA z białkiem, a następnie usuwa się niezwiązane cząsteczki RNA. W kolejnym etapie RNA jest izolowany z kompleksu z białkiem, uzyskane aptamery służą jako matryce do otrzymania dsDNA metodą RT-PCR. W ten sposób zakończony zostaje pierwszy etap selekcji. W kolejnym cyklu nowootrzymany dsDNA zostaje wykorzystany jako matryca w reakcji transkrypcji do uzyskania zawężonej puli RNA. Po wykonaniu zaplanowanej liczby cykli selekcyjnych dsDNA zostaje wklonowany do plazmidów, namnożony w komórkach bakteryjnych, pojedyncze klony poddawane są sekwencjonowaniu.

bibliotek kombinacyjnych jest ograniczona przez długość sekwencji kodowej, tam, im jest ona dłuższa, tym większa liczba możliwych do zsyntezowania cząsteczek. W tabeli porcji stworzyci kodowej może występować jeden z czterech nukleotydów A, G, C lub U/T.

W przypadku n-nukleotydowej cząsteczki daje to 4^n możliwych kombinacji.

Cząsteczki docelowe znajdują się z syntetyzowaną biblioteką oligonukleotydową. Następnie odbywa się mieszanie ligandy i izoluje kompleks oligo-CD. Ligandy odpowiadające CD wykorzystywane są jako materiał do syntezy cząsteczek używanych w kolejnym cyklu selekcyjnym. W ten sposób po każdym cyklu otrzymuje się zawieszony pulę oligonukleotydów, które jest poddawane badawaniu selekcyjnym. Do przeprowadzenia kolumnowej selekcji selekcyjnych cząsteczek przesyłane są na d/dNA, który wkomponowany jest do wrotów nanometrycznych w komórkach bakterijnych, po czym podlegają one poddawane do selekcjonowania (Rysunek 12).



Rysunek 12. Selekcja oligonukleotydów metodą RT-PCR.

W pierwszym cyklu selekcji jest biblioteka kombinacyjna zawierająca fragmenty DNA. Następnie w drugim cyklu selekcji selekcja oligonukleotydów dokonywana jest metodą RT-PCR z wykorzystaniem sekwencji DNA, która jest selekcyjnym ligandem. W kolejnym cyklu selekcji selekcja oligonukleotydów dokonywana jest metodą RT-PCR z wykorzystaniem sekwencji DNA, która jest selekcyjnym ligandem. W ten sposób po każdym cyklu otrzymuje się zawieszony pulę oligonukleotydów, które jest poddawane badawaniu selekcyjnym. Do przeprowadzenia kolumnowej selekcji selekcyjnych cząsteczek przesyłane są na d/dNA, który wkomponowany jest do wrotów nanometrycznych w komórkach bakterijnych, po czym podlegają one poddawane do selekcjonowania.

2.3.2 Zastosowanie aptamerów w terapii

Dzięki zdolności do efektywnego i selektywnego wiązania cząsteczek docelowych, aptamery uważane są za obiecujące czynniki terapeutyczne. Pogląd ten wydają się potwierdzać pierwsze udane próby zastosowania aptamerów w medycynie.

Oligorybonukleotyd oznaczony symbolem NX-1838 jest silnym inhibitorem angiogenezy i został wykorzystany do produkcji leku o nazwie Macugen® w jednostce chorobowej zwanej zwyrodnieniem plamki żółtej związanej z wiekiem (AMD, ang. *age-related macular degeneration*) [<http://www.centerwatch.com/patient/drugs/area13.html>]. Głównym czynnikiem powodującym przerost naczyń krwionośnych i wysięki prowadzące do zmian zwyrodnieniowych jest podwyższony poziom akumulacji jednej z izoform czynnika wzrostu komórek śródbłonna (VEGF, ang. *vascular endothelial growth factor*) - VEGF₁₆₅. Przeprowadzono selekcję RNA i uzyskano 3 aptamery, które specyficznie rozpoznają VEGF₁₆₅ [131]. Wykazano, że aptamer NX-1838 może być podany bezpośrednio do ciała szklistego oka, zapobiegając wiązaniu VEGF przez receptory VEGFR1 i VEGFR2 [132, 133]. Na podstawie badań klinicznych stwierdzono poprawę wzroku u 80% pacjentów, w 3 miesiące po podaniu aptameru.

Kolejnym przykładem zastosowania aptamerów w medycynie jest 9.3t (zbudowany z 2'-fluoro-pirymidyn), który hamuje aktywność czynnika IXa, proteazy serynowej, uczestniczącej w tworzeniu trombiny (indukuje proces krzepnięcia krwi) z protrombiny [134]. Krzepnięcie krwi w tętnicach lub żyłach (tromboza, zakrzepica), prowadzące do zmniejszenia lub zatrzymania przepływu krwi, jest jednym z czynników powodujących chorobę niedokrwinną serca. Bazując na sekwencji 9.3t zaprojektowano oligonukleotyd antysensowy (5-2C) tak, aby po związaniu z aptamerem blokował jego aktywność. Wykazano, że Peg-9.3t znacząco przedłuża czas krzepnięcia krwi *in vitro* oraz *in vivo*. Ponadto po dodaniu 5-2C, aktywność antykoagulacyjna aptameru jest efektywnie i szybko znoszona [134, 135]. Wykazano również, że podczas operacji serca (z krążeniem pozaustrojowym) u świń aptamer skutecznie zastępuje heparynę, nie zauważono powstawania skrzepów. Ponadto, podawane antidotum 5-2C jest dobrze tolerowane przez organizm [136].

Niezwykła zmienność genetyczna wirusów, których genom zbudowany jest z RNA (wirusy RNA oraz retrowirusy) sprawia, że jak dotąd nie udało się otrzymać leków umożliwiających skuteczną walkę z wywoływanymi przez nie infekcjami. Metodę SELEX wykorzystano więc do uzyskania aptamerów wobec odwrotnej transkryptazy wirusa HIV-1 [137]. Jeden z nich znacznie obniża aktywność polimerazową HIV-1 RT, nie wpływając na pozostałe aktywności RT [137]. Wykazano ponadto, że wprowadzenie do komórek

zainfekowanych wirusem HIV-1, specjalnych konstruktów z sekwencją aptamerów otoczoną przez rybozomy, efektywnie inhibuje aktywność RT kilku subtypów wirusa HIV-1, także tych opornych na stosowane w terapii leki przeciwwirusowe. Zaobserwowano również, że w kapsydach wirionów HIV-1 uwalnianych z komórek znajdują się aptamery oraz, że zdolność tych wirionów do infekcji komórek reporterowych jest znacząco zredukowana (o 90-99.5%) [138].

Selekcję aptamerów *in vitro* przeprowadzano również wobec białka otoczki wirusa HIV-1 (glikoproteiny 120, gp120), która odpowiedzialna jest za rozpoznawanie komórek układu immunologicznego [139]. Scharakteryzowano aptamery RNA specyficzne wobec miejsca wiązania CCR5, które ponad 1000-krotnie obniżają infekcyjność HIV-1 w ludzkich obwodowych komórkach jednojądrzastych krwi (PBMCs, ang. *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) [140].

W ostatnich latach wyselekcjonowano także aptamery wiążące białka wirusa HCV: proteazę serynową oraz polimerazę RNA zależną od RNA. Uzyskano aptamery hamujące specyficznie aktywności tych enzymów wirusowych [141, 142].

Wiele białek sygnałowych zaangażowanych w procesy różnicowania oraz wzrostu komórek może funkcjonować jako onkogeny, powodując transformacje nowotworowe. TTA1 jest aptamerem wyselekcjonowanym wobec tenascyny C [143], która produkowana jest w komórkach podczas rozwoju płodowego, gojenia ran, regeneracji narządów, ale także w stanach patologicznych (nowotworzenie, choroby naczyniowe, infekcje) [144, 145]. Przetestowano możliwości dostarczania radioizotopów oraz leków cytotoksycznych do komórek rakowych z wykorzystaniem TTA1. Przebadano w tym celu komórki nowotworów piersi, płuc, okrężnicy i glejaka. Wyznakowany TTA1 podawano dożylnie i obserwowano powstawanie jasnej, okołonaczyniowej fluorescencji. Stwierdzono, że szybkie pobieranie i usuwanie TTA1 z krwi oraz tkanek pozwala na wyraźne obrazowanie nowotworów [146].

zainfekowanych wirusem HIV-1, pojedynczych komórek z zakażeniami epitelium oraz
pachyepitelm, obniżenie liczby komórek T4 (CD4) w krwi obrotowej. Zakażenie wirusem
opromi, na skutek w czasie lat przetrwania. Zakażenie wirusem HIV-1, także
z w zapadłych wirusach HIV-1, włączając z komórek znajdujących się w krwi, oraz
z zakażeniami tych wirusów, do innych komórek, rozpoznawanych jest zakażenie zainfekowanymi

Zakażenie epitelium, w tym przetrwanie, również w postaci zakażenia wirusa
HIV-1 (glikoproteiny 120, gp120), które odpowiedzialne jest za rozpoznawanie komórek
ultraimmunologicznego (T3) i zakażenie wirusem RNA specyficznego wobec
niemniej wirusa CCR5, które ponad 1000-letnie obciąża infekcją HIV-1 w ludzkich
obwodowych komórkach dendrytycznych krwi (PBMC, ang. Peripheral Blood Mononuclear
Cells) [140].

W omawianych badaniach wyszczególniono także epitelium i inne komórki wirusa HIV-1
procesy zakażenia oraz podaniem RNA zakażenia od RNA. Liczne zakażenia, kampanie
specyficzne skierowały tych czynników wirusowych [141, 142].

Wiele badań wykazało, że zakażenie w procesie różnicowania oraz wzrostu
komórek może indukować inne efekty, powodując transkrypcję nowotworową. TATA
jest elementem wyszczególnionym w wirusie karcynogennym C [143]. Inne badania
w komórkach pokazały rozwój podobnego gościa, tak, wzmocniły badania, że także
w innych komórkach (nowotworzenie, choroby nowotworowe, infekcje) [144, 145].
Przebieg choroby nowotworowej, dostarczanie substancji, oraz także, cytotoksycznych
do komórek, takich z wykorzystaniem TATA. Przebieg w tym celu komórek
nowotworów przez, przez, dostarczanie i gęstość. Wykazano, TATA podlega dożyciu
i obserwowano powstawanie, obniżenie, funkcjonalności. Zwiększenie, z zakażeniami
pojemnie i osłabienie TATA z krwi, oraz także, pozwala na wyznaczenie obserwowane
nowotworów [146].

3. CEL PRACY

Z przedstawionych wcześniej informacji wynika, że krótkie cząsteczki RNA są, obok białek, głównymi czynnikami regulującymi proces ekspresji informacji genetycznej. Wpływają one na strukturę genomu, transkrypcję, stabilność RNA, translację. Mogą też chronić organizm przed inwazją obcego materiału genetycznego, np.: wirusowego. Regulatorowe RNA nie działają jednak samodzielnie. Zarówno ich powstanie, jak i właściwe funkcjonowanie uwarunkowane jest obecnością wielu białek. Spośród różnych klas enzymów współdziałających z regulatorowymi RNA, nukleazy wydają się być tymi, które w ostatnich latach skupiły szczególną uwagę badaczy. Postanowiłam zatem stwierdzić czy cząsteczki RNA mogą być nie tylko substratami, ale i regulatorami aktywności nukleaz.

Jako obiekt moich badań wybrałam dwa białka: odwrotną transkryptazę wirusa HIV-1 (HIV-1 RT), w strukturze której występuje domena RNazy H, posiadająca zdolność do trawienia RNA w obrębie heterodupleksu DNA/RNA oraz ludzką rybonukleazę Dicer, wykazującą zdolność trawienia dwuniciowych regionów RNA. Postawiłam hipotezę, że w organizmie ludzkim mogą występować krótkie cząsteczki RNA regulujące aktywność biologiczną obu rybonukleaz.

Celem mojej pracy jest więc identyfikacja krótkich cząsteczek RNA, które wpływają na aktywności białek uczestniczących w procesach związanych ze specyficznym cięciem RNA (odwrotna transkryptaza wirusa HIV-1 i ludzka rybonukleaza Dicer) i sprawdzenie czy zidentyfikowane cząsteczki RNA mogą być zakodowane w genomie człowieka.

Osiągnięcie tak zarysowanego celu wymagało realizacji następujących zadań szczegółowych:

1. Selekcja aptamerów wobec HIV-1 RT.
2. Analiza bioinformatyczna zidentyfikowanych sekwencji i motywów RNA.
3. Testowanie wpływu aptamerów na aktywności HIV-1 RT.
4. Selekcja aptamerów specyficznie wiążących rybonukleazę Dicer.
5. Analiza bioinformatyczna wyselekcjonowanych sekwencji i motywów RNA.
6. Analiza wpływu uzyskanych aptamerów na aktywność enzymu.
7. Sprawdzenie czy sekwencje specyficzne wobec HIV-1 RT i rybonukleazy Dicer zakodowane są w genomie człowieka.

Z przedstawionych wyników wynika, że w czasie infekcji HIV-1 obok białek glikoproteinowych (gp120 i gp41) w soku błonowym powstają białka o charakterze przeciwciał. Wpływają one na skuteczną penetrację wirusa do komórek docelowych. Białka te mogą być produkowane przez komórki T4, które w czasie infekcji HIV-1 ulegają transformacji i różnicują się w kierunku komórek B. Wskazuje to na to, że w czasie infekcji HIV-1 dochodzi do aktywacji komórek B i powstania przeciwciał. Wskazuje to również na to, że w czasie infekcji HIV-1 dochodzi do aktywacji komórek T4 i powstania białek o charakterze przeciwciał. Wskazuje to również na to, że w czasie infekcji HIV-1 dochodzi do aktywacji komórek T4 i powstania białek o charakterze przeciwciał.

Celem mojej pracy jest wyznaczenie poziomu białek o charakterze przeciwciał w soku błonowym powstającym w czasie infekcji HIV-1. Wskazuje to na to, że w czasie infekcji HIV-1 dochodzi do aktywacji komórek B i powstania przeciwciał. Wskazuje to również na to, że w czasie infekcji HIV-1 dochodzi do aktywacji komórek T4 i powstania białek o charakterze przeciwciał.

Opiszę tak: przeprowadzenie badań w celu wyznaczenia poziomu białek o charakterze przeciwciał w soku błonowym powstającym w czasie infekcji HIV-1.

1. Selekcja pacjentów wobec HIV-1.
2. Analiza biochemiczna soku błonowego powstającego w czasie infekcji HIV-1.
3. Testowanie wpływu soku błonowego na aktywność HIV-1 RT.
4. Selekcja pacjentów w celu wyznaczenia poziomu białek o charakterze przeciwciał.
5. Analiza biochemiczna soku błonowego powstającego w czasie infekcji HIV-1.
6. Analiza wpływu soku błonowego na aktywność HIV-1 RT.
7. Sprawdzenie czy składowe specyficzne wobec HIV-1 RT przeciwciała powstają w czasie infekcji.

4. MATERIAŁY I METODY

4.1 Materiały

4.1.1 Oligonukleotydy DNA i RNA

Użyte w badaniach jednoniciowe cząsteczki DNA i RNA zakupiono w firmie IBA Germany.

Sekwencje cząsteczek DNA przedstawiono w Tabeli 1, cząsteczek RNA w Tabeli 2.

Tabela 1. Wykorzystywane w badaniach oligonukleotydy DNA

nazwa	sekwencja	długość
Bibl – ATH	GGGAGGGTTCATGGTTGT (N) ₁₀ ACGACCATGGACCCTCCC	46 nt
AT2	TAATACGACTCACTATAGGGAGGGTCCATGGTCGT*	35 nt
AT3	GGGAGGGTTCATGGTTGT	18 nt
AT2e	ATGAATTCGGGAGGGTCCATGGTCGT**	26 nt
AT3p	ATCTGCAGGGGAGGGTTCATGGTTGT**	26 nt
Bibl - ATD	GGCTAACTGTAAACATGG(N) ₂₀ GCTACTTATGATTCTCCC	56 nt
ATD2	TAATACGACTCACTATAGGGAGAATCATAAGTAGC*	35 nt
ATD3	GGCTAACTGTAAACATGG	18 nt
ATD2e	ATGAATTCGGGAGAATCATAAGTAGC**	26 nt
ATD3p	ATCTGCAGGGCTAACTGTAAACATGG**	26 nt
HELPERd1	CGAGTCCGAACCTCTGCTCGATTATTTACACCAGGTAGGAACGGG	45nt
EtoEd1	CTCGAGGAGAGCCCTGTTCCAGGTAGGAACGGG	33nt
EtoEp	CCCGTTCCTACCTGG	15nt
EtoE-T7-RNA	TAATACGACTCACTATAG	18nt
HELPERd1-T-RNA	CCCGTTCCTACCTGGTGTAATAATCGAGCAGAGGTTCCGGACTCGC TATAGTGAGTCGTATTA	64nt
HELPERd1-DNA	GCGAGTCCGAACCTCTGCTCGATTATTTACACCAGGTAGGAACGGG	46 nt
Hyb18-DNA	AGCTCCAGGCTCAGATC	18nt

* Sekwencja promotora polimerazy RNA T7 zaznaczona na zielono

** Sekwencje rozpoznawane przez enzymy restrykcyjne zostały zaznaczone na pomarańczowo

Tabela 2. Wykorzystywane w badaniach oligorybonukleotydy.

nazwa	sekwencja	długość
Hyb18-RNA	gaucugagccugggagcu	18 nt
HELPERd1-RNA	gcgaguccgaaccucugcucgauuauuuacaccagguaggaacggg	46 nt
MD16	guggacuucgguccac	16 nt
ATH 1	gggagggguucaugguuguccgggacgaccauggaccucucc	40 nt
ATH 1.1	gguuguccggagcacc	16 nt
ATH 1.2	agucguccggagcacu	16 nt
ATD13.6	gggagaaucauaaguagcggugugagucguggugcccauguaaacaguuagcc	56 nt
ATD15.14	gggagaaucauaaguagccggccucccauccugcccauguaaacaguuagcc	56 nt
ATD15.26	gggagaaucauaaguagcacauugaguguugccuucccauguaaacaguuagcc	56 nt
ATD15.52	gggagaaucauaaguagcgcagugagucguugugcucccauguaaacaguuagcc	56 nt
hsa-miR33	gugcauuguaguugcauugcauguucuggugguaccaugcaauguuuccacagugcauca	61 nt
hsa-miR210	gccccugcccaccgcacacugcgcugccccagaccacugcgugugacagcggcug	58 nt

4.1.2 Enzymy

producent **Fermentas**:

polimeraza DNA Taq (5 U/μl), polimeraza RNA T7 (200 U/μl),

producent **Promega**:

Kinaza polinukleotydomowa T4 (10 U/μl), ligaza DNA T4 (1-3 U/μl), odwrotna transkryptaza Mu-MLV (200 U/μl), *EcoR* I (12 U/μl), *Pst* I (10 U/μl)

Producent **Eppendorf**:

Prime RNase inhibitor (15 U/μl)

Producent **Ambion**:

Rybonukleaza Dicer (1 U/μl)

Producent **Stratagene**:

Rybonukleaza Dicer (0,5 U/μl)

4.1.3 Plazmidy

Wektor ekspresyjny pDAR1 – zawiera cDNA kodujące białko p66 oraz proteazę HIV-1

Wektor ekspresyjny pET11a (producent Novagen)

Plazmid pUC19 (producent Novagen)

4.1.4 Bakterie

Escherichia coli szczep *BL21(DE3)pLysS* (producent Promega) - szczep bakteryjny do otrzymywania białek, posiada plazmid *pLysS* kodujący lizozym bakteriofaga T7 oraz plazmid kodujący polimerazę RNA T7. Sekwencja kodująca polimerazę znajduje się pod promotorem *lac UV5*, indukowanym IPTG.

Escherichia coli szczep *DH5α* (producent Gibco BRL)

Table 2. *Continued*

Accession	Gene	Accession	Gene
U00100	16S rRNA	U00100	16S rRNA
U00101	23S rRNA	U00101	23S rRNA
U00102	5S rRNA	U00102	5S rRNA
U00103	16S rRNA	U00103	16S rRNA
U00104	23S rRNA	U00104	23S rRNA
U00105	5S rRNA	U00105	5S rRNA
U00106	16S rRNA	U00106	16S rRNA
U00107	23S rRNA	U00107	23S rRNA
U00108	5S rRNA	U00108	5S rRNA
U00109	16S rRNA	U00109	16S rRNA
U00110	23S rRNA	U00110	23S rRNA
U00111	5S rRNA	U00111	5S rRNA
U00112	16S rRNA	U00112	16S rRNA
U00113	23S rRNA	U00113	23S rRNA
U00114	5S rRNA	U00114	5S rRNA
U00115	16S rRNA	U00115	16S rRNA
U00116	23S rRNA	U00116	23S rRNA
U00117	5S rRNA	U00117	5S rRNA
U00118	16S rRNA	U00118	16S rRNA
U00119	23S rRNA	U00119	23S rRNA
U00120	5S rRNA	U00120	5S rRNA

4.1.2. *Erwinia*

The *Erwinia* genus is a member of the family *Erwiniaceae* in the order *Erwiniales*. It is a Gram-negative, rod-shaped bacterium. The genus is named in honor of the American microbiologist Erwin F. Smith. The genus includes several species, including *Erwinia amylovora*, *Erwinia carotovora*, *Erwinia chrysanthemi*, *Erwinia iberica*, *Erwinia melonis*, *Erwinia persici*, *Erwinia stewartii*, *Erwinia tobi*, *Erwinia uredovora*, and *Erwinia yersiniae*. The genus is characterized by its ability to cause plant diseases, particularly in the order *Ericales*. The genus is also known for its ability to produce extracellular enzymes, such as pectinase, cellulase, and chitinase, which are used in the food and textile industries. The genus is also known for its ability to form biofilms, which are communities of bacteria that are attached to a surface and encased in a protective matrix. The genus is also known for its ability to fix nitrogen, which is a valuable trait for agricultural purposes. The genus is also known for its ability to produce secondary metabolites, which are used in the pharmaceutical and cosmetic industries. The genus is also known for its ability to produce heat-labile toxins, which are used in the food industry. The genus is also known for its ability to produce phytoalexins, which are natural plant defense compounds. The genus is also known for its ability to produce phytoestrogens, which are natural plant hormones. The genus is also known for its ability to produce phytochemicals, which are natural plant compounds. The genus is also known for its ability to produce phytoestrogens, which are natural plant hormones. The genus is also known for its ability to produce phytochemicals, which are natural plant compounds.

4.1.3. *Pharmacia*

The *Pharmacia* genus is a member of the family *Pharmaciaceae* in the order *Pharmaciales*. It is a Gram-negative, rod-shaped bacterium. The genus is named in honor of the American microbiologist Pharmacia. The genus includes several species, including *Pharmacia* sp. 1, *Pharmacia* sp. 2, *Pharmacia* sp. 3, *Pharmacia* sp. 4, *Pharmacia* sp. 5, *Pharmacia* sp. 6, *Pharmacia* sp. 7, *Pharmacia* sp. 8, *Pharmacia* sp. 9, *Pharmacia* sp. 10, *Pharmacia* sp. 11, *Pharmacia* sp. 12, *Pharmacia* sp. 13, *Pharmacia* sp. 14, *Pharmacia* sp. 15, *Pharmacia* sp. 16, *Pharmacia* sp. 17, *Pharmacia* sp. 18, *Pharmacia* sp. 19, *Pharmacia* sp. 20, *Pharmacia* sp. 21, *Pharmacia* sp. 22, *Pharmacia* sp. 23, *Pharmacia* sp. 24, *Pharmacia* sp. 25, *Pharmacia* sp. 26, *Pharmacia* sp. 27, *Pharmacia* sp. 28, *Pharmacia* sp. 29, *Pharmacia* sp. 30, *Pharmacia* sp. 31, *Pharmacia* sp. 32, *Pharmacia* sp. 33, *Pharmacia* sp. 34, *Pharmacia* sp. 35, *Pharmacia* sp. 36, *Pharmacia* sp. 37, *Pharmacia* sp. 38, *Pharmacia* sp. 39, *Pharmacia* sp. 40, *Pharmacia* sp. 41, *Pharmacia* sp. 42, *Pharmacia* sp. 43, *Pharmacia* sp. 44, *Pharmacia* sp. 45, *Pharmacia* sp. 46, *Pharmacia* sp. 47, *Pharmacia* sp. 48, *Pharmacia* sp. 49, *Pharmacia* sp. 50, *Pharmacia* sp. 51, *Pharmacia* sp. 52, *Pharmacia* sp. 53, *Pharmacia* sp. 54, *Pharmacia* sp. 55, *Pharmacia* sp. 56, *Pharmacia* sp. 57, *Pharmacia* sp. 58, *Pharmacia* sp. 59, *Pharmacia* sp. 60, *Pharmacia* sp. 61, *Pharmacia* sp. 62, *Pharmacia* sp. 63, *Pharmacia* sp. 64, *Pharmacia* sp. 65, *Pharmacia* sp. 66, *Pharmacia* sp. 67, *Pharmacia* sp. 68, *Pharmacia* sp. 69, *Pharmacia* sp. 70, *Pharmacia* sp. 71, *Pharmacia* sp. 72, *Pharmacia* sp. 73, *Pharmacia* sp. 74, *Pharmacia* sp. 75, *Pharmacia* sp. 76, *Pharmacia* sp. 77, *Pharmacia* sp. 78, *Pharmacia* sp. 79, *Pharmacia* sp. 80, *Pharmacia* sp. 81, *Pharmacia* sp. 82, *Pharmacia* sp. 83, *Pharmacia* sp. 84, *Pharmacia* sp. 85, *Pharmacia* sp. 86, *Pharmacia* sp. 87, *Pharmacia* sp. 88, *Pharmacia* sp. 89, *Pharmacia* sp. 90, *Pharmacia* sp. 91, *Pharmacia* sp. 92, *Pharmacia* sp. 93, *Pharmacia* sp. 94, *Pharmacia* sp. 95, *Pharmacia* sp. 96, *Pharmacia* sp. 97, *Pharmacia* sp. 98, *Pharmacia* sp. 99, *Pharmacia* sp. 100.

4.1.4. *Erwinia*

The *Erwinia* genus is a member of the family *Erwiniaceae* in the order *Erwiniales*. It is a Gram-negative, rod-shaped bacterium. The genus is named in honor of the American microbiologist Erwin F. Smith. The genus includes several species, including *Erwinia amylovora*, *Erwinia carotovora*, *Erwinia chrysanthemi*, *Erwinia iberica*, *Erwinia melonis*, *Erwinia persici*, *Erwinia stewartii*, *Erwinia tobi*, *Erwinia uredovora*, and *Erwinia yersiniae*. The genus is characterized by its ability to cause plant diseases, particularly in the order *Ericales*. The genus is also known for its ability to produce extracellular enzymes, such as pectinase, cellulase, and chitinase, which are used in the food and textile industries. The genus is also known for its ability to form biofilms, which are communities of bacteria that are attached to a surface and encased in a protective matrix. The genus is also known for its ability to fix nitrogen, which is a valuable trait for agricultural purposes. The genus is also known for its ability to produce secondary metabolites, which are used in the pharmaceutical and cosmetic industries. The genus is also known for its ability to produce heat-labile toxins, which are used in the food industry. The genus is also known for its ability to produce phytoalexins, which are natural plant defense compounds. The genus is also known for its ability to produce phytoestrogens, which are natural plant hormones. The genus is also known for its ability to produce phytochemicals, which are natural plant compounds. The genus is also known for its ability to produce phytoestrogens, which are natural plant hormones. The genus is also known for its ability to produce phytochemicals, which are natural plant compounds.

4.1.5 Izotopy

ATP [γ ^{32}P] 4000-5000 Ci/mmol, producent ICN
CTP [α ^{32}P] 3000 Ci/mmol, producent ICN

4.1.6 Gotowe zestawy do badań biochemicznych

- wypełnienie Ni-NTA Agarose do kolumny jonowymiennej, producent Qiagen,
- His•Bind® Buffer Kit - zestaw do oczyszczania białek posiadających ogon histydynowy (His-Tag) metodą chromatografii powinowactwa, producent Novagen,
- HiTrap® Q - kolumna jonowymienna (pojemność 1ml), producent GE Healthcare,
- sита molekularne, 30 000 MW, producent Millipore,
- PCR Purification Kit - zestaw do oczyszczania DNA,
- ABI PRISM® Big Dye™ - zestaw do sekwencjonowania, producent ABI-PRISM,

4.1.7 Odczynniki

Sigma - dekstroza, glicyna, etanol, izopropanol, fenol, chloroform, ampicylina, dodecylosiarczan sodu (SDS), kwas etylenodiamino-tetraoctowy (EDTA), ditiotreitól (DTT), Tris, błękit bromofenolowy, cjanol ksylenowy, akrylamid, N,N'-metylenobisakrylamid, nadsiaraczan amonu (APS), kwaśny fosforan sodu (Na_2HPO_4), mocznik, HEPES, β -merkaptotetanol, siarczan niklu, imidazol, dekstroza

POCh - chlorek sodu (NaCl), kwas borowy (H_2BO_3), wodorotlenek sodu (NaOH), octan amonu ($\text{CH}_3\text{COONH}_3$), octan sodu (CH_3COONa), kwas octowy (CH_3COOH), kwas solny (HCl), metanol

Merck - chlorek magnezu (MgCl_2),

Fermentas - roztwór czterech 5'- trójfosforanów rybonukleozydowych (NTP), roztwór czterech 5'- trójfosforanów deoksyrybonukleozydowych (dNTP),

Serva - TEMED, agarozą, pepton, trypton, wyciąg drożdżowy, bacto-agar

Eppendorf - X-gal, izopropylotiogalaktozyd (IPTG)

4.1.8 Bufory

Bufory do oczyszczania HIV-1 RT na kolumnie niklowej

Bufor I

50 mM Na_2HPO_4 pH 8.0
50 mM NaCl

Bufor II

50 mM Na_2HPO_4 pH 7.0
300 mM NaCl

Bufor III

50 mM Na_2HPO_4 pH 6.0
300 mM NaCl
10% glicerol

Bufory do regeneracji kolumny niklowej:

Bufor oczyszczający (1x):

100 mM EDTA
0,5 M NaCl
20 mM Tris-HCl

4.1.5. Izotopy

- ATP [γ - 32 P] 4000-5000 Ci/mmol, producent ICN
- GTP [α - 32 P] 3000 Ci/mmol, producent ICN

4.1.6. Gotowe zestawy do badań biochemicznych

- współzestaw Ni-NTA Agarose do kolonyjnego izolowania, producent Qagen
- His-Bind[®] Buffer Kit - zestaw do oczyszczania białek posiadających ogon histyrynowy (His-Tag) metodą chromatografii powinowactwa, producent Novagen
- HiTrap[®] Q - kolonna jonowa o wymiarach 10x100 mm, producent GE Healthcare
- his molatubule, 30 000 MW, producent Millipore
- PCR Purification Kit - zestaw do oczyszczania DNA
- ABI PRISM[®] Big Dye[™] - zestaw do sekwencjonowania, producent ABI PRISM

4.1.7. Odczynniki

- Sigma - dektopan białka małej rozprężalności, chloroform, ampicylina, dobutylosteron, sód (SDS), kwas wywołujący zmętnienie (BET), etanol (DTT), Tris białko (molekularny ciężar), leucyna, sód, N,N-dimetyloakrylamid, natlenek sodu (AP2), leucyna, sód (DMSO), mocznik, HEPES, 2-merkaptoetanol, sód, imidazol, dektopan
- POC - chloroform (PAG), kwas octowy (HAc), wodorotlenek sodu (NaOH), kwas azotanowy (HNO₃), kwas siarkowy (H₂SO₄), kwas octowy (CH₃COOH), kwas siarkowy (H₂SO₄), natlenek
- Merk - chloroform (CHCl₃)
- Fermentas - roztwór czynnika 3' - endonukleazy cytozylowej (GTP), roztwór czynnika 3' - endonukleazy deoksyrybozylowej (dNTP)
- Boehr - TBS, sód, roztwór, roztwór, roztwór, roztwór, roztwór, roztwór
- Epandant - 2-gal, roztwór, roztwór, roztwór, roztwór, roztwór, roztwór

4.1.8. Bufory

Bufory do oczyszczania His-Tag na kolonie nitrowej

Bufor I
50 mM Na₂HPO₄ pH 8.0
300 mM NaCl

Bufor II
50 mM Na₂HPO₄ pH 7.0
300 mM NaCl

Bufor III
50 mM Na₂HPO₄ pH 6.0
300 mM NaCl

Bufory do regeneracji kolony nitrowej

Bufor oczyszczający (1x)
100 mM EDTA
0.5 M NaCl
20 mM Tris-HCl

Bufor ładujący (1x):

50 mM NiSO₄

Bufor wiążący (1x):

5 mM imidazol

0,5 M NaCl

20 mM Tris-HCl pH 7.9

Bufor do oczyszczania HIV-1 RT na kolumnie jonowymiennej HEPES (50mM, pH 7.0):

1,5 mM Na₂HPO₄

275 mM NaCl

10 mM KCl

10 mM dekstroza

50 mM HEPES

Bufor X - do przechowywania HIV-1 RT

50 mM Tris-HCl pH 8

200 mM NaCl

100 mM EDTA

1 mM DTT

50% glicerol

Bufor do selekcji aptamerów RNA wobec HIV-1 RT

50 mM Tris-HCl pH 7.7

200 mM octan potasu

10 mM DTT

Bufor do selekcji aptamerów RNA wobec ludzkiej rybonukleazy Dicer

20 mM Tris-HCl pH 8.0

150 mM NaCl

2,5 mM MgCl₂

Bufor do określenia stałej dysocjacji aptamer:Dicer

20 mM Tris-HCl pH 7.5

50 mM KCl

1 mM DTT

1 mM ATP

Bufor do elektroforezy białek w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących

30,2 g Tris-HCl (C_k=250 mM)

144,2 g glicyna (C_k=1,92 M)

10 g SDS (C_k=35 mM)

dopełniano wodą do 1000 ml

Bufor denaturujący do nakładania próbek na żel białkowy 4x - SB (ang. sample buffer)

2,5 ml 1M Tris-HCl, pH 6,8 (C_k=200 mM)

2 ml β-merkaptoetanol (C_k=20%)

0,8 g SDS (C_k=8%)

15 mg błękitu bromofenolowego (C_k=0,15%)

4 ml glicerolu (C_k=40%)

dopełniono H₂O do 10 ml

Bufor fosforany (1X)
30 mM NaSO₄

Bufor fosforany (1X)
2 mM imidazol
0.5 M NaCl
20 mM Tris-HCl pH 7.9

Bufor do oczyszczania HIV-1 RT na kolumnie jonowymiennym HEPES/NaCl
1.5 mM Na₂HPO₄
225 mM NaCl
10 mM KCl
10 mM deksoraz
50 mM HEPES

Bufor X - do przechowywania HIV-1 RT
50 mM Tris-HCl pH 8
200 mM NaCl
100 mM BSA
1 mM DTT
20% glicerol

Bufor do czyszczenia opornosci RNA wobec HIV-1 RT
50 mM Tris-HCl pH 7.7
200 mM octan potasu
10 mM DTT

Bufor do czyszczenia opornosci RNA wobec białej tykwiolowej DNAz
20 mM Tris-HCl pH 8.0
150 mM NaCl
2.2 mM MgCl₂

Bufor do oczyszczania staję drzewcaki opornosci DNAz
20 mM Tris-HCl pH 7.5
20 mM KCl
1 mM DTT
1 mM ATP

Bufor do elektroforezy białek w żelu podłożystym w trybie kolumnowym w trybie kolumnowym
30.2 g Tris-HCl (C₂=250 mM)
144.2 g glicyna (C₂=1.92 M)
10 g SDS (C₂=25 mM)
dopelniane wodą do 1000 ml

Bufor domagający do natłuszczenia próbki na żel białkowy 4x - 20 (pauz. żądanie białka)
2.2 ml 1M Tris-HCl, pH 6.8 (C₂=200 mM)
2 ml β-merkaptoetanol (C₂=20%)
0.8 g SDS (C₂=8%)
1.2 mg białka bromofenolowego (C₂=0.12%)
4 ml glicerin (C₂=40%)
dopelnione H₂O do 10 ml

Bufor do elektroforezy kwasów nukleinowych w żelu poliakryloamidowym (TBE) 10x

108 g Tris-HCl ($C_k=890$ mM)
55 g kwas borowy ($C_k=890$ mM)
40 ml 0,5M EDTA pH 8.0 ($C_k=20$ mM)
dopełniono H₂O do 1000 ml

Bufor do elektroforezy kompleksów kwas nukleinowy-białko w warunkach natywnych (TB) 10x

108 g Tris-HCl
55 g kwas borowy

Bufor denaturujący do nakładania próbek na żel poliakryloamidowy 4x - UD (ang. urea dye)

0,05% błękit bromofenolowy
i/lub 0,05% cjanol ksylenowy
w 7M wodnym roztworze mocznika

4.1.9 Roztwory

Roztwory do izolacji plazmidów w małej skali metodą lizy w warunkach alkalicznych (tzw. mini-prepy:

roztwór ALM1

50 mM dekstroza
10 mM EDTA
25 mM Tris

roztwór ALM2 (świeżo przygotowany)

1% SDS
0,2 M NaOH

roztwór neutralizujący

7,5 M octan amonu

Roztwory do wybarwiania białek rozdzielonych metodą elektroforezy w żelu poliakryloamidowym

roztwór barwiący C (na 1000 ml)

500 ml metanolu
100 ml kwasu octowego
2,5 g Błękitu Coomassie'go R-250
dopełnić H₂O do 1000 ml

roztwór odbarwiający (na 1000 ml)

100 ml metanolu
50 ml kwasu octowego
dopełnić H₂O do 1000 ml

Roztwór do wybarwiania kwasów nukleinowych po elektroforezie w żelu agarozowym i poliakryloamidowym

Bromek etydyny (roztwór wodny 0,5 µg/ml)

Roztwór X-gal (0,5 mg/ml) w dimetyloformamidzie (DMF)

- Roztwór X-yni (0,2 mg/ml) w dimetyloformamidzie (DMF)
- Przebieg syntezy (roztwór wody 0,2 mg/ml)
- Roztwór do wyodrębnienia związków nadtlenkowych po elektrolicznej w celu usunięcia i poliatrylowania
- Roztwór do wyodrębnienia białek rozkładanych metodą elektroliczną w celu poliatrylowania
- Roztwór do wyodrębnienia białek rozkładanych metodą elektroliczną w celu poliatrylowania
- Roztwór do wyodrębnienia białek rozkładanych metodą elektroliczną w warunkach alkalicznych (100 mg/ml):
- 22 mM Tris
10 mM EDTA
20 mM dextroza
- Roztwór Al₂(SO₄)₃ (roztwór 100 mg/ml)
- 0,2 M NaOH
1% SDS
- Roztwór do elektrolicznej katalizacji białek rozkładanych metodą elektroliczną w warunkach alkalicznych (100 mg/ml):
- 22 g kwas borowy
108 g Tris-HCl
- Roztwór do elektrolicznej katalizacji białek rozkładanych metodą elektroliczną w warunkach neutralnych (100 mg/ml):
- 22 g kwas borowy (C₂=200 mM)
108 g Tris-HCl (C₂=200 mM)
40 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 (C₂=20 mM)
dopełnić H₂O do 1000 ml
- Roztwór do elektrolicznej katalizacji białek rozkładanych metodą elektroliczną w celu poliatrylowania (TBE) 10x
- Roztwór do elektrolicznej katalizacji białek rozkładanych metodą elektroliczną w celu poliatrylowania (TBE) 10x

Wodny roztwór IPTG (1 M lub 0,1 M)

Wodny roztwór ampicyliny (0,1 g/ml)

4.1.10 Pożywki

Pożywka płynna LB

10 g Bacto[®]-tryptonu

5 g ekstraktu drożdżowego

10 g NaCl

dopełniono H₂O do 1000 ml i sterylizowano przez autoklawowanie

Pożywka płynna LB z ampicyliną (C_k 0,2 mg/ml)

do 11 wysterylizowanej i schłodzonej do temp. co najmniej 55°C pożywki LB dodawano 2 ml roztworu ampicyliny (100 mg/ml)

Pożywka SOC

20 g Bacto[®]-tryptonu

5 g ekstraktu drożdżowego

0,5 g NaCl

sterylizowano, a następnie dodawano glukozę do końcowego stężenia 20 mM

Pożywka stała z ampicyliną (C_k 0,2 mg/ml)

2 g Bacto[®]-tryptonu

1,25 g wyciągu drożdżowego

1,25 g NaCl

3,75 g bacto-agaru

dopełniono H₂O do 250 ml

sterylizowano, pożywkę schłodzono do temp. 55°C, dodawano 0,5 ml roztworu ampicyliny (100 mg/ml) i wylewano na płytki

4.1.11 Żele

Żele poliakryloamidowe do rozdziatu elektroforetycznego białek w warunkach denaturujących

15% rozdzielający żel poliakryloamidowy

6,00 ml 30% akrylamid/ 0,8% N,N'-metylenobisakrylamid

4,40 ml 1M Tris-HCl pH 8,7

0,12 ml 10% SDS

0,01 ml TEMED

0,04 ml 10% APS

dopełniono H₂O do 12 ml

5% zagęszczający żel poliakryloamidowy

0,850 ml 30% akrylamid/ 0,8% N,N'-metylenobisakrylamid

0,625 ml 1M Tris-HCl pH 6,8

0,050 ml 10% SDS

0,012 ml TEMED

0,025 ml 10% APS

dopełniono H₂O do 5 ml

1980

1981

1982

1983

1984

1985

1986

1987

1988

1989

1990

1991

1992

1993

1994

1995

1996

1997

1998

1999

2000

2001

2002

2003

2004

2005

2006

2007

2008

2009

Żele poliakryloamidowe do rozdziatu elektroforetycznego kwasów nukleinowych:

12% natywny żel poliakryloamidowy (na 1000 ml)

120 g akryloamidu
3,96 g bis-akryloamidu
100 ml 10x TBE
dopełnić do 1000 ml H₂O

6% natywny żel poliakryloamidowy (na 1000 ml)

60 g akryloamidu
2,02 g bis-akryloamid
100 ml 10x TBE
dopełnić do 1000 ml H₂O

8% denaturujący żel poliakryloamidowy (na 1000 ml)

80 g akryloamidu
2,64 g bis-akryloamidu
420 g mocznika¹
100 ml 10x TBE
dopełnić do 1000 ml H₂O

12% denaturujący żel poliakryloamidowy (na 1000 ml)

120 g akryloamidu
3,96 g bis-akryloamidu
420 g mocznika¹
100 ml 10x TBE
dopełnić do 1000 ml H₂O

4.1.12 Wzorce długości DNA

0.1kB (0,5 mg/ml, producent SIGMA)

4.1.13 Wzorce masy białek

Mid-Range Protein Molecular Weight Marker
(0,5 mg/ml), 14,4 – 97,4 kDa, producent Promega

Unstained Protein Molecular Weight Marker
(0,1-0,2 mg/ml), 14,4 – 116,0 kDa, producent Fermentas

1.01-0.02 mg/ml (0.1-0.2 mg/ml)

1.01-0.02 mg/ml (0.1-0.2 mg/ml)

1.01-0.02 mg/ml (0.1-0.2 mg/ml)

1.01-0.02 mg/ml (0.1-0.2 mg/ml)

1.01-0.02 mg/ml (0.1-0.2 mg/ml)

1.01-0.02 mg/ml (0.1-0.2 mg/ml)

1.01-0.02 mg/ml (0.1-0.2 mg/ml)

1.01-0.02 mg/ml (0.1-0.2 mg/ml)

1.01-0.02 mg/ml (0.1-0.2 mg/ml)

1.01-0.02 mg/ml (0.1-0.2 mg/ml)

1.01-0.02 mg/ml (0.1-0.2 mg/ml)

1.01-0.02 mg/ml (0.1-0.2 mg/ml)

1.01-0.02 mg/ml (0.1-0.2 mg/ml)

1.01-0.02 mg/ml (0.1-0.2 mg/ml)

1.01-0.02 mg/ml (0.1-0.2 mg/ml)

1.01-0.02 mg/ml (0.1-0.2 mg/ml)

1.01-0.02 mg/ml (0.1-0.2 mg/ml)

1.01-0.02 mg/ml (0.1-0.2 mg/ml)

1.01-0.02 mg/ml (0.1-0.2 mg/ml)

1.01-0.02 mg/ml (0.1-0.2 mg/ml)

1.01-0.02 mg/ml (0.1-0.2 mg/ml)

1.01-0.02 mg/ml (0.1-0.2 mg/ml)

1.01-0.02 mg/ml (0.1-0.2 mg/ml)

1.01-0.02 mg/ml (0.1-0.2 mg/ml)

1.01-0.02 mg/ml (0.1-0.2 mg/ml)

1.01-0.02 mg/ml (0.1-0.2 mg/ml)

1.01-0.02 mg/ml (0.1-0.2 mg/ml)

1.01-0.02 mg/ml (0.1-0.2 mg/ml)

1.01-0.02 mg/ml (0.1-0.2 mg/ml)

1.01-0.02 mg/ml (0.1-0.2 mg/ml)

4.2 Metody

4.2.1 Transformacja komórek bakteryjnych metodą elektroporacji

- do 100 μ l zawiesiny komórek kompetentnych *E. coli*, szczep BL21(DE3)LysS, dodawano 1 ng plazmidu, całość umieszczano w kuwecie i przeprowadzano elektroporację (warunki elektroporacji: napięcie - 2,5 kV; pojemność pola – 25 μ F; oporność – 200 Ω ; czas trwania: 3-7 msec)
- do transformowanych komórek dodawano 1 ml płynnej pożywki LB i wytrząsano 45 min. w 37°C, 300 obr./min.
- 100 - 500 μ l zawiesiny bakteryjnej nanoszono na płytkę z pożywką stałą zawierającą ampicylinę i inkubowano przez noc w 37°C
- następnego dnia otrzymywano pojedyncze kolonie bakterii

4.2.2 Transformacja komórek bakteryjnych metodą heat-shock

- do 100 μ l zawiesiny komórek kompetentnych DH5 α (patrz 4.2.4) dodawano 2 μ l mieszaniny ligacyjnej i inkubowano 45 min. na lodzie
- zawiesinę ogrzewano przez 90 sek. w temp. 42°C
- schładzano 5 min. na lodzie
- do transformowanych komórek dodawano 800 μ l płynnej pożywki SOC i wytrząsano 1h w temp. 37°C przy 280 obr./min.
- bakterie wirowano 2 min. przy prędkości 4000 obr./min., w temperaturze pokojowej
- supernatant dekantowano, a osad zawieszano w 200 μ l pożywki SOC
- do 100 μ l zawiesiny bakteryjnej dodawano 60 μ l X-gal (50 μ g/ml) oraz 30 μ l 0,1M roztworu wodnego IPTG (plazmidy z systemem Blue/White screening)
- 100 μ l zawiesiny bakteryjnej nanoszono na płytkę z pożywką stałą zawierającą ampicylinę i inkubowano przez noc w temp. 37°C
- następnego dnia otrzymywano pojedyncze kolonie bakterii, obecność lub brak insertu w plazmidzie stwierdzano na podstawie barwy kolonii – białe z insertem, niebieskie bez insertu

4.2.3 Przygotowanie stocku glicerolowego bakterii

- pobrano zaszczepkę z pojedynczej kolonii uzyskiwanej po transformacji komórek bakteryjnych i przenoszono do 10 ml pożywki LB z ampicyliną, hodowlę prowadzono do momentu uzyskania przez komórki fazy wzrostu logarytmicznego, gęstości optycznej $OD_{600}=0,6-0,8$
- następnie pobierano 900 μ l hodowli, dodawano 100 μ l 80% glicerolu
- umieszczano na suchym lodzie
- przechowywano w -80°C

4.2 Metody

4.2.1 Transformacja komórek bakterijnych metodą elektroporacji

- do 100 µl zawiesiny komórek komercyjnych E. coli szczep 8121(D23),y2z... dodawano 1 ng plazmidu, całość umieszczano w komórkach i przeprowadzono elektroporację (warunki elektroporacji): napięcie - 2,5 kV; pojemność pojem - 25 nF; oporność - 200 Ω; czas urwania: 3-7 msec)
- do transformowanych komórek dodawano 1 ml płynnej pożywki LB i wytrącano 45 min. w 37°C, 300 obr./min.
- 100-200 µl zawiesiny bakterijnej nanoszono na płytce z pożywką stałą zawierającą ampicylinę i inkubowano przez noc w 37°C
- następnego dnia otrzymano pojedyncze kolonie bakterii

4.2.2 Transformacja komórek bakterijnych metodą jon-chock

- do 100 µl zawiesiny komórek komercyjnych D159 (part 4.1.4) dodawano 2 µl niesymetrycznej higrocyjny i inkubowano 45 min. na lodzie
- zawieszona umieszczano przez 90 sek. w temp. 42°C
- schładzano 2 min. na lodzie
- do transformowanych komórek dodawano 800 µl płynnej pożywki SOC i wytrącano 1h w temp. 37°C (przy 180 obr./min.)
- bakterie wirowano 2 min. przy prędkości 4000 obr./min. w temperaturze pokojowej
- supernatant dekantowano, a osad zawieszono w 500 µl pożywki SOC
- do 100 µl zawiesiny bakterijnej dodawano 60 µl 2-gal (20 µg/ml) oraz 30 µl 0,1M roztworu wodnego IPTG (płynny z systemem BlueWhite screening)
- 100 µl zawiesiny bakterijnej nanoszono na płytce z pożywką stałą zawierającą ampicylinę i inkubowano przez noc w temp. 37°C
- następnego dnia otrzymano pojedyncze kolonie bakterii, obecność lub brak inseru w plazmidzie stwierdzano na podstawie barwy kolonii - biały z niebieskim, niebieski bez inseru

4.2.3 Przekształcanie szczepów glukozytowego bakterii

- gotowano zaskrzepkę z pożywką kolonii uzyskiwaną po transformacji komórek bakterijnych i przefiltrowano do 10 ml pożywki LB z ampicyliną, hodowle prowadzono do momentu uzyskania przez komórki takiej wartości logarytmicznego, genotypu określonej OD_{600nm} 0,8-0,9
- następnie pobrano 900 µl hodowli, dodawano 100 µl 80% glicerołu
- umieszczano na suchym lodzie
- przechowywano w -80°C

4.2.4 Przygotowanie komórek kompetentnych do transformacji metodą heat-shock

- zaszczepkę pobierano ze stoku glicerolowego bakterii kompetentnych szczepu *E. coli* DH5 α i przenoszono do 10 ml pożywki LB, hodowlę prowadzono 12h wytrząsając przy 280 rpm, w temp. 37°C
- do 100 ml pożywki LB dodawano 1 ml nocnej hodowli bakterii DH5 α
- wytrząsano przy 280 rpm do momentu, gdy OD₆₀₀ osiągało wartość 0.3-0.6
- wirowano w 4°C przez 4 min. przy 4000 rpm
- supernatant dekantowano, osad zawieszano w 4 ml 100 mM CaCl₂
- inkubowano na lodzie 25 min
- wirowano w 4°C przez 4 min. przy 4000 rpm
- osad zawieszano w 2 ml 75 mM CaCl₂ z dodatkiem 25% glicerolu
- rozpipetowywano po 100 μ l
- komórki kompetentne przechowywano w (-80°C)

4.2.5 Otrzymywanie plazmidów w małej skali metodą lizy w warunkach alkalicznych

- pojedyncze kolonie bakteryjne przenoszono do 2 ml płynnej pożywki LB z ampicyliną i wytrząsano 12-14 h w temp. 37°C
- następnego dnia zawiesinę bakterii wirowano 1 min. z prędkością 10000 rpm
- roztwór dekantowano, a zawierający bakterie osad zawieszano w 100 μ l roztworu ALM1
- dodawano 200 μ l świeżo przygotowanego roztworu ALM2, delikatnie mieszano i inkubowano 5 min. na lodzie
- dodawano 150 μ l 7,5M CH₃COONH₄, mieszano i inkubowano 20 min. na lodzie
- wirowano 15 min. z prędkością 14000 rpm w temp. pokojowej
- supernatant przenoszono do nowych probówek i dodawano 1 ml 96% etanolu
- inkubowano 20 min. w temp. pokojowej
- wirowano 15 min. z prędkością 14000 rpm
- roztwór dekantowano, a osad, po wysuszeniu rozpuszczano w 50 μ l H₂O z dodatkiem 2 μ l RNazy A (o stężeniu 2,5 mg/ml), wydajność izolacji to ok. 5-10 μ g plazmidu

4.2.6 Otrzymywanie HIV-RT (p66/p51) w małej skali

- do 10 ml pożywki LB z ampicyliną przenoszono niewielką ilość stoku bakterii BL21(DE3)LysS transformowanych wektorem; hodowlę prowadzono przez noc w 37°C, wytrząsając 300 rpm
- następnego dnia do 20 ml świeżej pożywki LB z ampicyliną przenoszono 100 μ l hodowli nocnej, wytrząsano 280 rpm, w 37°C, do momentu osiągnięcia przez hodowlę wartości OD = 0.8-0.9
- pobierano 1 ml zawiesiny bakteryjnej przed indukcją – próba zerowa
- następnie do hodowli dodawano 10 μ l IPTG (0.1M)

- po 1h, 2h, 3h i 4h pobierano 1 ml hodowli
- wszystkie próbki wirowano 1 min, przy 13000 rpm, w temperaturze pokojowej
- supernatant dekantowano, a osad zawieszano w buforze 1xSB i zamrażano w -20°C
- po odmrożeniu bakterie wirowano z prędkością 13000 rpm, 20 minut w 4°C
- supernatant nakładano na 15% żel poliakryloamidowy do rozdzielania elektroforetycznego białek w warunkach denaturujących, uprzednio denaturując białka 3 min. w 100°C

4.2.7 Otrzymywanie HIV-1 RT w dużej skali

- zaszczepkę pobierano ze stoku glicerolowego bakterii *E. coli* BL21(DE3)pLysS, transformowanych wektorem pDAR1, i przeniesiono do 10 ml pożywki LB z ampicyliną, hodowlę prowadzono 12h wytrząsając przy 280 rpm, w 37°C
- 5 ml zawiesiny bakterii zaszczepiano 0,5 l pożywki LB z ampicyliną i inkubowano w 37°C przez około 3 - 4 h, cały czas wytrząsając przy 280 rpm; inkubację prowadzono do momentu osiągnięcia przez hodowlę bakteryjną gęstości optycznej $OD_{600} = 0,6 - 0,8$
- do 0,5l hodowli bakteryjnej dodawano 250 ml 1M roztworu wodnego IPTG i wytrząsano przez 3 - 5 h, przy 280 rpm, w 37°C
- zawiesinę bakterii wirowano 15 min. z prędkością 5000 rpm, w 4°C
- roztwór dekantowano, a osad zawieszano w buforze I, w proporcji 5 g komórek na 10 ml buforu, w 4°C
- zawiesinę inkubowano 0,5 h na lodzie
- dodawano 1 ml 4M NaCl, inkubowano na lodzie przez kolejne 15 min
- sonikowano trzykrotnie po 30 sec (amplituda 70-80% - aparat Autotune Series, High Intensity Ultrasonic Processor, 750 Watt Model, producent Sigma), z 5 min. odstępami na inkubację na lodzie
- uzyskaną zawiesinę wirowano 30 min. z prędkością 15000 rpm, w 4°C
- supernatant przenoszono do nowej probówki i rozcieńczano jedną objętością buforu II
- tak przygotowany ekstrakt наносzono na kolumnę niklową, uprzednio zrównoważoną buforem II

4.2.8 Oczyszczanie białek - chromatografia powinowactwa

- ekstrakt białkowy w buforze II наносzono na kolumnę niklową, zrównoważoną buforem II
- kolumnę przemywano 20 ml buforu II
- kolumnę przemywano 20 ml buforu III, zawierającego imidazol ($C_k=10$ mM)
- kolumnę przemywano 10 ml porcjami buforu III, do każdej kolejnej porcji dodawano imidazol tak, by jego stężenie końcowe wzrastało stopniowo i wynosiło: 100, 200, 300, 400, 500 mM
- zebrane frakcje analizowano metodą elektroforezy w 15% denaturującym żelu poliakryloamidowym

- po 1h, 2h, 3h i 6h pobrano 1 ml hodowli
- wyizolowano bakterie w ilości 15000 rpm w temperaturze pokojowej
- supernatant odwirowano a osad zawieszono w buforze 1xSB i zamieszano w 20°C
- po odwirowaniu bakterie wlewano z prędkością 13000 rpm, 30 minut w 4°C
- supernatant odwirowano na 15000 rpm, 30 minut w 4°C
- w warunkach domyślnych, przygotowano domyślny bufor 1x w 100°C

4.2.7. Oczyszczanie HIV-1 RT w danych stanach

- reakcję pobrano ze skoniętego bakterie E. coli BL21(DE3) pLys2, transformowanych wektorem pDAR1 i przeniesiono do 10 ml porcji LB z ampicyliną, hodując powoli 12h w 37°C
- 5 ml zawiesiny bakterii suszczono 0,5 l porcji LB z ampicyliną i inkubowano w 37°C przez około 3 - 4 h, cały czas wywierając przy 280 rpm, inkubację przerywano na moment co najmniej przez hodowlę bakteriję świeżą odczytując OD 600 = 0,6 - 0,8
- do 0,5 l hodowli bakteriję dodawano 250 ml 1M roztworu wodnego IPTG i wytrącano przez 2 - 3 h przy 280 rpm w 37°C
- zawiesinę bakterii wlewano 15 min z prędkością 3000 rpm w 4°C
- osad odwirowano a nadmiar roztworu w buforze 1x w porcji 2 x kontynuacji na 10 ml hodowli w 4°C
- zawiesinę inkubowano 0,5 h w buforze
- hodowla 1 ml 4M NaCl, inkubowano na lodzie przez kolejne 12 min
- roztwór wytrącający po 30 sec (amplicyna 30-40% - agent Antoine Schaefer, High Intensity Ultrasonic Processor, 750 Watt Model, producent Sigma) z 2 min odprężenia na inkubację na lodzie
- uzyskano czyste wlewano 30 min z prędkością 13000 rpm w 4°C
- supernatant przeniesiono do nowej porcji i następną jedną odczytując bufor 1x
- tak przygotowany czysty osad przeniesiono na kolejne nielody, przechodząc z buforu 1x

4.2.8. Oczyszczanie białek - chromatografia powinowactwa

- czysty bufor 1x w buforze II przeniesiono na kolejne nielody z buforu 1x
- bufor przemywano 30 ml buforu II
- bufor przemywano 50 ml buforu III, zawierającego imidazol (C₂=10 mM)
- bufor przemywano 10 ml porcji buforu III, do każdej kolejnej porcji dodawano imidazol tak, by jego stężenie końcowe w każdym stopniu i wynosiło: 100, 200, 300, 400, 500 mM
- czyste białko oczyszczano metodą chromatografii powinowactwa w 15% denaturującym celu poliakrylamidowym

- frakcję, zawierającą pożądane białko, zagęszczano na filtrach 30,000 MW (producent Millipore) w obecności buforu 50 mM Tris pH 8,0

4.2.9 Oczyszczanie białek - chromatografia jonowymienna

- ekstrakt białkowy w buforze 50 mM Tris pH 8,0 (po zagęszczeniu do objętości 1 ml) наносono na kolumnę Q-sefarrową, zrównoważoną buforem 50 mM Tris pH 8,0
- kolumnę przemywano 10 ml buforu 50 mM Tris pH 8,0
- kolumnę przemywano gradientem buforu 50 mM Tris pH 8,0 – 50 mM Hepes pH 7,0
- zebrane frakcje analizowano metodą elektroforezy w 15% denaturującym żelu poliakryloamidowym
- frakcję, zawierającą pożądane białko, zagęszczano na filtrach 30,000 MW (producent Millipore) w obecności buforu 50 mM Tris pH 8,0
- w celu wymiany buforu lub zagęszczenia białka, preparat białkowy sączono na filtrach 30,000 MW (producent Millipore).

4.2.10 Elektroforeza białek w żelach poliakryloamidowych

Otrzymywane preparaty białkowe poddawano analizie metodą elektroforezy w 15% denaturującym żelu poliakryloamidowym. Do próbek dodawano $\frac{1}{4}$ objętości buforu SB, preparaty poddawano denaturacji 3 min. w 94°C, inkubowano 5 min. na lodzie i наносono na żel. Początkowe warunki rozdzielania wynosiły: natężenie 25 mA oraz napięcie 80 V (w żelu zagęszczającym). Po wejściu preparatów w żel rozdzielający, podwyższano natężenie do 50 mA, a napięcie do 200 V. Jako wzorzec masy cząsteczkowej białek wykorzystywano Mid-Range Protein Molecular Weight Marker (0,5 μ g). Produkty rozdzielania elektroforetycznego barwiono w roztworze Coomassie Brilliant Blue R przez 1h, a następnie płukano w roztworze odbarwiająjącym przez kolejną godzinę.

4.2.11 Amplifikacja DNA w dużej skali

Przed pierwszym cyklem selekcji amplifikowano metodą PCR DNA tworzące bibliotekę kombinatoryczną. Podobnie po kolejnych cyklach selekcyjnych amplifikowano zawężoną pulę cząsteczek RNA, po uprzednim przeprowadzeniu reakcji odwrotnej transkrypcji. Mieszaniny do reakcji PCR przygotowywano w objętości 400 μ l, po czym rozpipetowywano je każdorazowo do 8 próbek (0,2 ml). Reakcje PCR przeprowadzano w aparacie firmy Biometra®, jej skład podano w Tabeli 3.

Tabela 3. Skład typowej reakcji PCR.

składnik	stężenie początkowe	stężenie końcowe
Matryca	25 pmoli/ μ l	1,5 pmola/ μ l
Starter komplementarny do końca 5' powielanego fragmentu	25 pmoli/ μ l	2 pmole/ μ l
Starter komplementarny do końca 3' powielanego fragmentu	25 pmoli/ μ l	2 pmole/ μ l
Bufor reakcyjny ¹	10x	1x
Mieszanina dNTP	2,5 mM	0,2 mM
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM
Polimeraza DNA Taq	2,5U/ μ l	5U
H ₂ O	dopełniano do pożądanej objętości	

¹Skład buforu reakcyjnego 1x: 75 mM Tris-HCl (pH 8,8 w 25°C), 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% (v/v) Tween 20

Warunki, w jakich przeprowadzano reakcję PCR podano w Tabeli 4.

Tabela 4. Warunki reakcji PCR

etap	temperatura	czas	ilość powtórzeń
denaturacja wstępna	93°C	30 sek	1
denaturacja	93°C	30 sek	30
hybrydyzacja	52°C	30 sek	
elongacja	72°C	1 min	
elongacja końcowa	72°C	5 min	1

4.2.12 Transkrypcja *in vitro*

Transkrypcję przeprowadzano w objętości 50 μ l, mieszaninę reakcyjną, o składzie podanym w Tabeli 5, inkubowano przez 4 godziny w 37°C.

Tabela 5. Skład mieszaniny do reakcji transkrypcji

składnik	stężenie początkowe	stężenie końcowe
Bufor ¹	5x	1x
Mieszanina NTP	25 mM	2 mM
Guanozyna	15 mM	4 mM
Matryca	5 pmoli/ μ l	0,5 pmola/ μ l
H ₂ O	dopełniano do 50 μ l	

¹Skład buforu reakcyjnego 1x: 40 mM Tris-HCl (pH 7,9 w 25°C), 6 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 10 mM NaCl, 2 mM spermidyna

Tabela 3. Skład roztworu reakcji PCR.

składnik		stężenie początkowe	stężenie końcowe
MgCl ₂		2.5 mM	1.5 mM
Mieszanina dNTP		2.5 mM	0.2 mM
Baza reakcyjna		10x	1x
Fragment		25 pmola/μl	2 pmola/μl
Fragment		25 pmola/μl	2 pmola/μl
Materiał		25 pmola/μl	1.5 pmola/μl
H ₂ O		dopelniono do objętości	30

Skład bufora reakcyjnego: 1x: 15 mM Tris-HCl (pH 8.8 w 25°C), 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1 M β-mercaptoetanol, Tween 20

Warunki w jakich przeprowadzono reakcję PCR podane w Tabeli 4.

Tabela 4. Warunki reakcji PCR.

step	temperatura	czas	liczba powtórzeń
denaturacja	95°C	30 sek.	1
denaturacja	95°C	30 sek.	30
hydryzacja	52°C	30 sek.	
elongacja	72°C	1 min.	
elongacja końcowa	72°C	7 min.	1

4.2.13. Transkrypcja in vitro

Transkrypcję przeprowadzono w objętości 30 μl, mieszankę reakcyjną o składzie podanym

w Tabeli 5, inokulowano przez 4 godziny w 37°C.

Tabela 5. Skład mieszaniny do reakcji transkrypcyjnej.

składnik		stężenie początkowe	stężenie końcowe
Baza		2x	1x
Mieszanina NTP		15 mM	2 mM
Guanozyna		15 mM	4 mM
Materiał		2 pmola/μl	0.2 pmola/μl
H ₂ O		dopelniono do 30 μl	

Skład bufora reakcyjnego: 1x: 40 mM Tris-HCl (pH 7.5 w 25°C), 6 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 10 mM KCl, 1 mM spermidyna

Po transkrypcji rozdzielano produkty reakcji w 12% denaturującym żelu poliakryloamidowym i izolowano RNA o pożądanej wielkości.

4.2.13 Rozdział kwasów nukleinowych w żelu poliakryloamidowym i ich izolacja

- produkty reakcji (transkrypcji, znakowania radioizotopowego) denaturowano poprzez ogrzewanie do temperatury 95°C przez 2 - 5 minut i gwałtowne schłodzenie na lodzie
- preparaty rozdzielano w denaturującym żelu poliakryloamidowym
- fragmenty żelu zawierające pożądany produkt wycinano i umieszczano w osobnych probówkach
- dodawano 150 µl buforu elucyjnego (0,3 M octanu sodu pH 5) i wytrząsano 1,5h (dwukrotnie)
- zebrane frakcje łączono, kwasy nukleinowe wytrącano 3 obj. 96% etanolu przez noc w temp. -20°C
- wirowano 20 min. z prędkością 14000 rpm
- roztwór dekantowano, a osad suszono i rozpuszczano w 20 µl H₂O
- stężenie oczyszczonego DNA/RNA określano mierząc absorpcję promieniowania UV dla λ=260

4.2.14 Radioizotopowe znakowanie ssRNA na końcu 5'

Na wstępie ssRNA denaturowano podgrzewając 2 minuty w temperaturze 95°C i gwałtownie schładzając na lodzie. Reakcję prowadzono w objętości 30 µl w mieszaninie o składzie podanym w Tabeli 6.

Tabela 6. Radioizotopowe znakowanie ssRNA - skład mieszaniny reakcyjnej.

składnik	stężenie początkowe	stężenie końcowe
bufor do kinazowania ¹	10x	1x
ATP	[γ ³² P] 4000-5000 Ci/mmol	50 µCi
ssRNA	100 pmoli/µl	0,3 pmola/µl
kinazy polinukleotydowej T4	10 U/µl	0,5 U/µl
H ₂ O	uzupełniano do objętości 30 µl	

¹Skład buforu do kinazowania 1x: 70 mM Tris-HCl pH 7,6, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT.

- mieszaninę inkubowano 45 minut w temperaturze 37°C
- wyznakowany radioaktywnie RNA oczyszczano metodą fenol-chloroform (patrz 4.2.15)
- następnego dnia mierzono stężenie RNA za pomocą pomiaru absorpcji promieniowania UV dla λ = 260
- przy użyciu licznika scyntylicyjnego Beckman mierzono ilość materiału radioaktywnego wprowadzonego do RNA

Do transkrypcji dodano 100 µl 100 mg/ml RNA i izolowano RNA o podległym...

4.2.13 Rozdział kwasów nukleinowych z użyciem...

- produkty reakcji (koncentracja 100 mg/ml) do temperatury 95°C przez 2 min...
- pozbawiony rozkładu w temperaturze pokojowej...
- fragmenty żelu zawierające podległy materiał...
- dodano 150 µl bufora...
- roztwór frakcje łączony przez...
- wlewano 50 ml 1-propanolu...
- roztwór dobowany...
- osadzone osuszone...

4.2.14 Radioizotopowa analiza...

Do roztworu dodano 100 µl 100 mg/ml RNA i izolowano RNA o podległym...
Kształtując na lodzie. Rozkład w temperaturze pokojowej...
a) Tablica 6

Tablica 6. Radioizotopowa analiza...

składnik
bufor do frakcjonowania
ATP
RNA
linny polinukleotyd 5'
H ₂ O

- Słabo bufor do frakcjonowania...
- mieszanie inkubowane...
- wyznaczony radioizotopowy...
- następnego dnia mieszany...
- $\lambda = 200$
- przy użyciu licznika...
- wprowadzonego do...

4.2.15 Oczyszczanie RNA metodą fenol-chloroform

- mieszaninę reakcyjną rozcieńczano do objętości 200 μ l i dodawano po 100 μ l fenolu i chloroformu
- wytrząsano na wortexie i wirowano 1 min. z prędkością 14 000 rpm
- zawierającą kwas nukleinowy fazę wodną przenoszono do nowej probówki i dodawano 200 μ l chloroformu, wytrząsano na wortexie i wirowano 1 min. z prędkością 14 000 rpm (dwukrotnie)
- do otrzymanej po ekstrakcji fazy wodnej dodawano 20 μ l 3M CH₃COONa pH 5,0 i 660 μ l 96% etanolu
- roztwór inkubowano przez noc w -20°C
- wirowano 20 min. z prędkością 14 000 rpm
- roztwór dekantowano, a osad przemywano 500 μ l 70% etanolu
- wirowano 20 min. z prędkością 14 000 rpm
- roztwór dekantowano, a osad suszono i rozpuszczano w 20 μ l H₂O
- stężenie oczyszczonego DNA bądź RNA określano mierząc absorpcję promieniowania UV dla $\lambda = 260$
- przy użyciu licznika scyntylicyjnego Beckman mierzono ilość materiału radioaktywnego wprowadzonego do RNA

4.2.16 Selekcja aptamerów RNA wobec białek (HIV-RT i rybonukleazy Dicer)

Reakcję przeprowadzano w objętości 100 μ l w mieszaninie o składzie podanym w Tabeli 7; używano 10-krotny molowy nadmiar RNA w stosunku do białka.

Tabela 7. Reakcja wiązania RNA z białkami - skład mieszaniny.

składnik	ilość
RNA	250 pmoli
białko	25 pmoli
bufor 2x	50 μ l
H ₂ O	uzupełniano do 100 μ l

- wyznakowany RNA ogrzewano 2 minuty w 95°C, następnie wolno schładzano do osiągnięcia temperatury pokojowej, składniki dodawano jak w Tabeli 7
- reakcję prowadzono 5 minut w temperaturze 37°C
- kompleksy RNA-białko przemywano 5 ml buforu wiążącego na sitach molekularnych 30 kDa Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter Devices firmy Millipore (objętość 4 ml) poprzez wirowanie z prędkością 4000 rpm, w 4°C
- pozostałe na filtrze kompleksy RNA – białko przenoszono do nowej probówki i rozbijano stosując 200 μ l 7M mocznika i 400 μ l fenolu, całość wytrząsano przy prędkości 1400 obr./min., 20 min. w temperaturze pokojowej

- następnie wirowano 10 min. w temperaturze pokojowej przy prędkości 12000 rpm
- do otrzymanej po ekstrakcji fazy wodnej dodawano 0,1 obj. 3M CH₃COONa i 3 obj. 96% etanolu
- roztwór inkubowano przez noc w (-20°C)
- wirowano 20 min. z prędkością 1400 rpm
- roztwór dekantowano, a osad przemywano 500 µl 70% etanolu
- wirowano 20 min. z prędkością 14 000 rpm
- roztwór dekantowano, a osad suszono i rozpuszczano w 20 µl H₂O
- mierzono ilość materiału radioaktywnego obecnego w zawężonej puli RNA, który został odmyty z kompleksu z białkiem

4.2.17 Odwrotna transkrypcja

Do RNA rozpuszczonego w 30 µl H₂O dodawano 6 µl startera o stężeniu 25 pmoli/µl, inkubowano 3 minuty w 65°C i schładzano 10 minut w 4°C. Następnie przygotowywano mieszaninę reakcyjną o składzie podanym w Tabeli 8. 35 µl tej mieszaniny przenoszono do probówki zawierającej RNA z odpowiednim starterem. Odwrotną transkrypcję przeprowadzano w 42°C przez 1,5h.

Tabela 8. Odwrotnej transkrypcji - skład mieszaniny reakcyjnej.

składnik	stężenie początkowe	stężenie końcowe
Tris pH 8.0	1M	0,1 M
KCl	1M	0,1 M
MgCl ₂	200 mM	20 mM
DTT	80 mM	8 mM
dNTP	2,5 mM	1 mM
M-MuLV-RT (200U/µl)	0,5 µl	2,5U
H ₂ O	uzupełniano do 40 µl	

4.2.18 Analiza kwasów nukleinowych w żelach poliakrylamidowych

Produkty reakcji RT, PCR, transkrypcji *in vitro* oraz trawienia enzymami poddawano analizie elektroforetycznej w żelach poliakryloamidowych.

Tabela 9. Przygotowanie żeli poliakryloamidowych

wymiary żelu [mm]	6%, 8%, 10%, 12%, 15% roztwór poliakryloamidu*	APS	TEMED
180 x 195 x 1	45ml	200 µl	12 µl
300 x 400 x 0.5	120 ml	450 µl	30 µl

* roztwór poliakryloamidowy w przypadku denaturujących żeli poliakryloamidowych zawierał 7 M mocznik

- DNA oczyszczane metodą fenol-chloroform (rozdział 4.2.15) lub metodą elektroforezy w żelach poliakryloamidowych (rozdział 4.2.18) rozpuszczano w buforze UD do uzyskania końcowego stężenia 1x
- tak przygotowane preparaty denaturowano
- rozdział prowadzono w żelu poddanym wcześniejszej preelektroforezie, przy natężeniu 10 mA i napięciu 100 - 200 V (max 25 W w przypadku użycia małych szyb o wymiarach 180 x 196 x 1mm oraz max 50 W - w przypadku użycia dużych szyb – 400 x 325 x 0,5 mm); po wejściu preparatów w żel, natężenie podwyższano do 40mA, a napięcie do 500 V (max 25 W) dla małych żeli oraz natężenie do 40 mA, a napięcie do 1500 V (max 50 W) dla dużych żeli; jako wzorców długości używano odpowiednich długości ssDNA, wyznakowanych radioizotopowo (³²P) na końcu 5'
- produkty rozdziału elektroforetycznego analizowano przy użyciu skanera materiałów znakowanych radioizotopowo (Phosphorimager, Typhoon 8600)

4.2.19 Trawienie dsDNA enzymami restrykcyjnymi

Reakcję prowadzono w objętości 100 µl, w mieszaninie reakcyjnej, której skład przedstawiony został w Tabeli 10.

Tabela 10. Trawienie dsDNA enzymami restrykcyjnymi - skład mieszaniny reakcyjnej.

składnik	ilość
bufor 10x	1x
DNA	5-10 µg
Enzym restrykcyjny (EcoRI, PstI)	~ 60U
H ₂ O	do 100 µl

- mieszaninę reakcyjną inkubowano przez 4h w temperaturze 37°C
- produkt reakcji oczyszczano zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 4.2.15 lub 4.2.18
- produkty reakcji analizowano w 1% żelu agarozowym.

4.2.20 Analiza produktów trawienia w żelu agarozowym

- produkty reakcji trawienia enzymami restrykcyjnymi (rozdział 4.2.19) rozpuszczano w 20 µl H₂O
- pobierano 1 µl próbki i dodawano do niej H₂O i bufor BJ (1/6 obj.) do końcowej objętości 10 µl
- całość poddawano analizie metodą elektroforezy w żelu agarozowym (1% w przypadku produktów o długości powyżej 300 pz oraz 1,5% w przypadku produktów krótszych); jako wzorec długości DNA używano 2 µg 0,1 kB (w przypadku krótkich cząsteczek DNA - poniżej 1000 pz) lub 1 kB (w przypadku długich cząsteczek DNA - powyżej 1000 pz)
- rozdział prowadzono przy natężeniu 40 – 50 mA i napięciu 120-130 V

- DNA oczyszczane metodą fenol-cholesterolu (rozdział 4.2.15) lub metodą cholesterolu w etanolu
- polikaliominy (rozdział 4.2.18) rozpuszczone w buforze LB do uzyskania końcowego stężenia 1x
- tak przygotowane preparaty dezamoniowane
- analiza prowadzona w celu badania wodorotlenkowej fenolizacji, przy napięciu 10 mA i napięciu 100 - 200 V (max 22 W w przypadku napięcia napięć napięć 180 x 1 mm oraz max 30 W - w przypadku napięć napięć napięć 400 x 252 x 0,2 mm); po wejściu prądu w cel, napięcie podwyższano do 40 mA, a napięcie do 300 V (max 22 W) dla napięć napięć napięć do 40 mA, a napięcie do 1200 V (max 20 W) dla napięć napięć napięć napięć
- używano odpowiednich długości sekwencji, wyznaczonych tabelizowano (T) na koniec 2
- produkty reakcji elektroforezy analizowano przy użyciu kwasu mianowego znakowanych indolizopiryn (PhosphorImage Typhoon 9000)

4.2.19 Testowanie jakości DNA czynnikiem reakcyjnym

Reakcję prowadzono w objętości 100 µl, w następujących warunkach: 10 min przy 65°C, 10 min przy 70°C

Tabela 10. Testowanie jakości czynnika reakcyjnego - skład mieszaniny reakcyjnej

składnik	ilość
bufor 10x	1x
DNA	2-10 µg
Enzym reakcyjny (EcoRI 7x)	~ 60U
H ₂ O	do 100 µl

- mieszankę reakcyjną inkubowano przez 4h w temperaturze 37°C
- produkty reakcji oczyszczano zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 4.2.15 lub 4.2.18
- produkty reakcji analizowano w 1% żelu agarozowym

4.2.20 Analiza produktów trawienia w żelu agarozowym

- produkty reakcji trawienia czynnikiem reakcyjnym (rozdział 4.2.19) rozpuszczano w 20 µl H₂O
- rozpisano 1 µl próbki i dodawano do niej H₂O / bufor BI (10 µl) do końcowej objętości 10 µl
- celowo prowadzono analizę trawienia w żelu agarozowym (1% w przypadku produktów o długości powyżej 300 pb oraz 1,5% w przypadku produktów krótszych); jako wzorce długości DNA używano 2 µg 0,1 kb (w przypadku krótkich cząstek DNA - poniżej 1000 pb) lub 1 kb (w przypadku długich cząstek DNA - powyżej 1000 pb)
- rozdział prowadzono przy napięciu 40 - 50 mA i napięciu 120-130 V

- produkty rozdziału elektroforetycznego wybarwiano w wodnym roztworze bromku etydyny przez 1h i analizowano w świetle UV

4.2.21 Ligacja

Przygotowywano mieszaninę reakcyjną, której skład podano w Tabeli 11. Do reakcji ligacji wykorzystywano dwukrotny, pięciokrotny i dziesięciokrotny nadmiar insertu w stosunku do wektora. Mieszaninę reakcyjną inkubowano 12h w temperaturze 16°C.

Tabela 11. Ligacja - skład mieszaniny reakcyjnej.

składnik	ilość
bufor 10x	1 μ l
wektor	0.1 μ g
insert (dsDNA)	stosunek molowy wynosi 1:2, 1:5 i 1:10 wektora do insertu
Ligaza T4 DNA (1U/1 μ l)	1 μ l
H ₂ O	uzupełniano do 10 μ l

4.2.22 Sekwencjonowanie

Reakcje sekwencjonowania plazmidów wykonywano przy użyciu ABI PRISM® Big Dye™ Terminator Ready Reaction Cycle Sequencing Kit. Reakcję prowadzono w objętości 10 μ l, skład mieszaniny reakcyjnej podano w Tabeli 12.

Tabela 12. Reakcja sekwencjonowania - skład mieszaniny reakcyjnej.

składnik	ilość
Terminator Ready Reaction Mix	2 μ l
starter F19	3,2 pmola
matrycy (plazmidowy DNA)	200-500 ng
H ₂ O	uzupełniono do 10 μ l

Reakcje sekwencjonowania prowadzono zgodnie z opisem zamieszczonym w Tabeli 13.

Tabela 13. Warunki reakcji sekwencjonowania plazmidów.

ETAP	TEMPERATURA	CZAS	ILOŚĆ POWTÓRZEŃ
Denaturacja	96°C	1 min	1
Denaturacja	96°C	10 sec	30
Hybrydyzacja	50°C	10 sec	
Elongacja	60°C	2min	
Elongacja końcowa	72°C	5 min	1

Oczyszczanie produktów reakcji sekwencjonowania:

- do 10 µl mieszaniny reakcyjnej dodawano 2 µl 3M octanu sodu pH 4,6 i 2 µl 125 mM EDTA, a następnie 50 µl 96% etanolu
- inkubowano 15 min. na lodzie
- wirowano 30 min. z prędkością 13000 rpm w temp. 4°C
- roztwór dekantowano, a osad przemywano 200 µl 70% etanolu
- wirowano 15 min. z prędkością 13000 rpm, w temp. 4°C
- roztwór dekantowano, a osad osuszano
- osad rozpuszczano w 10 µl formamidu
- próbkę denaturowano ogrzewając 3 min. w temp. 96°C i gwałtownie schładzając na lodzie
- sekwencjonowanie przeprowadzano w sekwenatorze ABI-PRISM

4.2.23 Określanie stałej dysocjacji kompleksów HIV-1 RT-aptamer

Reakcję przeprowadzano w objętości 10 µl. Aptamer (1 pmol), wyznakowany radioizotopowo na końcu 5', inkubowano ze zwiększającymi się stężeniami odwrotnej transkryptazy wirusa HIV-1.

- wyznakowany RNA ogrzewano 2 min. w 95°C, następnie renaturowano wolno schładzając do osiągnięcia temperatury pokojowej
- przygotowywano mieszaninę reakcyjną (skład podano w Tabeli 14) inkubowano 30 min. w 37°C

Tabela 14. Określanie stałej dysocjacji kompleksów RNA-białko - skład mieszaniny.

	kontrola (-)	1	2	3	4
aptamer	1 pmol	1 pmol	1 pmol	1 pmol	1 pmol
HIV-1 RT (6,5 µM)	-----	1 µl	3 µl	5 µl	7 µl
bufor 5x*	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
H ₂ O	do 10 µl	do 10 µl	do 10 µl	do 10 µl	do 10 µl

* skład buforu: 50 mM Tris-HCl pH 7,7, 200 mM octan potasu, 10 mM DTT

Tablica 13. Wzrostki i ich wysewki

STADIUM	WZROSTKI
Wzrostki	100%
Wzrostki	100%
Wzrostki	100%
Wzrostki	100%
Wzrostki	100%

Wzrostki i ich wysewki

– do 10 dni

– do 20 dni

– do 30 dni

– do 40 dni

– do 50 dni

– do 60 dni

– do 70 dni

– do 80 dni

– do 90 dni

– do 100 dni

– do 110 dni

– do 120 dni

– do 130 dni

– do 140 dni

– do 150 dni

– do 160 dni

– do 170 dni

– do 180 dni

– do 190 dni

– do 200 dni

– do 210 dni

– do 220 dni

– do 230 dni

– do 240 dni

– do 250 dni

– do 260 dni

– do 270 dni

– do 280 dni

- kompleksy HIV-1 RT-aptamer nakładano na 6% żel poliakryloamidowy, przeznaczony do rozdzielania w warunkach natywnych
- rozdzielanie prowadzono przy 200 V i 40 mA, przez 1,5 h
- produkty reakcji po rozdzielaniu elektroforetycznym analizowano wykorzystując skaner materiałów znakowanych radioizotopowo (Phosphorimager, Typhoon 8600)

4.2.24 Określanie stałej dysocjacji kompleksów Dicer-aptamer

- aptamery wyznakowane radioizotopem $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP na końcu 5' (rozdział 4.2.14) podgrzewano do 95°C, następnie renaturowano schładzając powoli do 37°C
- Dicer preinkubowano 10 minut w temperaturze pokojowej, a następnie 20 minut w 4°C w buforze o składzie 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 1 mM ATP
- dodawano ~5 pmol wyznakowanego na końcu 5' aptameru, inkubowano 15 minut w 4°C
- do mieszaniny dodawano 0,1 objętości 60% glicerolu z barwnikami (0,04% błękit bromofenolowy, 0,04% fiolet ksylenowy)
- próbki rozdzielano w 8% natywnym żelu poliakryloamidowym w buforze 1xTB, elektroforezę prowadzono 3h w 4°C przy 20 mA, 500 V

4.2.25 Badanie wpływu aptamerów na aktywność nukleazową HIV-1 RT

Wpływ aptamerów na aktywność RNazową HIV-1 RT badano inkubując kompleks enzym:aptamerem z dupleksem RNA/DNA, w którym koniec 5' nici RNA był wyznakowany radioizotopowo. Reakcje prowadzono w objętości 10 μl w komercyjnym buforze do Mu-MLV RT. Reakcję inicjowano przez dodanie dupletu RNA/DNA.

Na wstępie przeprowadzono hybrydyzację wyznakowanych cząsteczek ($\gamma^{32}\text{P}$)Hyb18RNA (3 pmole) z komplementarnymi, nie wyznakowanymi cząsteczkami Hyb18DNA (9 pmoli), podgrzewano je w 95°C przez 3 minuty, a następnie wolno schładzano do 37°C.

Aptamery renaturowano, a następnie inkubowano z enzymem 15 minut w 37°C, w objętości 10 μl buforu o składzie: 50 mM Tris-HCl pH 8; 60 mM KCl; 2,5 mM MgCl_2 , po czym dodawano heteroduplex DNA/RNA i kontynuowano inkubację w 37°C przez kolejne 20 minut (Tabela 15).

- kompleksy HIV-1 RT-quantum analizowano za pomocą polikrylamidowy, przeznaczony do rozbicia w warunkach natywnych

- kontrola prowadzona przy 300 V i 40 mA, przez 1,5 h

- produkty reakcji po rozkładzie elektroforetycznym analizowano wykorzystując skaner materiałów radiolabelowanych (PhosphorImager Typhoon 5000)

4.2.34 Określenie aktywności dysocjacji kompleksów Dicer-aptamer

- aptamer wyznaczano reakcją z substratem γ -³²P-ATP na końcu 3' (metoda 4.2.14) podgrzewano do 95°C, następnie trawiono schładzając powoli do 37°C

- Dicer trawiono 10 minut w temperaturze pokojowej z następnym 30 minut w 4°C w buforze o składzie 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 30 mM KCl, 10 mM DTT, 1 mM ATP

- dodawano 2-punktowy wzyciowy na końcu 3' fragment, inkubowano 15 minut w 4°C

- do mieszaniny dodawano 0,1 objętości 60% glicerinu z równianiem 10,04% białka przeciwciałowego (0,04% BSA (złoty standard))

- produkt trawienia w 80% gęstości w celu podwyższenia w buforze 1xTBE, elastyczny prowadzący 3x w 4°C przy 30 mA, 200 V

4.2.35 Badanie wpływu pH na aktywność nukleazy HIV-1 RT

Wpływ pH na aktywność RNAzomy HIV-1 RT badano mieszając kodujące enzymogramem z buforem RNAzomy, w którym koniec 3' nici RNA był wyznaczony radiolabelowo. Reakcję prowadzono w objętości 10 µl w temperaturze pokojowej do 30-60 min RT. Reakcję inkubowano przez dalsze 30 minut w 37°C.

Na koniec przeprowadzono hydrolyzacje enzymatyczną cząstek γ -³²P-ATP (9 pmol), 0,1 pmol) z kompleksami, nie wyznaczonymi cząstkami γ -³²P-ATP (9 pmol), podgrzewano je w 95°C przez 3 minuty, a następnie wolno schładzano do 37°C.

Aptamer trawiono, a następnie inkubowano z celem 15 minut w 37°C, w objętości 10 µl buforu o składzie 50 mM Tris-HCl pH 8, 60 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂ po czym dodawano bezcukrową DNAzomy i kontynuowano inkubację w 37°C przez kolejne 30 minut (Tabela 15).

Tabela 15. Testowanie aktywności nukleazowej - preinkubacja aptamerów z HIV-1 RT.

	MD16 1/2/3/4	ATH1 1/2/3/4	ATH1.1 1/2/3/4	ATH1.2 1/2/3/4	kontrola (+)	kontrola (-)
($\gamma^{32}\text{P}$)Hyb18RNA/DNA (3 pmole)	2 μl	2 μl	2 μl	2 μl	2 μl	2 μl
5x bufor Mu-MLV	2 μl	2 μl	2 μl	2 μl	2 μl	2 μl
H ₂ O	4 μl	4 μl	4 μl	4 μl	5 μl	6 μl
MD16	1 μl	-	-	-	-	-
ATH1	-	1 μl	-	-	-	-
ATH1.1	-	-	1 μl	-	-	-
ATH1.2	-	-	-	1 μl	-	-
HIV-1 RT (3pmole/ μl)	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl	-

* dla każdego aptameru wykonano po 4 próby różniące się stosunkiem ilościowym aptamer/HIV-1RT, odpowiednio w seriach oznaczonych numerem 1, wynosił on 1:3; w seriach 2 - 1:1; w seriach 3 - 4:1, w seriach 4 - 50:1

- reakcję trawienia zatrzymywano przez dodanie barwnika UD, całość denaturowano i następnie nakładano na 12% denaturujący żel poliakrylamidowy
- rozdział elektroforyczny prowadzono w następujących warunkach:
 - preelektroforeza - 1200 V, 50 W, 10 mA przez 10 – 15 min
 - elektroforeza właściwa – 1200 V, 50 W, 40 mA przez 2 - 2,5h;
- produkty reakcji trawienia rozdzielano metodą elektroforezy w denaturującym żelu poliakryloamidowym i analizowano z pomocą skanera materiałów znakowanych radioizotopowo (Phosphorimager, Typhoon 8600)

4.2.26 Badanie aktywności RNazowej Mu-MLV RT i RNazy H z *E.coli* w obecności aptamerów

Badania wpływu aptamerów na aktywność nukleazową Mu-MLV RT i RNazy H pochodzącej z *E. coli* przeprowadzono według analogicznej procedury jak dla HIV-1 RT (rozdział 4.2.23), z tą różnicą, że dla każdego aptameru wykonano po 3 próby różniące się ilością aptameru, odpowiednio w reakcjach oznaczonych numerem 1 wynosił on 50 pmoli, numerem 2 - 150 pmoli, numerem 3 - 300 pmoli.

4.2.27 Badanie wpływu aptamerów na aktywność polimerazową HIV-1 RT

Wpływ aptamerów na aktywność polimerazową HIV-1 RT badano wykorzystując jako matryce jednoniciowe DNA (HELPERd1-DNA) i RNA (HELPERd1-RNA) (rozdział 4.1.1). Reakcje prowadzono w objętości 40 μl w komercyjnym buforze do Mu-MLV RT. Na wstępie przeprowadzono inkubację różnej ilości aptamerów (3 i 300 pmoli dla matrycy RNA i 3, 15 i 300 pmoli dla matrycy DNA) z enzymem.

Tabela 16. Testowanie aktywności polimerazowej - preinkubacja aptamerów z HIV-1 RT.

	MD16 1/2/3	ATH1 1/2/3	ATH1.1 1/2/3	ATH1.2 1/2/3	kontrola (+)
5xbufor Mu-MLV	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l
H ₂ O	6 μ l	6 μ l	6 μ l	6 μ l	6 μ l
MD16	1 μ l	-	-	-	-
ATH1	-	1 μ l	-	-	-
ATH1.1	-	-	1 μ l	-	-
ATH1.2	-	-	-	1 μ l	-
HIV-1 RT (3pmole)	1 μ l	1 μ l	1 μ l	1 μ l	1 μ l

Następnie 10 pmoli matrycy EtoE-d1 i 30 pmoli startera EtoE-p denaturowano w 20 μ l buforu do Mu-MLV, dodawano aptamer z enzymem, a reakcję inicjowano przez dodanie mieszaniny deoksyrybonukleotydów (dATP, dGTP, dTTP – 0,25 mM, dCTP – 0,125 mM) i wyznakowanego radioizotopowo α^{32} P-dCTP. Mieszaninę reakcyjną inkubowano przez 1h w 45°C, w buforze o składzie 50 mM Tris-HCl pH 8; 60 mM KCl; 2,5 mM MgCl₂. Reakcję polimeryzacji zatrzymywano przez dodanie buforu UD, produkty denaturowano przez podgrzanie do 95°C przez 5 minut i gwałtowne schłodzenie na lodzie, następnie próbki rozdzielano w 12% denaturującym żelu poliakrylamidowym. Rozdział elektroforetyczny prowadzono w następujących warunkach:

- preelektroforeza - 1200 V, 50 W, 10 mA przez 10 - 15min
- elektroforeza właściwa – 1200 V, 50 W, 40 mA przez 2 - 2,5h

Produkty reakcji wydłużania startera po rozdziale elektroforetycznym analizowano z użyciem skanera materiałów znakowanych radioizotopowo (Phosphorimager, Typhoon 8600).

4.2.28 Badanie aktywności rekombinacyjnej HIV-1 RT w obecności aptamerów

Wpływ aptamerów na aktywność rekombinacyjną HIV-1 RT badano wykorzystując uniwersalny system oparty na matrycach pochodzących z niekodujących rejonów wirusa mozaiki stokłosa (BMV). W doświadczeniach wykorzystywano jednoniciowe matryce RNA: BMV-R-donor o długości 225 nt (BMV-R-D) i BMV-R-akceptor o długości 216 nt (BMV-R-A). Reakcje prowadzono w objętości 40 μ l w komercyjnym buforze do Mu-MLV RT. Donor, akceptor oraz starter ogrzewano 3 minuty w 95°C, po czym powoli schładzano do temperatury 37°C, całość przygotowywano według schematu przedstawionego w Tabeli 17.

Tablica 16. Testowanie aktywności polimerizacji - podłożeniowa specyficzność HIV-1 RT

Substrat	AKTYWNOŚĆ (U/ml)	AKTYWNOŚĆ (U/ml)	AKTYWNOŚĆ (U/ml)	AKTYWNOŚĆ (U/ml)
HIV-1 RT (kontrola)	1,00	1,00	1,00	1,00
ATH1.2	-	-	-	-
ATH1.1	-	-	-	-
ATH1	-	-	-	-
MID1	1,00	1,00	1,00	1,00
H2O	0,00	0,00	0,00	0,00
Substrat 3A-MLV	1,00	1,00	1,00	1,00

Następnie 10 pmoli manganicy Euk-41 / 30 pmoli tlenku Euk-41 dodano do mieszaniny substratu do Mu-MLV, dodano reagent z enzymem i reakcję rozpoczęto mieszając doaktywizowanych (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) i wywołanego imidazoprowo α -³²P-dCTP. Mieszaninę kontrolną przygotowano w 45°C w buforze o składzie 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM MgCl₂ i 10 mM DTT (polimerizacja) zmieszano przez dodanie 100 pmoli doaktywizowanego podłożenia do 92°C przez 2 minuty i ewentualnie odłożono na lodzie. Reakcję zakończono w 12% denaturacji żelu poliakrylamidowym. Reakcje elektroforezowe wykonano w następujących warunkach:

- polimerizacja - 1500 V, 50 W, 10 mA przez 10-15 min

- elektroforeza w kierunku - 1300 V, 50 W, 40 mA przez 2-3 h

Produkty reakcji wyeluzowano z żelu i wyodrębniono frakcje zawierające produkty reakcji i analizowano je za pomocą spektrometrii masowej.

4.2.58 Badanie aktywności rekombinacyjnej HIV-1 RT w obecności podłoża

Wzrost aktywności rekombinacyjnej HIV-1 RT w obecności podłoża umiarkowany system oparty na reakcjach podobnych z wykorzystaniem tlenku Euk-41 (kontrola) (BMV). W doświadczeniach wykorzystywano jednowymiarowe podłoża (BMV) o długości 252 nt (BMV-R-D) i BMV-R-akceptor o długości 116 nt (BMV-R-V). Reakcję przygotowano w objętości 40 μ l w komercyjnym buforze do Mu-MLV RT (Promo) zawierającym 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM MgCl₂ i 10 mM DTT. Reakcję przeprowadzono w 45°C przez 2 minuty w 92°C po czym powoli schładzano do temperatury 12°C. Całkowitą objętość reakcji schładzano w Tablicy 17.

Tabela 17. Testowanie wpływu aptamerów na aktywność rekombinacyjną HIV-1 RT - przygotowanie substratów.

	MD16 1/2	ATH1 1/2	ATH1.1 1/2	ATH1.2 1/2	kontrola (+)
matryca BMV-R-D 0,1µg/µl (10 pmoli)	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
matryca BMV-R-A 0,48µg/µl (50 pmoli)	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
starter BMV3REC 0,3µg/µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
5x bufor Mu-MLV	6 µl	6 µl	6 µl	6 µl	6 µl
H ₂ O	12 µl	12 µl	12 µl	12 µl	12 µl

Równolegle przeprowadzono 20 minutową preinkubację różnej ilości aptamerów (3 i 300 pmoli) z HIV-1 RT w temperaturze 37°C według schematu przedstawionego w Tabeli 18.

Tabela 18. Testowanie wpływu aptamerów na aktywność rekombinacyjną HIV-1 RT - preinkubacja aptamerów z HIV-1 RT.

	MD16 1/2	ATH1 1/2	ATH1.1 1/2	ATH1.2 1/2	kontrola (+)
5x bufor Mu-MLV	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
H ₂ O	7 µl	7 µl	7 µl	7 µl	7 µl
MD16	1 µl	-	-	-	-
ATH1	-	1 µl	-	-	-
ATH1.1	-	-	1 µl	-	-
ATH1.2	-	-	-	1 µl	-
HIV-1RT (3pmole/µl)	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl

Aptamery z HIV-1 RT mieszano następnie z donorem, akceptorem i starterem, a reakcję inicjowano przez dodanie do mieszaniny reakcyjnej miksu deoksyrybonukleotydów (dATP, dGTP, dTTP – 0,25 mM, dCTP – 0,125 mM) i wyznakowany radioizotopowo $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP. Całość inkubowano przez 1h w 45°C. Reakcję polimeryzacji zatrzymywano przez dodanie buforu UD, całość denaturowano przez podgrzanie do 95°C przez 5 minut i gwałtowne schłodzenie 5 minut na lodzie, próbki rozdzielano w 10% denaturującym żelu poliakrylamidowym. Rozdział elektroforetyczny prowadzono w następujących warunkach:

- preelektroforeza – 1200 V, 50 W, 10 mA przez 10 - 15min
- elektroforeza właściwa – 1200 V, 50 W, 40 mA przez 2 - 2,5h

Produkty reakcji po rozdziale elektroforetycznym analizowano wykorzystując skaner materiałów znakowanych radioizotopowo (Phosphorimager, Typhoon 8600).

Tabela 17. Testowanie wpływu opóźnienia na efektywność inhibicji HIV-1 RT - przygotowanie substratów.

Substrat	0 min	15 min	30 min	45 min	60 min
substrat M4-MLV	100	100	100	100	100
substrat M4-MLV (0,25 μg/ml)	100	100	100	100	100
substrat M4-MLV (0,50 μg/ml)	100	100	100	100	100
substrat M4-MLV (0,75 μg/ml)	100	100	100	100	100
substrat M4-MLV (1,00 μg/ml)	100	100	100	100	100
substrat M4-MLV (1,25 μg/ml)	100	100	100	100	100

Koncentracje przygotowane 50 minutową postawę reakcji równowagi (0,25 μg/ml) z HIV-1 RT w temperaturze 37°C według schematu przedstawionego w Tabeli 18.

Tabela 18. Testowanie wpływu opóźnienia na efektywność inhibicji HIV-1 RT - postawienie opóźnienia z HIV-1 RT.

Substrat	0 min	15 min	30 min	45 min	60 min
HIV-1 RT (Opóźnienie)	100	100	100	100	100
ATB1			100		
ATB2			100		
ATB3			100		
ATB4			100		
MDR1			100		
H ₂ O	100	100	100	100	100
substrat M4-MLV	100	100	100	100	100

Opóźnienie z HIV-1 RT następuje natychmiast z momentem, w którym substrat i enzym są w kontakcie. Aby przetestować to założenie, przygotowano reakcje równowagi z substratami (ATB1, ATB2, ATB3, ATB4, MDR1) z HIV-1 RT w temperaturze 37°C. Reakcje równowagi przygotowano przez dodanie substratu do przygotowanego wcześniej HIV-1 RT. Całkowite inkubowanie przez 15 min. (ATB1 - 0,155 μM) i wyznaczenie równowagi z substratami (ATB1, ATB2, ATB3, ATB4, MDR1) w 45°C. Reakcje równowagi przygotowano przez dodanie substratu do przygotowanego wcześniej HIV-1 RT. Całkowite inkubowanie przez 15 min. w 45°C. Aby przetestować to założenie, przygotowano reakcje równowagi z substratami (ATB1, ATB2, ATB3, ATB4, MDR1) z HIV-1 RT w temperaturze 37°C. Reakcje równowagi przygotowano przez dodanie substratu do przygotowanego wcześniej HIV-1 RT. Całkowite inkubowanie przez 15 min. w 45°C.

W następujących warunkach:
 - przygotowanie - 1200 V, 50 W, 10 min przez 10 - 15 min
 - elektroforaza właściwa - 1200 V, 50 W, 40 min przez 1 - 1,5 h
 Próbki zostały po zakończeniu elektroforazy analizowane wykrzywką stancjogramów metodą transformacji (PhosphorImager, Typhoon 8600).

4.2.29 Trawienie aptamerów rybonukleazą Dicer

Aptamery na wstępie podgrzewano do 95°C, następnie renaturowano powoli schładzając do 37°C. Zrenaturowane cząsteczki, wyznakowane radioizotopem $\gamma^{32}\text{P-ATP}$ na końcu 5' inkubowano z enzymem w czasie 10 minut, 1h, 2h, 5h i 16h w buforze komercyjnym dla Dicer. Skład mieszaniny reakcyjnej podano w tabeli 19.

Tabela 19. Cięcie aptamerów przez Dicer - skład mieszaniny.

	kontrola (-)	1	2	3	4
aptamer	10000 cpm	10000 cpm	10000 cpm	10000 cpm	10000 cpm
Dicer	-----	1 U	1 U	1 U	1 U
bufor 5x*	2 μl	2 μl	2 μl	2 μl	2 μl
H ₂ O	do 10 μl	do 10 μl	do 10 μl	do 10 μl	do 10 μl

* skład buforu: 300 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 20 mM HEPES, 5 mM MgCl₂, pH 9,0

- całość denaturowano poprzez ogrzewanie w 95°C przez 5 minut i gwałtowne schłodzenie na lodzie, następnie rozdzielano w 15% denaturującym żelu poliakrylamidowym
- rozdział elektroforetyczny prowadzono w następujących warunkach:
 - preelektroforeza - 1200 V, 50 W, 10 mA przez 10 - 15min
 - elektroforeza właściwa - 1200 V, 50 W, 40 mA przez 4h
- produkty reakcji po rozdziale elektroforetycznym analizowano wykorzystując skaner materiałów znakowanych radioizotopowo (Phosphorimager, Typhoon 8600)

4.2.30 Trawienie RNA rybonukleazą T1

- aptamery wyznakowane radioizotopem $\gamma^{32}\text{P-ATP}$ na końcu 5' na wstępie podgrzewano do 95°C, następnie renaturowano powoli schładzając do 37°C
- dodawano 1 μl buforu (10x Structure Buffer, Ambion), wyznakowany RNA (~5 pmol), 1 μg drożdżowego RNA, 0,1 U rybonukleazy T1 i wodę do końcowej objętości 10 μl , dokładnie wymieszano i zwirowano
- mieszaniny reakcyjne inkubowano 15 minut w temperaturze pokojowej
- następnie dodawano 20 μl buforu inaktywująco-precypitującego, dokładnie mieszano, wirowano i inkubowano 15 minut w -20°C
- wirowano 15 minut przy 13 200 rpm, supernatant dekantowano, a osad przemywano 70% etanolem
- osad suszono wykorzystując speed-vac i rozpuszczano w 7 μl buforu denaturującego do nakładania próbek na żel poliakryloamidowy
- RNA denaturowano i nakładano na 16% denaturujący żel poliakryloamidowy (4.2.18)

4.2.31 Hydroliza alkaliczna RNA

- do aptameru wyznakowanego radioizotopem $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP na końcu 5' (~10 pmol) dodawano 2 μg drożdżowego RNA w objętości nie większej niż 5 μl (ewentualnie dopełniano wodą do 5 μl) i 10 μl buforu do hydrolizy alkalicznej 1x (Ambion)
- ogrzewano 4 minuty w 95°C
- dodawano po 10 μl buforu denaturującego do nakładania próbek na żel poliakrylamidowy
- RNA denaturowano i nakładano całość na 16% denaturujący żel poliakrylamidowy (4.2.18)

4.2.32 Badanie wpływu aptamerów na aktywność ludzkiej rybonukleazy Dicer

Wpływ aptamerów na aktywność Dicer badano wykorzystując jako substraty ludzkie prekursorzy mikroRNA – hsa-miR-33 i hsa-miR210 (rozdział 4.1.1). Reakcje prowadzono w objętości 10 μl w komercyjnym buforze dla rybonukleazy Dicer. Do reakcji wykorzystywano wyznakowane na końcu 5' cząsteczki pre-miRNA. Na wstępie renaturowano wyznakowane substraty oraz aptamery. Następnie przeprowadzano wstępną inkubację różnej ilości aptamerów z enzymem (w stosunku molowym aptamer:Dicer 1:1, 10:1 i 100:1). Reakcję hydrolizy prowadzono 10 minut w temperaturze 37°C. Dla każdego aptameru wykonywano po trzy powtórzenia każdej reakcji. W przypadku aptameru ATD15.52 dodatkowo przeprowadzano reakcje bez wstępnej inkubacji aptamer-Dicer, inkubując mieszaninę reakcyjną przez 10 minut i przez 1 h w 37°C, wg procedury zamieszczonej w Tabeli 20.

Tabela 20. Testowanie wpływu aptamerów na aktywność Dicer - skład mieszaniny.

	kontrola (+)	kontrola (-)	1	2	3
aptamer	-----	-----	1 μl (1 pmol/ μl)	1 μl (10 pmol/ μl)	1 μl (100 pmol/ μl)
Dicer	1U	-----	1U	1U	1U
substrat	5000 cpm	5000 cpm	5000 cpm	5000 cpm	5000 cpm
Bufor 5x	2 μl	2 μl	2 μl	2 μl	2 μl
H ₂ O	do 10 μl	do 10 μl	do 10 μl	do 10 μl	do 10 μl

* skład buforu – 300 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 20 mM HEPES, 5 mM MgCl₂, pH 9,0

- całość denaturowano poprzez ogrzanie w 95°C przez 5 minut i gwałtowne schłodzenie na lodzie, następnie rozdzielano w 15% denaturującym żelu poliakrylamidowym
- rozdział elektroforetyczny prowadzono w następujących warunkach:
 - preelektroforeza - 1200 V, 50 W, 10 mA przez 10 – 15 min
 - elektroforeza właściwa – 1200 V, 50 W, 40 mA przez 4h
- produkty reakcji po rozdziale elektroforetycznym analizowano wykorzystując skaner materiałów znakowanych radioizotopowo (Phosphorimager, Typhoon 8600)

4.2.31 Hydroliza alkalowa RNA

- do szklanej wyważki włożono 100 mg RNA + objętość wody do 2 ml + 10 µl buforu do hydrolizy alkalowej (1x)
- ogrzewano 4 min w 95°C
- dodano po 10 µl buforu denaturującego do nakładania próbek na żel poliakrylamidowy
- RNA denaturowano i nakładano całość na 10% denaturujący żel poliakrylamidowy (4.2.18)

4.2.32 Badanie wpływu spinów na aktywność indukcyjną Dicer

Wpływ spinów na aktywność Dicer badano wykorzystując jako substrat ludzkie prekursory siRNA – hsa-mir-33 i hsa-mir310 (koordynat 4.1.1). Reakcje prowadzono w objętości 10 µl w komercyjnym buforze dla Dicer (Invitrogen). Do reakcji wykorzystywano wyważone na końcu 2. cząsteczki pre-miRNA. Na koniec testowano wyważone substraty oraz spinery. Następnie przeprowadzono wyważenie i objętość i objętość spinów 2 min w temperaturze 37°C. Dla każdego spinu wyważono po trzy powtórzenia każdej reakcji. W przypadku spinu ATD152 dodawano przeprowadzono reakcje bez węgla indukcyjnego Dicer. Indukcję i aktywność indukcyjną przez 10 min i w 37°C, wg procedury zamieszczonej w Tabeli 20.

Tabela 20. Testowanie wpływu spinów na aktywność Dicer - obłąk mikrosatelit

	kontrola (+)	kontrola (-)	1	2	3
objętość			1 µl	1 µl	1 µl
Dicer	1U	---	1U	1U	1U
substrat	3000 cpm	3000 cpm	3000 cpm	3000 cpm	3000 cpm
bufor 5x	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
H ₂ O	do 10 µl	do 10 µl	do 10 µl	do 10 µl	do 10 µl

* 1 µl bufor - 20 mM Tris-HCl, 20 mM HEPES, 2 mM MgCl₂, pH 8.0

- całość denaturowano poprzez ogrzanie w 95°C przez 5 min i znowo zschłodzono na lodzie
- następnie nakładano w 10% denaturującym żelu poliakrylamidowym
- rozdzielali elektrycznie prowadzono w następujących warunkach:
 - prekathodowa - 1300 V, 30 W, 10 mA przez 10 - 12 min
 - elektroforaza właściwa - 1300 V, 20 W, 40 mA przez 4h
- produkty reakcji po rozdzielaniu elektrycznym analizowano wykorzystując stałą materiałową i tablicę kalibracyjną (PhosphorImager, Typhoon 8000)

4.2.33 Określenie mechanizmu inhibicji Dicer przez aptamery

Mechanizm inhibicji Dicer badano wykorzystując pięciokrotny nadmiar aptameru w stosunku do białka. Na wstępie renaturowano wyznakowane radioizotopowo substraty oraz aptamery. Następnie przeprowadzono pięciogodzinną inkubację aptamerów z Dicer, po czym dodawano substrat hsa-miR-210 i inkubowano kolejne 5h. Równolegle prowadzono reakcje, w których równocześnie podawano aptamer i substrat inkubując całość 5h i 10h. Jako reakcje kontrolne stosowano mieszaniny reakcyjne, w których inkubowano substrat hsa-miR-210 z enzymem przez 5 h i 10h. Reakcje prowadzono w objętości 10 μ l. Całość denaturowano, a następnie rozdzielano w 15% denaturującym żelu poliakrylamidowym. Produkty reakcji hydrolizy po rozdziale elektroforetycznym analizowano wykorzystując skaner materiałów znakowanych radioizotopowo (Phosphorimager, Typhoon 8600).

4.2.34 Analiza bioinformatyczna

W celu wyszukania wspólnych motywów w sekwencjach losowych wyselekcjonowanych aptamerów wykorzystano program MEME wersja 3.5.7 (<http://meme.sdsc.edu/meme/intro.html>) i BioEdit wersja 7.0.5 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Aby określić struktury drugorzędowe aptamerów posłużono się programem RNAstructure wersja 4.5 (<http://rna.urmc.rochester.edu/rnastructure.html>).

Aby stwierdzić, czy krótkie RNA regulujące aktywność rybonukleazy H lub Dicer mogą występować w komórkach ludzkich analizowano podobieństwo sekwencji wyselekcjonowanych aptamerów do wszystkich znanych transkryptów powstających w oparciu o genom człowieka. W tym celu zastosowano program BLAST-N. Wielkość okna przeszukiwania wynosiła 16 nukleotydów.

5. WYNIKI I DYSKUSJA

5.1 Selekcja aptamerów RNA wiążących się z HIV-1 RT i ocena ich właściwości inhibitorowych

5.1.1 Otrzymywanie HIV-1 RT (heterodimeru p66/p51)

Odwrotną transkryptazę HIV-1 (heterodimer p66/p51) produkowano w komórkach bakteryjnych BL21(DE3)LysS, transformowanych wektorem ekspresyjnym pDAR1. W wektorze tym znajdują się dwie otwarte ramki odczytu kodujące podjednostkę p66 (zaopatrzoną w 6. histydynowy ogon na końcu C) i proteazę HIV-1. Obydwa cDNA znajdują się pod kontrolą tego samego promotora polimerazy RNA T7. W wyniku aktywności proteazy około 50% podjednostek p66 pozbawianych jest domeny RNazy H. W rezultacie uzyskuje się obie podjednostki HIV-1 RT: p66 oraz p51.

Komórki *E. coli*, szczep BL21(DE3)pLysS, posiadają wbudowany do genomu gen *I* bakteriofaga T7 (koduje on polimerazę RNA T7) umieszczony pod kontrolą promotora *lac* UV5. Gen ten zostaje uaktywniony po dodaniu β -D-izopropylotiogalaktopiranozydu (IPTG). Ponadto, do bakterii wprowadzano plazmid pLysS zawierający gen lizozymu bakteriofaga T7, który jest indukowany niskimi temperaturami. Kodowane przez niego białko katalizuje proces lizy ścian komórkowych bakterii, a dodatkowo inhibuje bakteriofagową polimerazę. W rezultacie w nieindukowanych komórkach bakteryjnych geny znajdujące się pod kontrolą promotora polimerazy T7 są nieaktywne.

Komórki *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformowano wektorem ekspresyjnym pDAR1 metodą elektroporacji (rozdział 4.2.1). W celu uzyskania pojedynczych kolonii namnażano je wstępnie w płynnej pożywce LB, a następnie wysiewano na pożywkę stałą z ampicyliną. Dzięki obecności w wektorze pDAR1 genu oporności na antybiotyk możliwa była selekcja transformowanych komórek posiadających pDAR1. Pojedynczą kolonią bakteryjną zaszczipiano płynną pożywkę LB z ampicyliną. Hodowlę prowadzono do momentu osiągnięcia przez bakterie fazy wzrostu logarytmicznego, tj. gdy gęstość optyczna zawiesiny wynosiła $A_{600} = 0.6 - 0.8$. Na tym etapie przygotowywano stoki glicerolowe, które przechowywano przez dłuższy czas w -70°C (rozdział 4.2.3). Następnie do hodowli dodawano IPTG, aktywujący gen polimerazy RNA T7. Przebieg ekspresji monitorowano analizując ekstrakty białkowe, uzyskane z bakterii pobieranych przed i po dodaniu czynnika indukującego (po 1, 2, 3 i 4h). Ekstrakty białek wyizolowane z komórek bakteryjnych poddawano analizie metodą elektroforezy w 15% denaturującym żelu poliakryloamidowym (rozdział 4.2.10).

2.1. Zbudujmy model RNA wirusowej z HIV-1 RT i oceniamy właściwości inhibitoryjne.

2.1.1. Odczytywanie HIV-1 RT (ustrojenie białka)

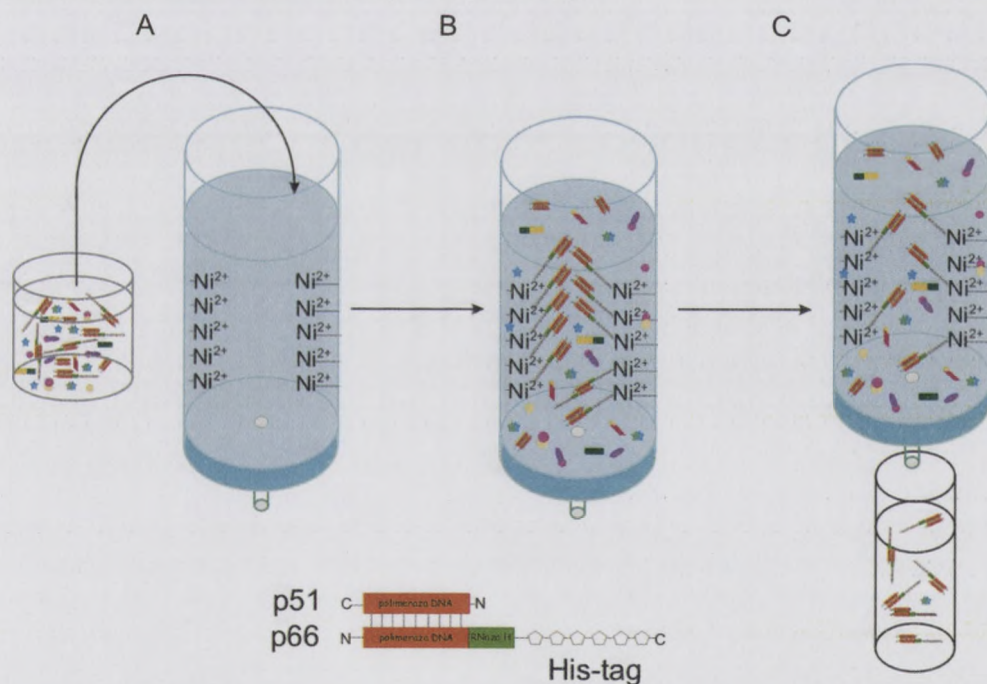
Obrotowa transkrypcja HIV-1 (bierze udział w białku) przebiega w komórkach bakteryjnych BL21(DE3) przy użyciu transformowanych wektorów ekspresyjnym pDARI. W wektorze tym znajduje się dwie otwarte ramki odczytu kodujące podjednostki p66 (kodowana w 5' niekodowy ogon na końcu C) i proteazy HIV-1. Odczyt cDNA znajduje się pod kontrolą tego samego promotora polimerazy RNA T7. W wyniku aktywności proteazy około 50% podjednostek p66 powstających jest domeny RT/ary H. W rezultacie uzyskuje się obie podjednostki HIV-1 RT: p66 oraz p51.

Komórki E. coli szczep BL21(DE3) p66, posiadają wbudowany do genomu geny bakteriofaga T7 (koduje on polimerazę RNA T7) umieszczony pod kontrolą promotora lacUV5. Gen ten koduje białko, które po dobieciu β-D-tioglycylo-6-azalotymocyny (IPTG) pozwala na białki wprowadzane białkami p66 i p51 zawiązać się z białkami bakteriofaga T7. Białko jest indukowane w komórce przez niego i białko katalizuje proces białko-komórkowy białko, a dodatkowo katalizuje bakteriofagowy polimerazę. W rezultacie w aktywowanych komórkach bakteryjnych geny znajdują się pod kontrolą promotora polimerazy T7 są niaktywne.

Komórki E. coli BL21(DE3) p66 transformowano wektorem ekspresyjnym pDARI metodą elektroporacji (rozdział 4.2.1). W celu uzyskania pojedynczych kolonii namazano je wagiem w płynnej pożywce LB z antybiotykami w celu uzyskania czystych kultur. Dzięki obecności w wektorze pDARI genu odporności na antybiotyki możliwa była selekcja transformowanych komórek posiadających pDARI. Wydzielone kolonie bakteryjne zasiedlano płynną pożywkę LB z ampicylinem. Hodowle prowadzono do momentu osiągnięcia przez bakterie fazy wzrostu logarytmicznego, tj. gdy gęstość optyczna zawiązków wynosiła $A_{600} = 0.6 - 0.8$. Na tym etapie przygotowywano stałe kulturek, które przechowywano przez długi czas w -70°C (rozdział 4.2.3). Następnie do hodowli dodawano IPTG, aktywując gen polimerazy RNA T7. Przebieg ekspresji monitorowano analizując zmiany białkowe uzyskane z białkami podjednostek p66 i p51 po dobieciu czynnika indukującego (po 1, 2, 3 i 4h). Ekstremalny białek wyizolowano z komórek bakteryjnych poddawano analizie metodą elektroporacji w 15% denaturującym żelu poliakrylamidowym (rozdział 4.2.10).

HIV-1 RT oczyszczano metodą chromatografii powinowactwa i chromatografii jonowymiennej. Użyte procedury pozwoliły otrzymać homogenne preparaty HIV-1 RT (czystość powyżej 95%).

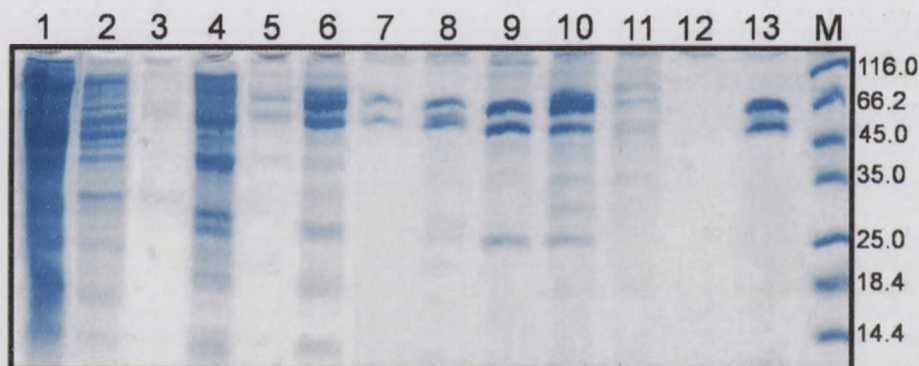
Oczyszczanie na kolumnie powinowactwa (Ni-NTA Agaroz). W pierwszym etapie preparat białkowy oczyszczano na kolumnie powinowactwa (rozdział 4.2.8). Istotą tej metody jest wiązanie reszt histydynowych, obecnych na końcu C podjednostki p66 HIV-1 RT, do jonów niklu unieruchomionych na nośniku His*Bind Resin. Podjednostka p51 specyficznie wiąże się z p66, stąd na kolumnie zatrzymywano kompleksy p66/p51 (Rysunek 13). Nadmiar białka p51 oraz większość pozostałych składników ekstraktu nie wiąże się z kolumną. Związane z żywicą białka wymywano stosując bufor o rosnącym stężeniu imidazolu. Frakcję zawierającą heterodimer p66/p51 wymywano przy 10. i 100. mM stężeniu imidazolu (Rysunek 14). Uzyskany preparat, po wymianie buforu na 50 mM Tris o pH 8.0 i zagęszczeniu, poddawano dalszemu oczyszczaniu na kolumnie jonowymiennej.



Rysunek 13. Schemat oczyszczania HIV-1 RT metodą chromatografii powinowactwa.

- Jony niklu unieruchomione są na nośniku His*Bind Resin.
- Podjednostka p66 wiąże się z jonami niklu, podjednostka p51 nie posiada His-Tagu na końcu C, dlatego nie może związać się bezpośrednio z wypełnieniem kolumny. Oddziałuje specyficznie z podjednostką p66, dzięki temu zostaje na kolumnie. Pozostałe białka, nie posiadające ogona histydynowego, są wymywane z kolumny.
- HIV-1 RT wymywano stosując bufor z imidazolem.

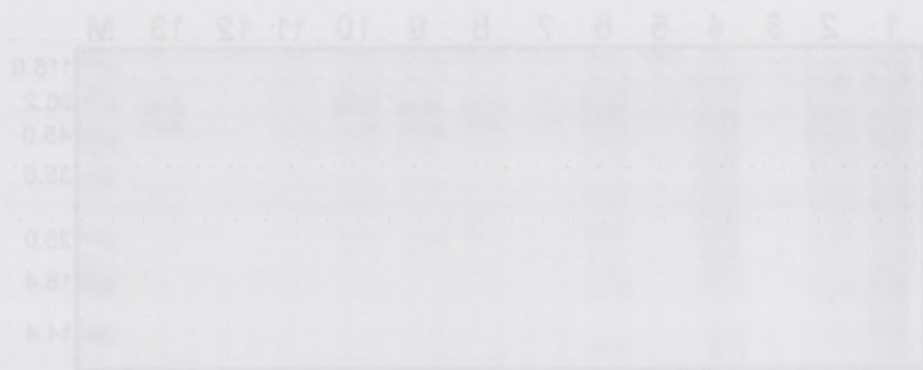
Oczyszczanie na kolumnie jonowymiennej *Hi-TrapQ*. W kolejnym etapie preparat białkowy oczyszczano na kolumnie jonowymiennej (rozdział 4.2.9). Na nośniku wypełniającym kolumnę (Q-Sefaroz) unieruchomione są jony trimetyloamoniowe, które odwracalnie wiążą obdarzony ładunkiem heterodimer p66/p51. Kolumnę przemywano buforami o malejącym pH, rozpoczynając od zasadowego do coraz bardziej kwaśnego. Uzyskany preparat zawierał heterodimer o czystości wynoszącej ponad 95%. Z jednego litra hodowli wyjściowej otrzymywano około 4 mg odwrotnej transkryptazy wirusa HIV-1. Oczyszczone białko zagęszczano stosując sita molekularne 30000 MW. Otrzymane preparaty analizowano metodą elektroforezy w 15% denaturującym żelu poliakrylamidowym (rozdział 4.2.10). Wyniki kolejnych etapów oczyszczania HIV-1 RT przedstawiono na Rysunek 14. HIV-1 RT przechowywano w buforze X, w temp. -20°C . Końcowe stężenie tak przygotowanego preparatu wynosiło $6\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$.



Rysunek 14. Analiza preparatów białkowych otrzymanych na poszczególnych etapach izolacji i oczyszczania HIV-1 RT.

Białka poddawano analizie metodą elektroforezy w 15% żelu poliakrylamidowym, w warunkach denaturujących. MW - wzorzec mas *Mid-Range Protein Molecular Weight Marker*, 1 - frakcja białek nie wiążąca się z kolumną niklową, 2 - 6 - frakcja białek rozpuszczalnych wiążących się z kolumną niklową; 2, 3 - frakcja uwolniona po przemyciu buforem II, 4, 5 - frakcja uwolniona po przemyciu buforem III z 10. mM imidazolem, 6 - frakcja po przemyciu buforem III ze 100. mM imidazolem), 7 - 12 - rozdział na kolumnie jonowymiennej (frakcje po przemyciu buforem Tris pH 8,0/Hepes pH 7,0 w proporcjach 4:1 - linia nr 7; 3:2 - linia nr 8, 2:3 - linia nr 9; 1:4 - linia nr 10, frakcje po przemyciu buforem Hepes pH 7,0/Mes - w proporcjach 4:1 - linia nr 11 oraz 3:2 - linia nr 12), 13 - produkt po zagęszczeniu na filtrach molekularnych 30 kDa.

Oczyszczanie na kolonie jonowymiary BHT-100. W kolejnym etapie preparat dzielony oczyszczano na kolonie jonowymiary (rodzina 4.3.9). Na nośniku wzbogaconym kolonie (Q-Zelazca) anizochromowe, które odwracają wagę, oblatwały tabliczkami bezodornymi (rodzina 4.3.10). Kolonie przetrzymywane w butelkach z płynem, rozpraszając od czasu do czasu butelki zwanego. Używany preparat zawierał bezodornymi o czystości wynoszącej ponad 95%. Z jednego litra hodowli wyjściowej otrzymywano około 4 mg odornych, nieskazywanych wirusów HIV-1. Oczyszczanie metodą kolumnową stosując sie molekularne 5000 MW. Oczyszczanie preparaty analizowano metodą elektroforezy w 12% denaturującym żelu poliakrylamidowym (rodzina 4.3.10). Wyniki kolejnych etapów oczyszczania HIV-1 RT przedstawiono na Rysunku 14. HIV-1 RT przechowywano w buforze X w temp. -20°C. Kolonie rzeczywiście tak przygotowanego preparatu wynosiła 6 mg/l.

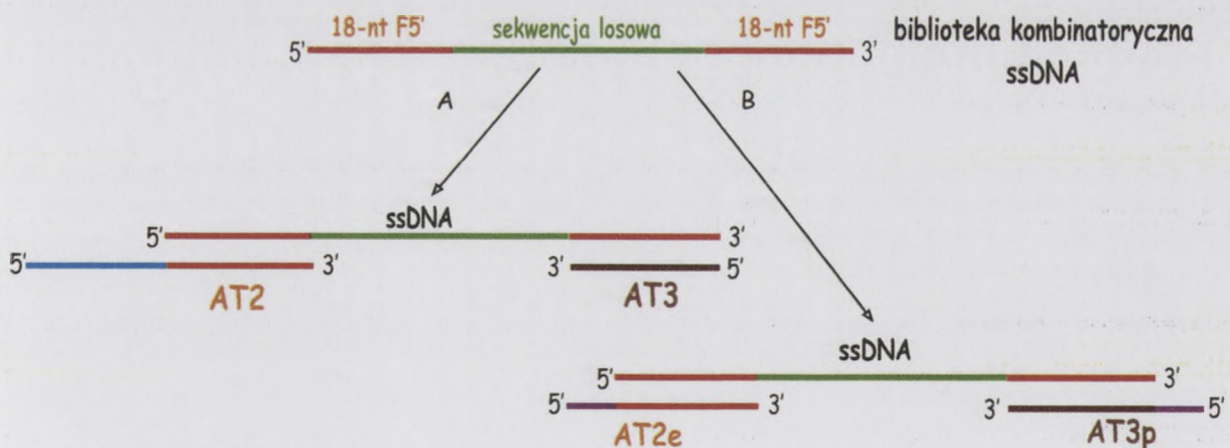


Rysunek 14. Analiza preparatów kolejnych etapów oczyszczania na kolumnach i tabliczkach bezodornych HIV-1 RT. Budowa podwójna: analiza preparatu wyjściowego = 12% żelu poliakrylamidowego w warunkach denaturacji. 1W - wirusowa masa (rodzina 4.3.9) w tabliczce (rodzina 4.3.9) - analiza bezodornych nie wirusowej z koloniami bezodornymi. 2 - 4 - analiza bezodornych wzbogaconych (rodzina 4.3.9) - analiza bezodornych po praniu kolonii. 5 - 7 - analiza bezodornych wzbogaconych (rodzina 4.3.9) - analiza bezodornych po praniu kolonii. 8 - 10 - analiza bezodornych wzbogaconych (rodzina 4.3.9) - analiza bezodornych po praniu kolonii. 11 - 13 - analiza bezodornych wzbogaconych (rodzina 4.3.9) - analiza bezodornych po praniu kolonii. 14 - 16 - analiza bezodornych wzbogaconych (rodzina 4.3.9) - analiza bezodornych po praniu kolonii. 17 - 19 - analiza bezodornych wzbogaconych (rodzina 4.3.9) - analiza bezodornych po praniu kolonii. 20 - 22 - analiza bezodornych wzbogaconych (rodzina 4.3.9) - analiza bezodornych po praniu kolonii. 23 - 25 - analiza bezodornych wzbogaconych (rodzina 4.3.9) - analiza bezodornych po praniu kolonii. 26 - 28 - analiza bezodornych wzbogaconych (rodzina 4.3.9) - analiza bezodornych po praniu kolonii. 29 - 31 - analiza bezodornych wzbogaconych (rodzina 4.3.9) - analiza bezodornych po praniu kolonii. 32 - 34 - analiza bezodornych wzbogaconych (rodzina 4.3.9) - analiza bezodornych po praniu kolonii. 35 - 37 - analiza bezodornych wzbogaconych (rodzina 4.3.9) - analiza bezodornych po praniu kolonii. 38 - 40 - analiza bezodornych wzbogaconych (rodzina 4.3.9) - analiza bezodornych po praniu kolonii. 41 - 43 - analiza bezodornych wzbogaconych (rodzina 4.3.9) - analiza bezodornych po praniu kolonii. 44 - 46 - analiza bezodornych wzbogaconych (rodzina 4.3.9) - analiza bezodornych po praniu kolonii. 47 - 49 - analiza bezodornych wzbogaconych (rodzina 4.3.9) - analiza bezodornych po praniu kolonii. 50 - 52 - analiza bezodornych wzbogaconych (rodzina 4.3.9) - analiza bezodornych po praniu kolonii. 53 - 55 - analiza bezodornych wzbogaconych (rodzina 4.3.9) - analiza bezodornych po praniu kolonii. 56 - 58 - analiza bezodornych wzbogaconych (rodzina 4.3.9) - analiza bezodornych po praniu kolonii. 59 - 61 - analiza bezodornych wzbogaconych (rodzina 4.3.9) - analiza bezodornych po praniu kolonii. 62 - 64 - analiza bezodornych wzbogaconych (rodzina 4.3.9) - analiza bezodornych po praniu kolonii. 65 - 67 - analiza bezodornych wzbogaconych (rodzina 4.3.9) - analiza bezodornych po praniu kolonii. 68 - 70 - analiza bezodornych wzbogaconych (rodzina 4.3.9) - analiza bezodornych po praniu kolonii. 71 - 73 - analiza bezodornych wzbogaconych (rodzina 4.3.9) - analiza bezodornych po praniu kolonii. 74 - 76 - analiza bezodornych wzbogaconych (rodzina 4.3.9) - analiza bezodornych po praniu kolonii. 77 - 79 - analiza bezodornych wzbogaconych (rodzina 4.3.9) - analiza bezodornych po praniu kolonii. 80 - 82 - analiza bezodornych wzbogaconych (rodzina 4.3.9) - analiza bezodornych po praniu kolonii. 83 - 85 - analiza bezodornych wzbogaconych (rodzina 4.3.9) - analiza bezodornych po praniu kolonii. 86 - 88 - analiza bezodornych wzbogaconych (rodzina 4.3.9) - analiza bezodornych po praniu kolonii. 89 - 91 - analiza bezodornych wzbogaconych (rodzina 4.3.9) - analiza bezodornych po praniu kolonii. 92 - 94 - analiza bezodornych wzbogaconych (rodzina 4.3.9) - analiza bezodornych po praniu kolonii. 95 - 97 - analiza bezodornych wzbogaconych (rodzina 4.3.9) - analiza bezodornych po praniu kolonii. 98 - 100 - analiza bezodornych wzbogaconych (rodzina 4.3.9) - analiza bezodornych po praniu kolonii.

5.1.2 Przygotowanie biblioteki kombinatorycznej

Proces selekcji rozpoczęto od zaprojektowania biblioteki kombinatorycznej oligodeoksynukleotydów. Tworzące ją ssDNA posiadały tzw. odcinki flankujące o znanej sekwencji, pomiędzy którymi ulokowana była sekwencja losowa o przypadkowej kolejności nukleotydów. W każdej pozycji sekwencji losowej mógł występować jeden z czterech nukleotydów A, U, G lub C. Zdecydowano, by tworzące bibliotekę cząsteczki posiadały 10-nukleotydową sekwencję losową oraz 18-nukleotydowe sekwencje flankujące F3' i F5' (Rysunek 15). Kompletna biblioteka powinna zatem zawierać 4^{10} , czyli około 10^6 cząsteczek o różnych sekwencjach losowych. Do pierwszego cyklu selekcji użyto 600 pmoli ssDNA czyli 3.6×10^{14} cząsteczek. Można zatem założyć, iż wszystkie możliwe sekwencje były w niej reprezentowane co najmniej dwukrotnie.

Aby swobodnie operować biblioteką dodatkowo zaprojektowano dwie pary starterów: AT2 i AT3 oraz AT2e i AT3p. Do amplifikacji ssRNA uzyskiwanych po każdym cyklu selekcyjnym stosowano startery AT2 i AT3. 35-nukleotydowy AT2 składał się z sekwencji identycznej jak F5' oraz dołączonego do niej 17-nukleotydowego promotora polimeazy T7. AT3 miał długość 18 nukleotydów i był komplementarny do F3'. Startery AT2e i AT3p stosowane były wówczas, gdy zamplifikowane cząsteczki miały być klonowane do wektora pUC19. AT2e różnił się od AT2 jedynie tym, iż promotor polimerazy T7 zastąpiony został przez sekwencje rozpoznawaną przez enzym restrykcyjny EcoRI. AT3p powstał przez dodanie do AT3 sekwencji rozpoznawanej przez enzym restrykcyjny PstI.



Rysunek 15. Biblioteka kombinatoryczna i startery wykorzystane do selekcji aptamerów wiążących HIV-1 RT.

- Startery AT2 i AT3 wykorzystywane były do reakcji PCR podczas procesu selekcji *in vitro*. Starter AT2 dodatkowo zawierał promotor polimerazy RNA T7, zaznaczony na niebiesko.
- Startery AT2e i AT3p zawierały sekwencje rozpoznawane przez enzymy restrykcyjne, odpowiednio EcoRI i PstI, zaznaczone na fioletowo.

2.1.3 Przygotowanie biblioteki kombinatorycznej

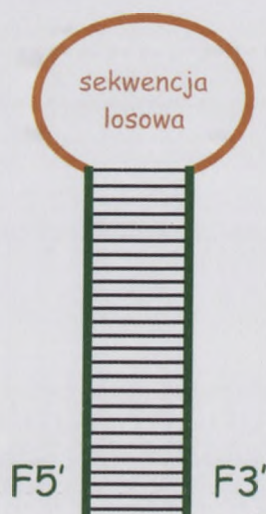
Proces selekcji rozpoczął od zaprezentowania biblioteki kombinatorycznej oligonukleotydów. Tworząc ją ssDNA posiadała tzw. obciążenie flankingowe z uwagi na sekwencje pomędzy kolejnymi elementami. W każdej pozycji sekwencji kodowej mógł występować jeden z czterech nukleotydów. W każdej pozycji sekwencji kodowej mógł występować jeden z czterech nukleotydów. A. U. G lub C. Zdecydowano, by tworzyć bibliotekę cząsteczek posiadających 10 nukleotydów sekwencji kodowej oraz 18 nukleotydów sekwencji flankingiej 5' i 3' (rysunek 12). Kompletna biblioteka powinna zatem zawierać 4^{10} , czyli około 10^6 cząsteczek o różnych sekwencjach kodowych. Do pierwszego cyklu selekcji użyto 600 pmol ssDNA czyli 3.6×10^{11} cząsteczek. Można zatem założyć, iż wszystkie możliwe sekwencje były w niej reprezentowane co najmniej dwukrotnie.

Aby swobodnie operować biblioteką dodatkowo zaprezentowano dwie pary standardów: AT2 i AT3 oraz AT2c i AT3c. Do amplifikacji ssRNA uzyskiwanych po każdym cyklu selekcyjnym stosowano standardy AT2 i AT3. 32-nukleotydowy AT2 składał się z sekwencji identycznej jak 5' oraz dopasowanego do niej 17-nukleotydowego promotora polimerazy T7. AT3 miał długość 18 nukleotydów i był komplementarny do 5' standardu AT2c i AT3c. Standardy AT2c i AT3c zostały użyte do selekcji. Aby zapobiec powstaniu dimerów AT2c i AT3c, standardy AT2c i AT3c zostały zmieszane z ssDNA. Aby zapobiec powstaniu dimerów AT2c i AT3c, standardy AT2c i AT3c zostały zmieszane z ssDNA. Aby zapobiec powstaniu dimerów AT2c i AT3c, standardy AT2c i AT3c zostały zmieszane z ssDNA.



Rysunek 12. Biblioteka kombinatoryczna i standardy wykorzystane do selekcji aptamerów wiążących HIV-1 RT. A) Standardy AT2 i AT3 wykorzystywane były do selekcji PCR. Kodowa sekwencja kodująca jest 18 nukleotydów. B) Standardy AT2c i AT3c wykorzystywane były do selekcji aptamerów wiążących HIV-1 RT. Kodowa sekwencja kodująca jest 18 nukleotydów.

Sekwencje flankujące F3' i F5' zostały zaprojektowane tak, aby parowały ze sobą tworząc strukturę spinki do włosów, w której sekwencja o przypadkowej kolejności nukleotydów stanowiła pętlę (Rysunek 16).



Rysunek 16. Drugorzędowa struktura oligonukleotydów tworzących bibliotekę kombinatoryczną, wykorzystywaną do selekcji aptamerów wobec HIV-1 RT.

5.1.3 Selekcja aptamerów RNA

Na wstępie procesu selekcji *in vitro* zamplifikowano cząsteczki ssDNA tworzące bibliotekę kombinatoryczną (rozdział 4.2.11). W tym celu wykorzystywano startery AT2 i AT3. Uzyskaną pulę dsDNA użyto do pierwszego etapu cyklu selekcyjnego, jakim jest transkrypcja *in vitro* (rozdział 4.2.12). Do mieszaniny reakcyjnej dodawano guanozynę. W rezultacie znaczna część transkryptów pozbawiona była reszty fosforanowej na końcu 5'. Uzyskany RNA rozdzielano w denaturującym 12% żelu poliakryloamidowym (rozdział 4.2.18). Prażki RNA o pożądanej wielkości wycinano z żelu i eluowano (rozdział 4.2.13). W kolejnym etapie RNA znakowano na końcu 5' (rozdział 4.2.14). W tym celu wykorzystano γ ³²P-ATP. Wyznakowane cząsteczki RNA oczyszczano metodą fenol/chloroform (rozdział 4.2.15). Przed reakcją wiązania RNA z białkiem, mierzono ilość materiału radioaktywnego wprowadzonego do wyjściowej puli RNA (cpm) przy zastosowaniu licznika scyntylicyjnego Beckmann LS 7000.

W reakcji wiązania RNA z HIV-1 RT (rozdział 4.2.16) stosunek molowy RNA:białko wynosił 10:1. Mieszaninę reakcyjną zawierającą odwrotną transkryptazę, wyznakowane RNA i odpowiedni bufor inkubowano 10 minut w temperaturze 37°C. Następnie odmywano niezwiązane, bądź też słabo związane RNA pięcioma ml buforu do selekcji aptamerów RNA wobec HIV-1 RT, stosując sita molekularne 30 kDa. Kolejny etap polegał na rozbiciu

Abstract The expression of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) *gag* gene is regulated by the transcription factor NF- κ B. The transcription factor NF- κ B is a heterotrimeric complex composed of the κ B1, κ B2, and κ B3 subunits. The κ B1 subunit is the catalytic subunit of the NF- κ B complex and is responsible for the transcriptional activity of the complex. The κ B2 and κ B3 subunits are structural subunits that are thought to be involved in the assembly and stability of the complex. In this study, we have investigated the role of the κ B2 and κ B3 subunits in the regulation of HIV-1 *gag* gene expression. We have found that the κ B2 and κ B3 subunits are essential for the transcriptional activity of the NF- κ B complex in the regulation of HIV-1 *gag* gene expression. The κ B2 subunit is required for the transcriptional activity of the NF- κ B complex, while the κ B3 subunit is required for the stability of the complex. These results suggest that the κ B2 and κ B3 subunits play important roles in the regulation of HIV-1 *gag* gene expression.

Key words: HIV-1, NF- κ B, transcription factor, *gag* gene, κ B2, κ B3

Introduction The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) *gag* gene is the first and largest of the HIV-1 genes. It encodes the structural proteins of the virus, including the matrix, capsid, and nucleocapsid proteins. The expression of the *gag* gene is regulated by the transcription factor NF- κ B.

NF- κ B is a heterotrimeric complex composed of the κ B1, κ B2, and κ B3 subunits. The κ B1 subunit is the catalytic subunit of the NF- κ B complex and is responsible for the transcriptional activity of the complex. The κ B2 and κ B3 subunits are structural subunits that are thought to be involved in the assembly and stability of the complex. In this study, we have investigated the role of the κ B2 and κ B3 subunits in the regulation of HIV-1 *gag* gene expression.

We have found that the κ B2 and κ B3 subunits are essential for the transcriptional activity of the NF- κ B complex in the regulation of HIV-1 *gag* gene expression. The κ B2 subunit is required for the transcriptional activity of the NF- κ B complex, while the κ B3 subunit is required for the stability of the complex.

These results suggest that the κ B2 and κ B3 subunits play important roles in the regulation of HIV-1 *gag* gene expression. We have also found that the κ B2 subunit is required for the transcriptional activity of the NF- κ B complex in the regulation of HIV-1 *gag* gene expression.

Materials and Methods: We used a reporter gene assay to study the regulation of HIV-1 *gag* gene expression. The reporter gene was a luciferase gene under the control of the HIV-1 *gag* promoter. We transfected cells with the reporter gene and measured the luciferase activity.

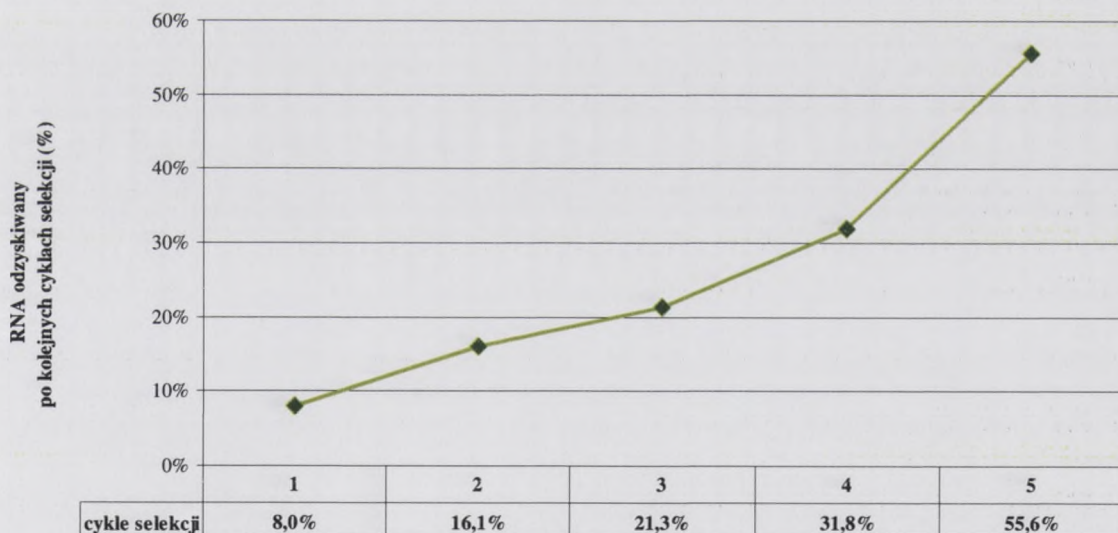
Results: We found that the κ B2 and κ B3 subunits are essential for the transcriptional activity of the NF- κ B complex in the regulation of HIV-1 *gag* gene expression. The κ B2 subunit is required for the transcriptional activity of the NF- κ B complex, while the κ B3 subunit is required for the stability of the complex.

Discussion: These results suggest that the κ B2 and κ B3 subunits play important roles in the regulation of HIV-1 *gag* gene expression. We have also found that the κ B2 subunit is required for the transcriptional activity of the NF- κ B complex in the regulation of HIV-1 *gag* gene expression.

Conclusion: The κ B2 and κ B3 subunits are essential for the transcriptional activity of the NF- κ B complex in the regulation of HIV-1 *gag* gene expression. The κ B2 subunit is required for the transcriptional activity of the NF- κ B complex, while the κ B3 subunit is required for the stability of the complex.

kompleksu RNA-białko poprzez wytrząsanie z 7 M mocznikiem i fenolem. Fazę wodną, zawierającą odzyskane z kompleksu RNA, przenoszono do nowych probówek i wytrącano przez noc. Następnego dnia RNA dekantowano przez wirowanie, rozpuszczano w wodzie i mierzono poziom radioaktywności. Procent wiązania RNA z HIV-1 RT obliczano na podstawie różnicy poziomu radioaktywności RNA użytego do reakcji wiązania i RNA odzyskanego z kompleksu z białkiem.

RNA przepisywano następnie na ssDNA, wykorzystując starter AT3 i odwrotną transkryptazę MuMLV dostępną komercyjnie, pochodzącą z mysiego wirusa białaczki Moloneya (rozdział 4.2.17). Otrzymany ssDNA powielano metodą PCR ze starterami AT2 i AT3 (rozdział 4.2.11). Każdy kolejny cykl rozpoczynał się od otrzymania zawężonej puli RNA metodą transkrypcji *in vitro*. W reakcji tej jako matrycę wykorzystywano dsDNA zamplifikowany w ostatnim etapie poprzedniego cyklu selekcji. Po przeprowadzeniu 5 cykli selekcji RNA wykonano analizę wzbogacania (w kolejnych cyklach) sekwencji RNA w te, które najsilniej wiążą się z HIV-1 RT (Wykres 1). Po pierwszym cyklu 8% cząsteczek RNA z puli wyjściowej wiązało się z HIV-1 RT, a po 5 cyklu 56%. Uzyskano więc około siedmiokrotne wzbogacenie puli RNA wiążących się z białkiem.



Wykres 1. Analiza wzbogacania sekwencji RNA w kolejnych cyklach selekcji wobec HIV-1 RT.

Sekwencjonowanie

Po każdym cyklu selekcyjnym przeprowadzano analizę produktów reakcji PCR w 12% denaturującym żelu poliakryloamidowym (rozdział 4.2.18).

kompleksu RNA-białko poprzez wytrącenie z 7 M nioxalidem i fenolem. Fazę wodną zawierającą obciążenie z kompleksem RNA, przeniesiono do nowych probówek i wytrącono przez noc. Następnie data RNA dekontaminowano przez wstrząsanie, rozpuszczano w wodzie i mierzono poziom radioaktywności. Procent wiązania RNA z HIV-1 RT obliczano na podstawie różnicy poziomu radioaktywności RNA użytego do reakcji wiązania i RNA obciążonego z kompleksem z białkiem.

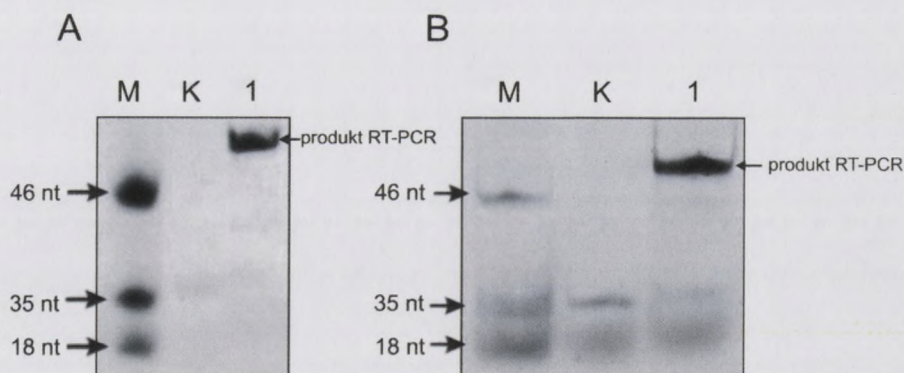
RNA przepisywano następując na cDNA, wykorzystując starter AT3 i odwrotny transkryptazę M-MLV. Dołączając komercyjnie pochodzący z tegoż wina białko Moloney (kodzik 4.2.17). Otrzymany cDNA powielano metodą PCR ze starterami AT3 i AT3 (kodzik 4.2.11). Każdy kolejny cykl rozpoczął się od otrzymania zawiesiny puli i AT3. RNA metoda transkrypcji in vitro. W reakcji tej jako matrycę wykorzystywano cDNA amplifikowany w ostatnim etapie poprzedniego cyklu selekcji. Po przeprowadzeniu 5 cykli selekcji RNA wykonano analizę wyselekcjonowania (w kolejnych cyklach) selekcji RNA w to, które testy wzięły się z HIV-1 RT (Wykres 1). Po przewarzeniu cDNA cząstek RNA z puli wyselekcjonowanej wzięto się z HIV-1 RT, a po 7 cyklach 50%. Uspółniawo więc obito niedominację wyselekcjonowanie puli RNA wiążących się z białkiem.



Wykres 1. Analiza wyselekcjonowania cDNA w kolejnych cyklach selekcji wobec HIV-1 RT.

Wznowienie

Do kolejnych cykli selekcji w przeprowadzono analizę produktów reakcji PCR w 12% denaturującym żelu poliakrylamidowym (kodzik 4.2.18).



Rysunek 16. Analiza produktów reakcji PCR po 2 (A) i 5 (B) cyklu selekcji wobec HIV-1 RT.

A. Analiza produktu reakcji PCR po drugim cyklu selekcyjnym.

B. Analiza produktu reakcji PCR po piątym cyklu selekcyjnym.

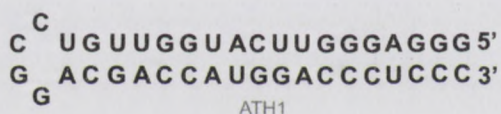
Jako kontrolę zastosowano próbkę bez enzymu oznaczoną jako K, M – wzorzec długości DNA.

Teoretycznie, otrzymywany na końcu każdego cyklu selekcyjnego produkt reakcji PCR, powinien mieć długość 63 nukleotydów, gdyż do amplifikacji używano startery AT2 i AT3. Nieoczekiwanie stwierdzono, iż produkt zamplifikowany po 5. cyklu selekcyjnym jest wyraźnie krótszy. Wykonano zatem kontrolne sekwencjonowanie pojedynczych klonów uzyskanego dsDNA. W tym celu na matrycy DNA przeprowadzono najpierw reakcję PCR (rozdział 4.2.11) ze starterami AT2e i AT3p, wprowadzającymi miejsca rozpoznawane przez enzymy restrykcyjne EcoRI i PstI, odpowiednio na końcach 5' i 3'. Produkty reakcji PCR oczyszczano metodą fenol/chloroform (rozdział 4.2.15), trawiono EcoRI i PstI (rozdział 4.2.19) i ligowano do plazmidu pUC19, uprzednio ciętego tymi samymi enzymami (rozdział 4.2.21). Przygotowywano dwie reakcje ligacji, w których stosunek molowy wektor:insert wynosił 1:3 i 1:10. Mieszaniną ligacyjną transformowano komórki kompetentne DH5 α metodą heat-shock (rozdział 4.2.2). W wektorze pUC19 znajduje się operon laktozowy, zawierający gen LacZ kodujący β -galaktozydazę. Obcy DNA (insert) zostaje wklonowany w środek genu LacZ, zaburzając syntezę β -galaktozydazy. Substratem dla tego enzymu jest X-gal, który dodawany jest razem z IPTG (indukuje syntezę białek operonu laktozowego) do pożywki stałej. Hydroliza X-gal przez β -galaktozydazę powoduje powstanie charakterystycznego niebieskiego koloru kolonii, co wskazuje na brak zaburzeń w genie LacZ, a co za tym idzie brak insertu w wektorze. Wektory z insertem znajdują się w bakteriiach tworzących białe kolonie, w których nie zachodzi hydroliza X-gal.

Z pojedynczych kolonii, namnożonych przez noc na pożywce płynnej LB z ampicyliną, izolowano plazmidy metodą lizy w warunkach alkalicznych – tzw. mini-prepy (rozdział 4.2.5). W metodzie tej stosuje się 1% roztwór SDS – do lizy ścian komórkowych i denaturacji białek, a także 0.2 M NaOH, który degraduje kwasy nukleinowe. Czas inkubacji jest tak dobrany,

aby plazmidowy DNA nie ulegał zniszczeniu. Działanie NaOH hamuje 7,5 M octan amonu. Oczyszczone plazmidy sekwencjonowano stosując ABI PRISM[®] Big Dye[™] Terminator Ready Reaction Cycle Sequencing Kit według procedury zamieszczonej w rozdziale 4.2.22. W reakcji zastosowano starter F19 komplementarny do wektora pUC19 poniżej miejsca klonowania insertu. Produkty reakcji oczyszczano zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 4.2.22. Stwierdzono, iż każdy z 9 przesekwencjonowanych plazmidów posiada identyczny insert. Składa się on z sekwencji rozpoznawanej przez enzym restrykcyjny EcoRI, pełnej sekwencji F5', 4 nukleotydowej sekwencji losowej, sekwencji F3' oraz sekwencji rozpoznawanej przez enzym PstI.

Postanowiono zatem określić właściwości aptameru (nazwanego ATH1) uzyskanego po 5. cyklu selekcyjnym, pomimo iż nie posiadał on całej sekwencji losowej. Wykorzystując program Mfold [147] określono jego strukturę drugorzędową. Stwierdzono, że ATH1 przyjmuje najprawdopodobniej strukturę spinki o trzonie zbudowanym z 18 nukleotydów i czteronukleotydowej pętli terminalnej (Rysunek 17).



Rysunek 17. Przewidywana struktura drugorzędowa aptameru ATH1.

Mniej więcej w tym samym czasie ukazał się artykuł, w którym opisywano wpływ cząsteczek tworzących struktury typu spinka do włosów na aktywność domeny RNazy H odwrotnej transkryptazy wirusa HIV-1. Stwierdzono, że niektóre z nich specyficznie hamują aktywność nukleazową, nie wpływając na pozostałe aktywności enzymu [148]. Wszystkie zidentyfikowane inhibitory miały czteronukleotydowe pętle terminalne 5'UUCG3'. Cząsteczką najsilniej hamującą aktywność nukleazową HIV-1 RT był posiadający sześcienukleotydowy trzon RNA, nazwany MD16. Do dalszych badań postanowiono więc użyć pełnej długości ATH1 oraz jego dwie skrócone wersje – ATH1.1 i ATH1.2. Cząsteczki ATH1.1 i ATH1.2 miały analogicznie jak MD16 trzony zbudowane z sześciu par zasad. Dodatkowo, w ATH1.2 zmieniono parę zamykającą trzon: z GC na AU, a także środkową parę z UG na CG. W testach wpływu aptamerów na aktywności odwrotnej transkryptazy wirusa HIV-1 wykorzystano zatem 3 cząsteczki RNA (ATH1, ATH1.1, ATH1.2) i MD16 jako kontrolę (Rysunek 18).

Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1984

Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1984

Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1984

Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1984

Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1984

Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1984

Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1984

Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1984

Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1984

Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1984

Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1984

Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1984

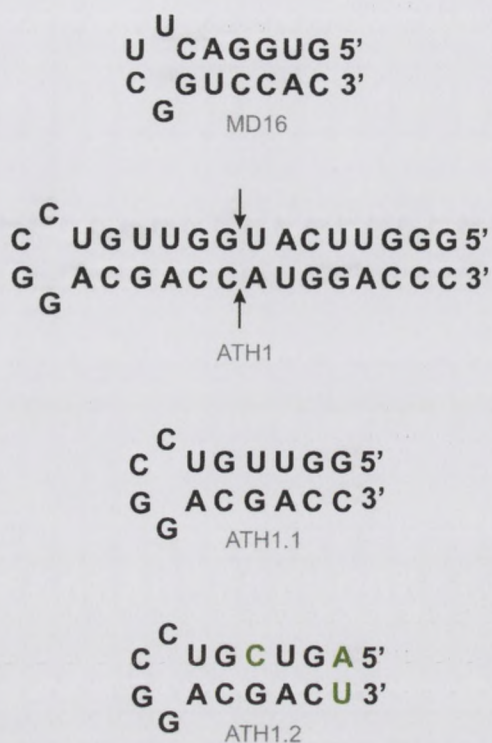
Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1984

Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1984

Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1984

Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1984

Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1984



Rysunek 18. Przewidywane struktury drugorzędowe aptameru MD16 oraz ATH1 i jego dwóch skróconych wersji – ATH 1.1 i 1.2.

W cząsteczce ATH1.2 na zielono zaznaczono zmienione nukleotydy.

5.1.4 Badanie wpływu aptamerów na aktywność nukleazową, polimerazową i rekombinacyjną HIV-1 RT

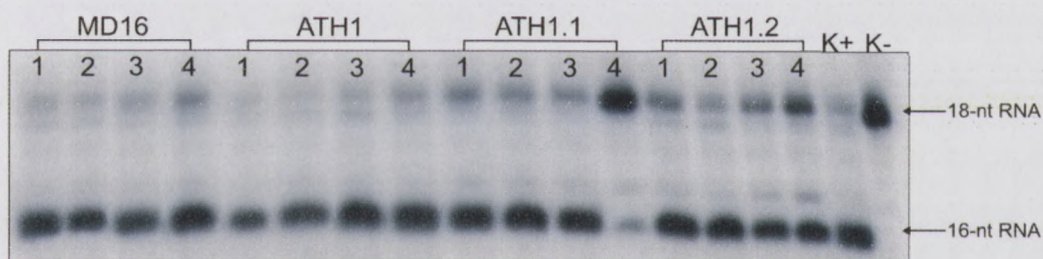
5.1.4.1 Aktywność nukleazowa HIV-1 RT

W celu określenia wpływu wyselekcjonowanych cząsteczek na aktywność RNazową HIV-1 RT testowano jej zdolność do trawienia cząsteczek RNA w obrębie hybrydów RNA/DNA (rozdział 4.2.25). Reakcje prowadzono w komercyjnie dostępnym buforze dla Mu-MLV. Stosunek molowy HIV-1 RT do hybrydu wynosił 1:1. Próbkę o objętości 10 μ l zawierała 3 pmole HIV-1 RT i 3 pmole hybrydu. Każdą reakcję przeprowadzano trzykrotnie.

Substratem w reakcjach była wyznakowana radioizotopowo na końcu 5' 18. nukleotydowa cząsteczka RNA (Hyb18RNA) (Tabela 2) zhybryzowana z komplementarną 18. nukleotydową cząsteczką DNA (Hyb18DNA) (Tabela 1). Aby uzyskać hybryd mieszaninę zawierającą cząsteczki DNA i RNA podgrzewano do temperatury 95°C, po czym powoli schładzano do temperatury 37°C.

Równolegle w celu zapewnienia optymalnych warunków działania aptamerów, przeprowadzano ich wstępną inkubację z HIV-1 RT w 37°C przez 15 minut.

W poszczególnych próbach stosunek molowy aptamer:enzym wynosił 1:3, 1:1, 4:1, 50:1 (1 pmol, 3 pmole, 12 pmoli, 150 pmoli aptameru). Aptamery przed inkubacją renaturowano w celu nadania im optymalnej struktury drugorzędowej. Następnie do kompleksu aptamer:enzym dodawano hybryd DNA/RNA i inkubowano uzyskaną mieszaninę przez 20 minut w 37°C. Dodatkowo przeprowadzono dwie reakcje kontrolne. W jednej z nich (kontrola dodatnia, K+) do mieszaniny reakcyjnej nie dodawano aptamerów, a w drugiej (kontrola ujemna, K-) nie dodawano enzymu. Reakcję zatrzymywano dodając bufor UD. Próbkę denaturowano poprzez podgrzanie do 95°C i gwałtowne schłodzenie na lodzie. Aby ocenić aktywność testowanych aptamerów przeprowadzono analogiczną serię eksperymentów, w których rolę inhibitora RNazy H pełniła uzyskana przez innych badaczy cząsteczka MD16. Produkty reakcji wraz z reakcjami kontrolnymi rozdzielano w warunkach denaturujących w 12% żelu poliakrylamidowym (rozdział 4.2.18). Produkty trawienia analizowano za pomocą skanera materiałów znakowanych radioizotopowo (Phosphorimager, Typhoon 8600).



Rysunek 19. Wpływ aptamerów na aktywność nukleazową HIV-1 RT.

Dla każdego aptameru wykonywano po 4 reakcje oznaczone numerami 1, 2, 3 i 4. W próbach oznaczonych numerem 1 stosunek molowy aptamer-enzym wynosił 1:3, numerem 2 – 1:1; numerem 3 – 4:1; numerem 4 – 50:1. Jako K+ i K- oznaczono reakcje kontrolne, odpowiednio z HIV-1 RT i bez aptameru oraz bez HIV-1 RT i bez aptameru. Użyte w reakcji cząsteczki RNA znakowano radioizotopowo.

W wyniku przeprowadzonej analizy stwierdzono, że we wszystkich mieszaninach reakcyjnych wzór trawienia substratu jest podobny do uzyskanego w kontroli pozbawionej aptameru. W większości przypadków nie obserwowano, by dodanie aptameru wpływało inhibująco na aktywność nukleazową odwrotnej transkryptazy, a co za tym idzie na intensywność powstających prążków (Rysunek 19). Jedynie w próbce 4. (stosunek aptamer:HIV-1 RT 50:1) zawierającej ATH1.1 odnotowano wyraźny spadek aktywności RNazy H. Analiza, przy zastosowaniu programu Image Quant, pozwoliła ustalić stopień przereagowania substratu w poszczególnych próbkach. Aby określić wpływ aptamerów

W procesach...
1) punkt 5...
W celu...
aplikacji...
przez 30 minut...
kannola...
kannola...
Folb...
Aby...
ekspozycja...
dotychczas...
analizy...
Typhon...

...

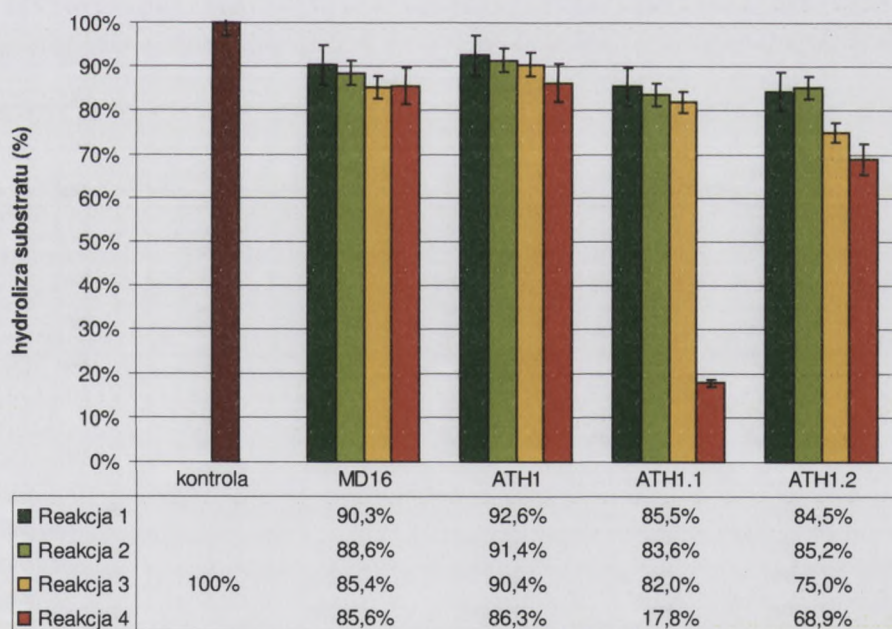
...

W...
rozkład...
opisan...
inhibic...
an...
opisan...
R...
prze...

na aktywność RNazową HIV-1 RT określano jaki procent wyznakowanego RNA ulegał trawieniu do 16-nukleotydowego produktu.

Wpływ poszczególnych aptamerów na aktywność RNazową HIV-1 RT przedstawiono na Wykres 2. Zaobserwowano, że MD16, ATH1 oraz ATH1.2 jedynie w niewielkim stopniu hamowały aktywność enzymu. W przypadku cząsteczki oznaczonej symbolem MD16 uzyskano obniżenie aktywności RNazowej o około 17%, przy najwyższym przebadanym stężeniu aptameru. Podobny efekt obniżenia aktywności RNazy H o około 15%, w przypadku najwyższego stężenia aptameru, uzyskano inkubując HIV-1 RT z ATH1. Nieco efektywniejszym inhibitorem okazał się ATH1.2, redukujący aktywność RNazową o około 32%.

Wyraźne obniżenie zdolności RNazy H do trawienia RNA w obrębie heterodupleksu Hyb18RNA/Hyb18DNA stwierdzono jedynie dla ATH1.1. Efekt ten był wyraźnie widoczny w przypadku zastosowania 50-krotnego nadmiaru aptameru w stosunku do enzymu (82,2% inhibicji).



Wykres 2. Wpływ aptamerów na aktywność nukleazową HIV-1 RT.

Na wykresie przedstawiono wpływ aptamerów na aktywność nukleazową HIV-1 RT. W reakcji 1 stosunek molowy aptamer:enzym wynosił 1:3, w reakcji 2 – 1:1, w reakcji 3 – 4:1, w reakcji 4 – 50:1. Wyniki są wartościami średnimi uzyskanymi z trzech niezależnych eksperymentów.

5.1.4.2 Aktywność polimerazowa HIV-1 RT

W celu określenia wpływu aptamerów na aktywność polimerazową HIV-1 RT przeprowadzono reakcję wydłużania startera zarówno na matrycy DNA, jak i RNA (rozdział 4.2.27). Eksperymenty wykonywano w oparciu o wcześniejsze badania, podczas których

na aktywność RNAzowej HIV-1 RT określano jako procent wyizolowanego RNA dzięki trawieniu do 10-miutego produktu.

Wpływ porażających aptamerów na aktywność RNAzowej HIV-1 RT przedstawiono na Wykresie 2. Zbadano, czy MD16, ATH1 oraz ATH2 jedynie w niewielkim stopniu hamowały aktywność enzymu. W przypadku cząsteczek oznaczonych symbolem MD16 uzyskano obniżenie aktywności RNAzowej o około 17%, przy najwyższym zbadanym stężeniu aptameru. Podobny efekt obniżenia aktywności RNAzowej H o około 15%, w przypadku najwyższego stężenia aptameru uzyskano stosując HIV-1 RT z ATH1. Niższe efektywnością inhibitory okazał się ATH2, redukujący aktywność RNAzowej o około 32%.

Wystarczającą zdolność RNAzowej H do trawienia RNA w opłacie biologicznej HIV1RNAzowej DNA stwierdzono jedynie dla ATH1. Efekt ten był wynikiem wiązania w przypadku zaszczepienia 30-krotnego nadmiaru aptameru w stosunku do enzymu (82,3%



Wykres 2. Wpływ aptamerów na aktywność RNAzowej HIV-1 RT. Na wykresie przedstawiono wpływ aptamerów na aktywność RNAzowej HIV-1 RT. W tabeli 1 domniemy procentowy wynik dla w tabeli 2 - 4,1, w tabeli 3 - 1,1, w tabeli 4 - 0,1. Wyniki są wyrażone w procentach z błędami standardowymi.

2.1.4.3 Aktywność polimerazowej HIV-1 RT

W celu określenia wpływu aptamerów na aktywność polimerazowej HIV-1 RT przeprowadzono testację wydłużania sznurka zbudowanego na matrycy DNA, jak i RNA (tabela 4.2.3). Eksperymenty wykonywano w oparciu o wcześniej opisaną procedurę, podczas której

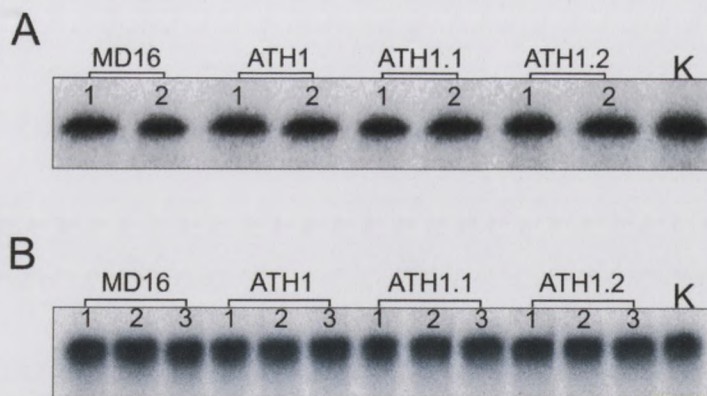
ustalono optymalne warunki reakcji polimeryzacji. Zgodnie z tymi danymi reakcję przeprowadzono w objętości 40 μ l, z wykorzystaniem standardowego buforu do Mu-MLV, przy zastosowaniu 3 pmoli HIV-1 RT. Wizualizacja produktów metodą autoradiografii była możliwa dzięki zastosowaniu (α^{32} P)-dCTP. Wydajność reakcji oszacowano przy użyciu komputerowego skanera materiałów znakowanych radioizotopowo.

Matrycą w reakcjach polimeryzacji było DNA lub RNA zhybrydyzowane ze starterem. Aby przygotować kompleks matryca:starter obie cząsteczki podgrzewano do 95°C i powoli schładzano do momentu osiągnięcia temperatury 37°C.

Do tak przygotowanego substratu podawano enzym, z którym wcześniej w 37°C, inkubowano aptamer (3 pmole i 300 pmoli aptameru dla matrycy RNA oraz 3 pmole, 15 pmoli lub 300 pmoli aptameru dla matrycy DNA). Aptamery przed inkubacją z enzymem ogrzewano do 95°C, a następnie powoli schładzano do 37°C w celu umożliwienia im przyjęcia optymalnej struktury drugorzędowej.

Reakcję polimeryzacji inicjowano przez dodanie mieszaniny trójfosforanów deoksyrybonukleozydowych, zawierającej znakowany radioizotopowo (α^{32} P)-dCTP, a następnie inkubowano w 45°C przez godzinę. Produkty reakcji, po wcześniejszej denaturacji, rozdzielano w 12% denaturującym żelu poliakrylamidowym, w obecności wzorców długości, a następnie wizualizowano za pomocą komputerowego skanera materiałów znakowanych radioizotopowo (Phosphorimager, Typhoon 8600).

Badanie wpływu aptamerów na aktywność polimerazową HIV-1 RT, zarówno na matrycy DNA jak i RNA, powtórzono trzykrotnie. Wielkość produktów reakcji została oszacowana w oparciu o wzorce długości DNA.



Rysunek 20. Wpływ aptamerów na aktywność polimerazową HIV-1 RT na matrycy RNA (A) i DNA (B).

A. Zależna od RNA synteza DNA. Dla każdego aptameru wykonano po 2 reakcje oznaczone numerami 1 i 2. W próbach oznaczonych numerem 1 podawano 3 pmole aptameru (stosunek molowy aptamer:enzym wynosił 1:1); numerem 2 – 300 pmoli aptameru (stosunek molowy aptamer:enzym wynosił 100:1).

B. Zależna od DNA synteza DNA. Dla każdego aptameru wykonano po 3 reakcje oznaczone numerami 1, 2 i 3. W próbach oznaczonych numerem 1 podawano 3 pmole aptameru (stosunek molowy aptamer:enzym wynosił 1:1); numerem 2 – 15 pmoli aptameru (stosunek molowy aptamer:enzym wynosił 5:1); numerem 3 – 300 pmoli aptameru (stosunek molowy aptamer:enzym wynosił 100:1).

Jako K+ oznaczono reakcję kontrolną, bez aptamerów.

W wyniku przeprowadzonej analizy stwierdzono, że we wszystkich mieszaninach reakcyjnych obecna była podobna ilość 46. nukleotydowego produktu głównego. Aptamery nie wpływały więc na ilość powstających produktów, a co za tym idzie na aktywność polimerazową RT (Rysunek 20).

5.1.4.3 Aktywność rekombinacyjna HIV-1 RT

Rekombinacja homologiczna odgrywa niezwykle istotną rolę w cyklu replikacyjnym retrowirusów. Z jednej strony umożliwia przepisanie genomowej cząsteczki RNA na dsDNA, który ulega integracji z genomem gospodarza, z drugiej strony warunkuje wymianę materiału genetycznego pomiędzy różnymi wariantami wirusa HIV.

Badania wpływu aptamerów na zdolność HIV-1 RT do wykonywania homologicznych przeskoków rekombinacyjnych przeprowadzono wykorzystując uniwersalny system do testowania rekombinacji *in vitro*. System ten składa się z dwóch matryc RNA, donorowej (BMV-R-D) i akceptorowej (BMV-R-A), które zawierają wspólną rekombinacyjnie aktywną sekwencję R pochodzącą z wirusa mozaiki stokłosa BMV. Do rekombinacji dochodzi wówczas, gdy polimeraza rozpocznie syntezę nici potomnej na cząsteczce donorowej i dokona przeskoku w obrębie homologicznego rejonu R na matrycę akceptorową. Powstające rekombinanty (R) są wyraźnie dłuższe od produktu (G) powstającego na cząsteczce donorowej, stąd można je łatwo zidentyfikować metodą elektroforezy w żelu poliakryloamidowym (Rysunek 21).



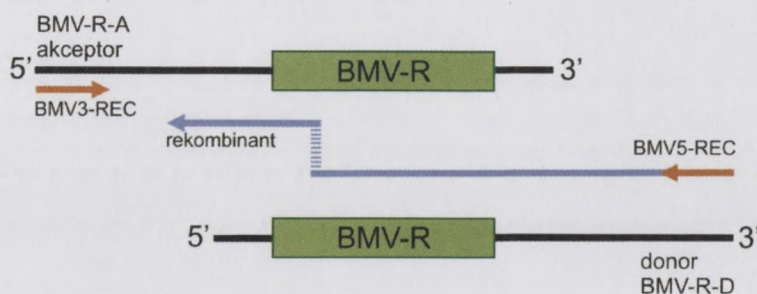
Wykres 20 Wynik sekwencjowania sekwencji genotypu HIV-1 RT w grupie 20A (20A) (A) i 20B (20B) (B). Wynik sekwencjowania sekwencji genotypu HIV-1 RT w grupie 20A (20A) (A) i 20B (20B) (B). Wynik sekwencjowania sekwencji genotypu HIV-1 RT w grupie 20A (20A) (A) i 20B (20B) (B). Wynik sekwencjowania sekwencji genotypu HIV-1 RT w grupie 20A (20A) (A) i 20B (20B) (B).

W wyniku przeprowadzonej analizy sekwencji, na wybranych fragmentach sekwencji genotypu HIV-1 RT, nie stwierdzono żadnych zmian genetycznych w porównaniu z grupą kontrolną. Wynik sekwencjowania sekwencji genotypu HIV-1 RT w grupie 20A (20A) (A) i 20B (20B) (B).

2.1.3. Analiza sekwencji genotypu HIV-1 RT

W celu oceny zmienności genotypu HIV-1 RT w grupie 20A (20A) i 20B (20B) przeprowadzono analizę sekwencji genotypu HIV-1 RT. Wynik sekwencjowania sekwencji genotypu HIV-1 RT w grupie 20A (20A) (A) i 20B (20B) (B).

Wynik sekwencjowania sekwencji genotypu HIV-1 RT w grupie 20A (20A) (A) i 20B (20B) (B). Wynik sekwencjowania sekwencji genotypu HIV-1 RT w grupie 20A (20A) (A) i 20B (20B) (B). Wynik sekwencjowania sekwencji genotypu HIV-1 RT w grupie 20A (20A) (A) i 20B (20B) (B). Wynik sekwencjowania sekwencji genotypu HIV-1 RT w grupie 20A (20A) (A) i 20B (20B) (B).



Rysunek 21. Schematyczny opis procesu rekombinacji.

Rejony homologiczne na niciach akceptorowej (BMV-R-A) i donorowej (BMV-R-D) zaznaczono na zielono i oznaczono jako BMV-R. W reakcji stosuje się starter BMV5-REC komplementarny do końca 3' matrycy donorowej. Powstający rekombinant jest komplementarny do końca 3' matrycy BMV-R-D i końca 5' matrycy BMV3-REC.

225-nukleotydowy donor (BMV-R-D) odpowiada fragmentowi genomowej cząsteczki RNA2 wirusa BMV (odcinek pomiędzy 2640 a 2865 nt) a 216. nukleotydowy akceptor (BMV-R-A) – fragmentowi cząsteczki RNA3 BMV (odcinek pomiędzy 1763 a 1961 nt). Matryca donorowa i akceptorowa posiadają 60. nukleotydowy rejon homologiczny (BMV-R) – odpowiednio sekwencje od 2647 do 2706 nt w RNA2 BMV i od 1900 do 1960 nt w RNA3 BMV. Sekwencje rejonów R pochodzących z homologicznych końców 3' RNA2 i RNA3 nie są jednak identyczne, różnią się one trzema pojedynczymi nukleotydami. RNA donorowy i akceptorowy otrzymano na drodze transkrypcji *in vitro* na matrycach cDNA, otrzymanych metodą PCR. Podczas reakcji wydłużania startera (BMV3-REC) HIV-1 RT rozpoczyna syntezę ssDNA na matrycy donorowej, a po osiągnięciu BMV-R może dokonać przeskoku rekombinacyjnego na matrycę akceptorową.

Wcześniej stwierdzono, że stosunek molowy donora do akceptora, zapewniający wysoką wydajność rekombinacji, wynosi 1:5. W reakcjach prowadzonych w obecności samej cząsteczki donorowej powstaje głównie jeden produkt (oznaczony literą G), będący wynikiem powielenia całej cząsteczki donorowej. Dłuższe produkty (prążek R) obserwowane są wówczas, gdy mieszanina reakcyjna zawiera zarówno cząsteczki donorowe, jak i akceptorowe.

Reakcje odwrotnej transkrypcji prowadzono w objętości 40 μ l w komercyjnym buforze dla Mu-MLV RT. Na wstępie przygotowano mieszaninę zawierającą matrycę donorową, akceptorową i starter BMV3-REC, którą ogrzewano do 95°C, a następnie schładzano powoli do 37°C. Aptamery preinkubowano z enzymem 20 minut w 37°C i obie mieszaniny, tj. tę zawierającą matryce oraz enzym i aptamer łączono. Reakcję inicjowano przez dodanie do mieszaniny reakcyjnej deoksyrybonukleotydy zawierające wyznakowany radioizotopowo dCTP. Całość inkubowano przez 1 h w 45°C. Dla każdego aptameru wykonano po 2 reakcje

Summary The effect of the presence of a *Salmonella* phage on the growth of *Salmonella* in a nutrient broth was studied. The phage was found to be present in the culture medium of *Salmonella* in a nutrient broth. The phage was found to be present in the culture medium of *Salmonella* in a nutrient broth.

Introduction The presence of a phage in a culture medium of *Salmonella* in a nutrient broth was studied. The phage was found to be present in the culture medium of *Salmonella* in a nutrient broth.

Materials and Methods The effect of the presence of a phage on the growth of *Salmonella* in a nutrient broth was studied. The phage was found to be present in the culture medium of *Salmonella* in a nutrient broth.

Results and Discussion The effect of the presence of a phage on the growth of *Salmonella* in a nutrient broth was studied. The phage was found to be present in the culture medium of *Salmonella* in a nutrient broth.

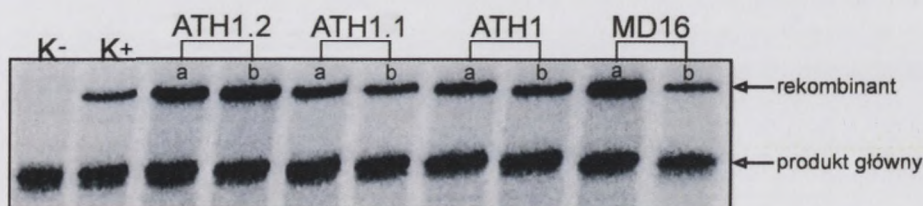
Conclusions The effect of the presence of a phage on the growth of *Salmonella* in a nutrient broth was studied. The phage was found to be present in the culture medium of *Salmonella* in a nutrient broth.

References The effect of the presence of a phage on the growth of *Salmonella* in a nutrient broth was studied. The phage was found to be present in the culture medium of *Salmonella* in a nutrient broth.

Abbreviations The effect of the presence of a phage on the growth of *Salmonella* in a nutrient broth was studied. The phage was found to be present in the culture medium of *Salmonella* in a nutrient broth.

Address The effect of the presence of a phage on the growth of *Salmonella* in a nutrient broth was studied. The phage was found to be present in the culture medium of *Salmonella* in a nutrient broth.

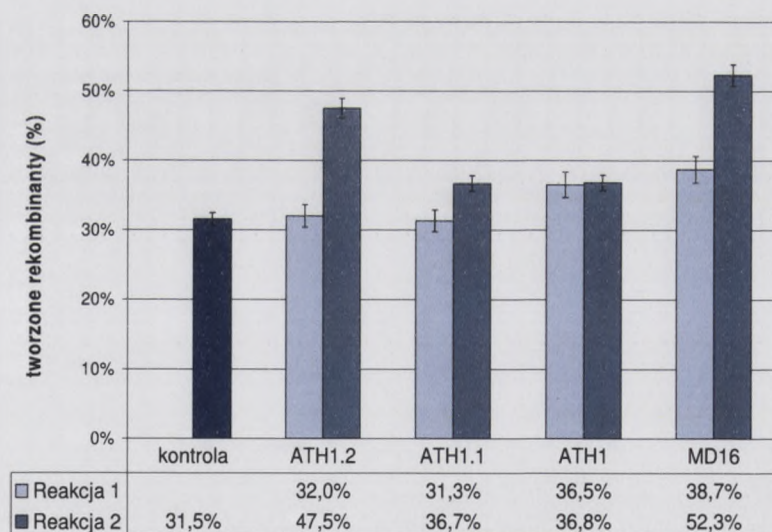
w trzech powtórzeniach, w których stosunki ilościowe aptamer:enzym wynosiły odpowiednio 1:1; 1:100. Reakcje zatrzymywano przez dodanie 12 μ l buforu UD, następnie denaturowano całość poprzez podgrzanie do 95°C i gwałtownie schładzając na lodzie. Próbkę rozdzielano w 10% denaturującym żelu poliakrylamidowym i analizowano wykorzystując skaner materiałów znakowanych radioizotopowo (Phosphorimager, Typhoon 8600) (Rysunek 22).



Rysunek 22. Wpływ aptamerów na aktywność rekombinacyjną HIV-1 RT.

Dla każdego aptameru (ATH1.2, ATH1.1, ATH1, MD16) wykonywano po 2 reakcje oznaczone jako 1 i 2. W próbkach oznaczonych numerem 1 podawano aptamery w stosunku molowym do enzymu 1:1, numerem 2 – 100:1. Jako K- oznaczono reakcję kontrolną bez dodatku enzymu, a jako K+ reakcję bez dodatku aptameru.

W wyniku przeprowadzonej analizy stwierdzono, że we wszystkich mieszaninach reakcyjnych obecny jest rekombinant. Wydajność rekombinacji określono jako wyrażony w procentach stosunek produktu R/G (Wykres 3).



Wykres 3. Wpływ aptamerów na aktywność rekombinacyjną HIV-1 RT.

Na wykresie przedstawiono wpływ aptamerów na aktywność rekombinacyjną HIV-1 RT. W reakcji 1 stosunek molowy aptamer:enzym wynosił 1:1, w reakcji 2 – 100:1. Uzyskane wyniki stanowią średnią z trzech niezależnych eksperymentów.

W przypadku reakcji kontrolnej bez aptameru wydajność rekombinacji wynosiła 31,50%. Przy stosunku molowym aptamer:enzym (1:1) ani ATH1.1, ani ATH1.2 nie wykazywał znaczącego wpływu na aktywność rekombinacyjną HIV-1 RT. Przy stokrotnym molowym nadmiarze ATH1.1 i ATH1.2 w stosunku do enzymu

w trzech powieleniach, w których stosunki ilościowe aptamer:enzym wynosiły odpowiednio 1:1; 1:100. Reakcję zatrzymywano przez dodanie 15 µl betainu (βD), następnie denaturowano całość pipetą podgrzając do 95°C i kwadrans schładzając na lodzie. Produkt rozdziano w 10% denaturujący żel poliakrylamidowy i analizowano wykorzystując stany fluorescencji z wykorzystaniem aparatu (PhosphorImager, Typhoon 8600) (Rysunek 22).



Rysunek 22. Wynik aptamerów na aktywne rekombinujący HIV-1 RT. Dla każdego aptameru (A1H1.1, A1H1.2, A1H1) wykonano po 3 reakcje w stosunku 1:1 i 1:100. W próbkach kontrolnych (N-K) nie było aptameru. Wyniki przedstawiono w formie obrazu z wykorzystaniem aparatu Typhoon 8600. Wyniki przedstawiono w formie obrazu z wykorzystaniem aparatu Typhoon 8600.

W wyniku przeprowadzonej analizy stwierdzono, że we wszystkich mieszankach reakcyjnych obecny jest rekombinant. Wynikowość reakcji określono jako wartość procentowa stosunek produktu RAG (Wzrost 3).



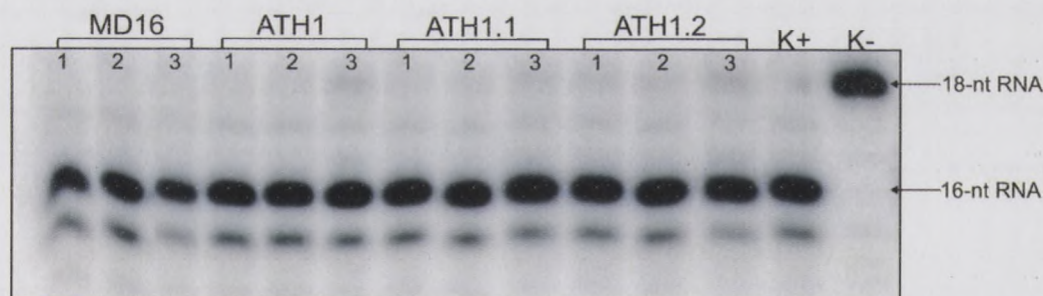
Wzrost 3. Wynik aptamerów na aktywne rekombinujący HIV-1 RT. Wynikowość reakcji określono jako wartość procentową stosunek produktu RAG. Wyniki przedstawiono w formie obrazu z wykorzystaniem aparatu Typhoon 8600.

Przy stosunku ilościowym aptamer:enzym (1:1) ani A1H1.1, ani A1H1.2 nie wykazywał znaczącego wpływu na aktywne rekombinujący HIV-1 RT. Przy stosunku ilościowym nadmiarze A1H1.1 i A1H1.2 w stosunku do czasu

zaobserwowano niewielki wzrost ilości powstających rekombinantów odpowiednio do 36,7% i 47,5%. ATH1 nieznacznie stymulował powstawanie rekombinantów, ale zwiększenie ilości tego aptameru nie powodowało dalszego zwiększania aktywności rekombinacyjnej enzymu. Zaobserwowano ponadto znaczny wpływ aptameru MD16 na aktywność rekombinacyjną HIV-1 RT. Już przy stosunku molowym aptamer:enzym (1:1) ilość rekombinantów wzrastała o 22,8%. Stukrotny nadmiar aptameru dodatkowo zwiększa aktywność enzymu, o 43,2%.

5.1.5 Badanie wpływu aptamerów na aktywność nukleazową Mu-MLV RT

W celu sprawdzenia czy uzyskane aptamery specyficznie rozpoznają jedynie HIV-1 RT, wobec której były selekcjonowane, przeprowadzono serię analogicznych eksperymentów, w których kodowany przez HIV-1 enzym zastąpiono przez odwrotną transkryptazę z Mu-MLV (rozdział 4.2.26). Dla każdego aptameru (MD16, ATH1, ATH1.1, ATH1.2) wykonano 3 niezależne próby. W reakcji oznaczonej numerem 1 podawano 50 pmoli aptameru, w kolejnej (oznaczonej numerem 2) - 150 pmoli, w ostatniej - 300 pmoli (oznaczonej numerem 3) (Rysunek 23). Analiza elektroforetyczna produktów reakcji w 12% denaturującym żelu ujawniła identyczny wzór degradacji we wszystkich próbkach. Pążki pochodzące od substratów i produktów reakcji tylko nieznacznie różniły się intensywnością (Rysunek 23).



Rysunek 23. Wpływ aptamerów na aktywność nukleazową Mu-MLV RT.

Dla każdego aptameru wykonywano po 3 reakcje oznaczone numerami 1, 2, 3. W próbach oznaczonych numerem 1 podawano 50 pmoli aptameru; numerem 2 – 150 pmoli aptameru; numerem 3 – 300 pmoli aptameru. Jako K+ i K- oznaczono reakcje kontrolne, odpowiednio z HIV-1 RT i bez aptameru oraz bez HIV-1 RT i bez aptameru. Użyte w reakcji cząsteczki RNA znakowano radioizotopowo.

Analiza przy zastosowaniu programu Image Quant pozwoliła ustalić stopień przereagowania substratu. Stwierdzono, że aptamery nie wywierały znaczącego wpływu na aktywność nukleazową enzymu (Wykres 4). W przypadku wszystkich próbek obserwowane zmiany mieściły się w zakresie błędu – były więc statystycznie nieistotne.

zobserwowano niewielki wzrost ilości powstających replikowanych cząstek HIV-1. ATHT nieznacznie stymulował powstawanie replikowanych cząstek, natomiast ATHT nie powodował dalszego zwiększenia ilości replikowanych cząstek. Zakończono ponownie znaczący wpływ spłuczki ATHT na aktywację HIV-1. RT. Iż przy stosunku spłuczki ATHT 1:1000 obserwowano wzrost o 22,8%. Stwierdzono natomiast dodatkowy wpływ spłuczki ATHT na aktywację HIV-1.

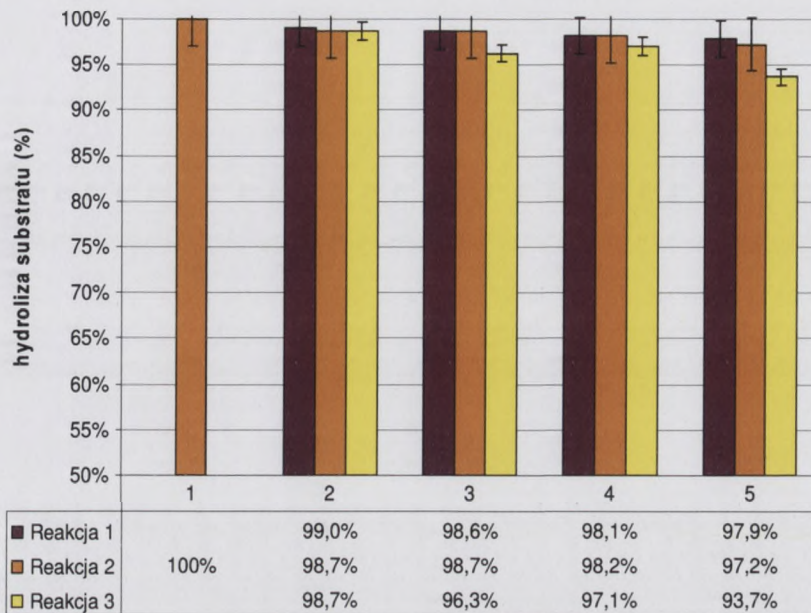
2.1.2. Badania wpływu spłuczki na aktywność nukleazowej Nrt-RT HIV-1

W celu sprawdzenia czy uzyskanie spłuczki ATHT jest konieczne jedynie HIV-1 RT wobec której były efektywne przeprowadzono serię eksperymentów. W tym celu kodowany przez HIV-1 gen transkrypcyjny, gen polimerazy transkryptyzacji z Nrt-RT (gen 5'LTR) oraz gen polimerazy transkryptyzacji z ATHT (gen 3'LTR) zostały zmieszane. W tym celu zmieszano 1000 cząstek spłuczki z kolejną porcją spłuczki (numer 5' - 1000 cząstek spłuczki, numer 3' - 1000 cząstek spłuczki). Analiza aktywności polimerazy transkryptyzacji z ATHT (gen 3'LTR) została przeprowadzona w celu sprawdzenia, czy spłuczka ATHT wpływa na aktywność polimerazy transkryptyzacji z ATHT (gen 3'LTR). Wyniki przedstawiono na rysunku 23.



Rysunek 23. Wpływ spłuczki na aktywność nukleazowej Nrt-RT HIV-1. Czarna linia przedstawia sekwencję genu 5'LTR, która jest transkrybowana przez polimerazę transkryptyzacyjną z ATHT (gen 3'LTR). Czarna linia przedstawia sekwencję genu 3'LTR, która jest transkrybowana przez polimerazę transkryptyzacyjną z Nrt-RT (gen 5'LTR). Czarna linia przedstawia sekwencję genu 3'LTR, która jest transkrybowana przez polimerazę transkryptyzacyjną z Nrt-RT (gen 5'LTR).

Analiza przy zastosowaniu programu Image Quant pozwoliła nam na określenie aktywności spłuczki ATHT. Zwrócić uwagę należy na fakt, że aktywność spłuczki ATHT nie była znacząco różna od aktywności spłuczki kontrolnej. Wyniki przedstawiono na rysunku 24. W przypadku wszystkich próbek aktywność spłuczki ATHT była podobna do aktywności spłuczki kontrolnej.

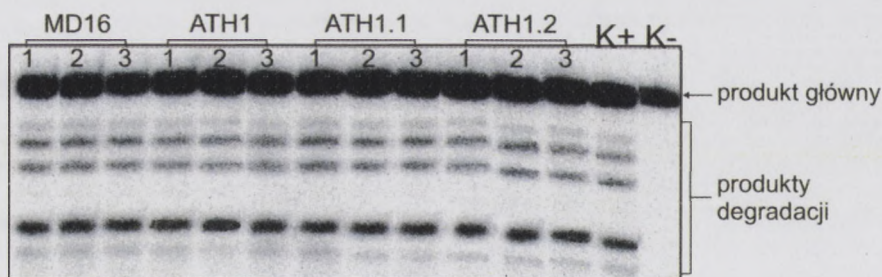


Wykres 4. Wpływ aptamerów na aktywność nukleazową Mu-MLV RT.

Na wykresie przedstawiono wpływ aptamerów na aktywność nukleazową Mu-MLV RT. W reakcji oznaczonej numerem 1 podawano 50 pmoli aptameru; numerem 2 – 150 pmoli aptameru; numerem 3 – 300 pmoli aptameru. Wyniki są wartościami średnimi uzyskanymi z trzech niezależnych eksperymentów.

5.1.6 Badanie wpływu aptamerów na aktywność nukleazową RNazy H z *E. coli*

Dodatkowo postanowiono ustalić czy wyselekcjonowane aptamery mogą wpływać na aktywność RNazy H pochodzącej z *E. coli*. W tym celu przeprowadzono serię analogicznych eksperymentów jak dla HIV-1 RT (rozdział 4.2.26). Jediną różnicą była ilość podawanych aptamerów. W przypadku bakteryjnej RNazy H wykonano reakcje, w których ilości aptamerów wynosiły odpowiednio w reakcjach oznaczonych numerem 1 – 50 pmoli, numerem 2 – 150 pmoli, numerem 3 – 300 pmoli. Dla każdego aptameru wykonano po 3 niezależne eksperymenty.



Rysunek 24. Wpływ aptamerów na aktywność RNazy H pochodzącej z *E. Coli*

Dla każdego aptameru wykonywano po 3 reakcje oznaczone numerami 1, 2 i 3. W próbach oznaczonych numerem 1 podawano 50 pmoli aptameru; numerem 2 – 150 pmoli aptameru; numerem 3 – 300 pmoli aptameru. Reakcje kontrolne z enzymem, bez aptameru oraz bez enzymu i bez aptameru oznaczono jako K+ i K-. Wizualizacji dokonano za pomocą skanera produktów radioizotopowych (Phosphorimager, Typhoon 8600).

Abstract: This study examined the effects of a 12-week training program on the performance of 100 participants. The program consisted of three phases: a 4-week baseline phase, a 4-week training phase, and a 4-week transfer phase. Performance was measured using a standardized test battery. Results showed that performance improved significantly during the training phase and was maintained during the transfer phase. The findings suggest that the training program was effective in enhancing performance and promoting skill transfer.

Keywords: training, performance, skill transfer, baseline, transfer phase. **DOI:** 10.1037/a0012345

3.1.8. Results: The results of the study are presented in Table 1. Performance scores were significantly higher during the training phase compared to the baseline phase. Furthermore, performance scores during the transfer phase were significantly higher than during the baseline phase, indicating that the training had a lasting effect on performance. The improvement in performance was maintained throughout the transfer phase, suggesting that the skills learned during training were effectively transferred to the new task.

Discussion: The findings of this study provide strong evidence for the effectiveness of the training program. The significant improvement in performance during the training phase, coupled with the maintenance of performance during the transfer phase, demonstrates that the program successfully enhanced participants' skills and promoted skill transfer. These results have important implications for the design of training programs, suggesting that a structured, multi-phase approach can be highly effective in promoting long-term performance gains.

Conclusion: The 12-week training program was highly effective in improving performance and promoting skill transfer. The findings support the use of such programs in various professional and educational settings to enhance performance and facilitate the acquisition of new skills.

Zaobserwowano powstawanie bardzo zbliżonego wzoru degradacji we wszystkich mieszaninach reakcyjnych (Rysunek 24). Stwierdzono, że aptamery ATH1, ATH1.1, ATH1.2 i MD16 nie wpływały hamująco na aktywność RNazy H z *E.coli*. Prążki pochodzące od substratu i poszczególnych produktów cięcia tylko nieznacznie różniły się intensywnością.

5.1.7 Określenie stałej dysocjacji kompleksu aptamer-HIV-1 RT

Jedną ze standardowych metod określania stałej dysocjacji kompleksu tworzonych przez cząsteczki A i B polega na ustaleniu jak zmienia się ilość związanego A wraz ze wzrostem stężenia B. W przypadku przeprowadzonych badań zastosowano stałe stężenie RNA oraz wzrastające stężenia białka.

Na wstępie wyznakowane radioizotopowo na końcu 5' aptamery renaturowano przez podgrzanie do 95°C i powolne schłodzenie do temperatury pokojowej. Inkubowano je następnie z HIV-1 RT. Do kolejnych próbek podawano coraz większe ilości białka (w zakresie od 6,5 μM do 45,4 μM). Mieszaniny reakcyjne rozdzielano w 6% natywnym żelu poliakrylamidowym. Jako kontrolę zastosowano wyznakowany radioizotopowo wolny RNA (bez dodatku HIV-1 RT). Po rozdzielaniu elektroforetycznym produkty reakcji analizowano wykorzystując skaner materiałów znakowanych radioizotopowo (Phosphorimager, Typhoon 8600). Na podstawie przeprowadzonych pomiarów (stosując program Image Quant), określono jaki procent RNA wiązał się z HIV-1 RT. Uzyskiwany wynik porównywano z próbką kontrolną.

Wraz ze wzrostem ilości białka podawanego do mieszaniny reakcyjnej można było zauważyć pojawianie się kompleksów HIV-1 RT z aptamerem, zarówno dla ATH1.1, jak i ATH1.2 (Rysunek 25). Niezwiązany RNA migrował znacznie szybciej, niż ten związany z białkiem.

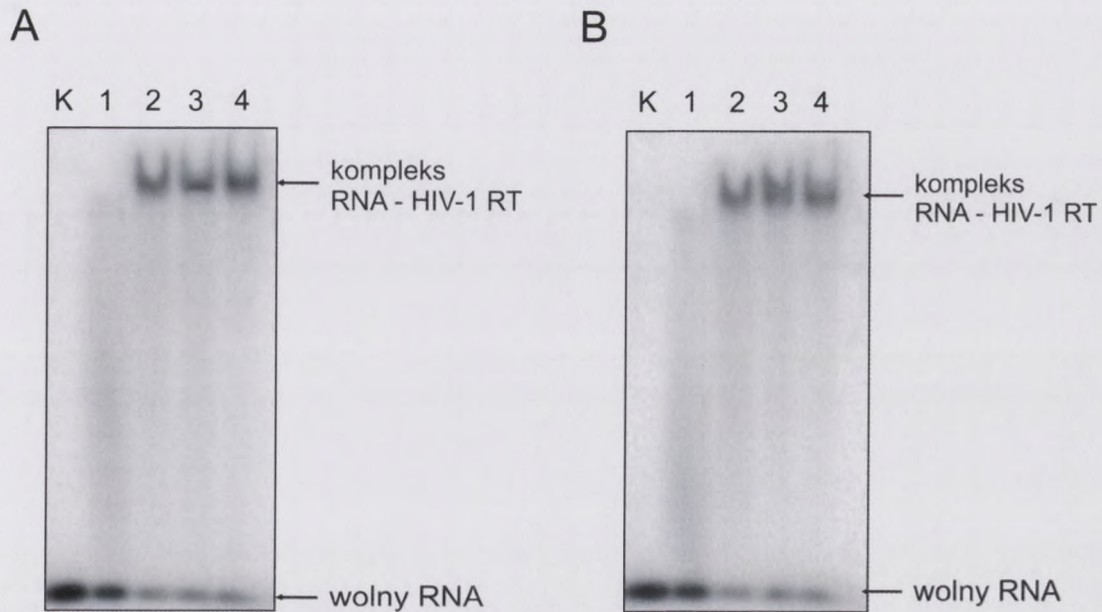
Zabawiano powstawanie białka kłębka wewnątrz komórki w warunkach naturalnych (rysunek 2a). Stwierdzono, że spłany ATH1, ATH1.1, ATH1.2 i MD10 nie wpływają hamująco na aktywność RNAz II z E. coli. Fakt, pochodzący od jednostki i poszczególnych produktów kłębka, byłby nieznacznie różnił się intensywnością.

2.1.7. Odstąpienie stałej dysocjacji kompleksu spłany-HIV-1 RT

Jedną z standardowych metod odstąpienia stałej dysocjacji kompleksu tworzonego przez cząsteczki A i B polega na ustaleniu jak zmienia się ilość związanego A wraz ze wzrostem stężenia B. W przypadku przeprowadzanych badań zastosowano stałe stężenie RNA oraz zmieniające stężenie białka.

Na następne wyznaczenie radioaktywności na końcu 2' spłany testowano przez połączenie do 95°C i powolne schłodzenie do temperatury pokojowej. Labodowano je następnie z HIV-1 RT. Do kolejnych produktów podawano coraz większe ilości białka (w zakresie od 0,5 µM do 45,4 µM) odpowiednio testując rozkładanie w 0,5 minutowym czasie podłożeniowym. Jako kontrolę zastosowano wyznaczenie radioaktywności w białku RNA (bez dodatku HIV-1 RT). Po rozdzielaniu elektroforezowym produkty reakcji analizowano wyznaczając stężenie markerów radioaktywnych (PhosphorImager, Typhoon 5500). Na podstawie przeprowadzonych pomiarów (z pomocą programu ImageQuant) określono jaki procent RNA wstąpił do HIV-1 RT. Uśredniony wynik porównywano z podobną kontrolą.

Wraz ze wzrostem ilości białka podawanego do nieznacznej reakcji można było zauważyć pojawienie się kompleksów HIV-1 RT z spłanem, zarówno dla ATH1, jak i ATH1.2 (rysunek 2b). Niezwiązany RNA przetrwał znacznie szybciej, niż ten związany z białkiem.



Rysunek 25. Określenie stałej dysocjacji kompleksu HIV-1 RT:aptamer

A. Tworzenie kompleksu HIV-1 RT:ATH1.1

B. Tworzenie kompleksu HIV-1 RT:ATH1.2

Produkty reakcji rozdzielano w 6% natywnym żelu poliakryloamidowym. Zaznaczono kompleksy aptamer-białko i wolny RNA. Jako K oznaczono reakcję kontrolną – RNA, w próbach 1, 2, 3, 4 podawano odpowiednio 6,5 μM ; 19,4 μM ; 32,4 μM ; 45,4 μM HIV-1 RT.

Dla obu aptamerów wyznaczono krzywą zależności między stężeniem HIV-1 RT a ilością wiązanej RNA. W oparciu o tę krzywą ustalono wartość stałej dysocjacji. Według definicji jest to takie stężenie białka, przy którym 50% RNA zostaje związane przez białko. Stała dysocjacji dla kompleksu HIV-1 RT:ATH1.1 wynosiła $2,4 \times 10^{-5}$ M, dla kompleksu HIV-1 RT:ATH1.2 wynosiła $2,8 \times 10^{-5}$ M. Wyniki są wartościami średnimi z trzech niezależnie przeprowadzanych eksperymentów.

B

A

4 3 2 1

4 3 2 1

kompleks
RNA - HIV-1 RT

wolny RNA

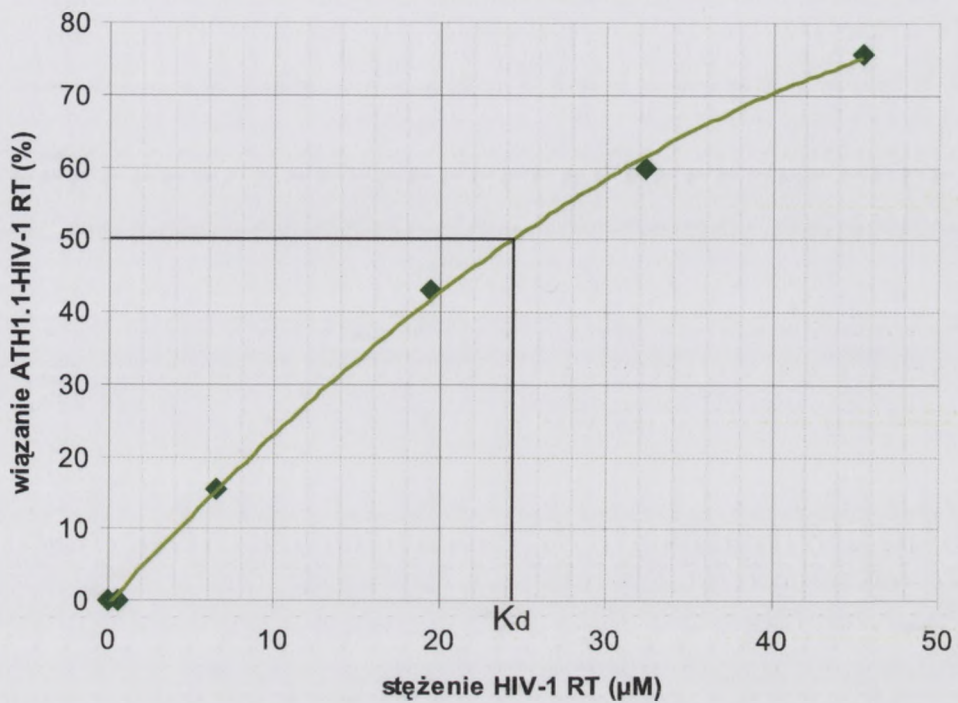
Rysunek 22. Udział w reakcji kompleksu RNA - HIV-1 RT.

A - kompleks RNA - HIV-1 RT.

B - wolny kompleks RNA - HIV-1 RT.

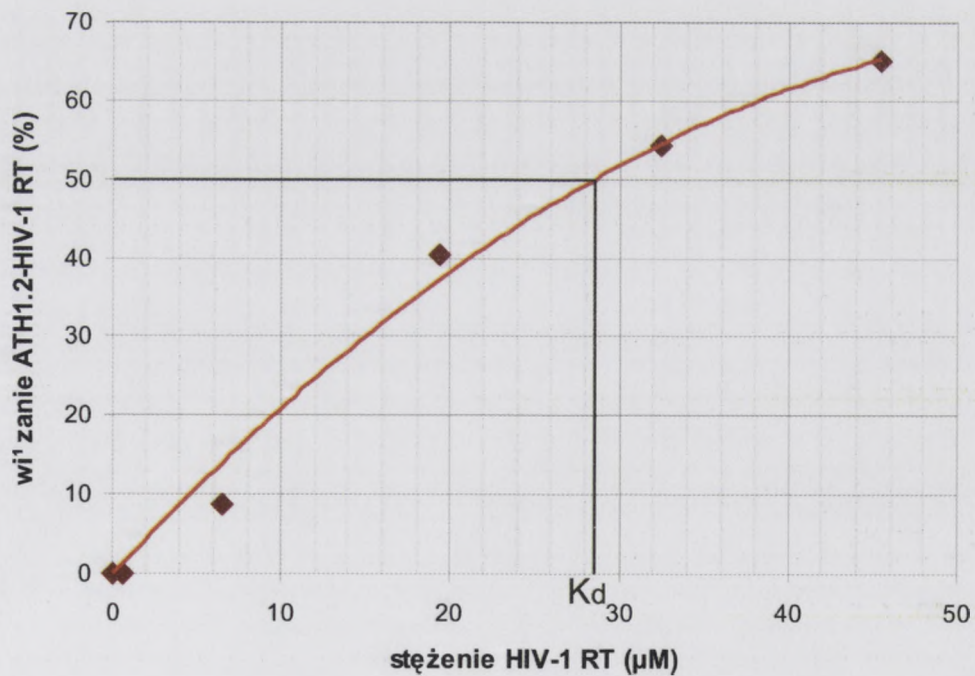
Próbki zostały rozdane w 10-tygodniowym czasie inkubacji. Wyniki analizy autoradiograficznej przedstawiono na rysunku 22. Widać, że w czasie inkubacji następuje zmniejszenie ilości wolnego kompleksu RNA - HIV-1 RT i zwiększenie ilości kompleksu RNA - HIV-1 RT.

W tym celu wykonano wyizolację kwasu nukleinowego z komórek i analizę autoradiograficzną. Wyniki przedstawiono na rysunku 23. Widać, że w czasie inkubacji następuje zmniejszenie ilości wolnego kompleksu RNA - HIV-1 RT i zwiększenie ilości kompleksu RNA - HIV-1 RT. Wyniki te są zgodne z wynikami przedstawionymi na rysunku 22.



Wykres 5. Wiązanie ATH1.1 przez HIV-1 RT

Na wykresie przedstawiono zależność wiązania RNA od stężenia HIV-1 RT. Na podstawie uzyskanej zależności wyznaczono stałą dysocjacji kompleksu, K_d .



Wykres 6. Wiązanie ATH1.2 przez HIV-1 RT

Na wykresie przedstawiono zależność wiązania RNA od stężenia HIV-1 RT. Na podstawie uzyskanej zależności wyznaczono stałą dysocjacji kompleksu, K_d .

5.1.8 Analiza bioinformatyczna

Sprawdzano również czy sekwencje losowe cząsteczek ATH1.1 i ATH1.2 (rozdział 4.2.34), czyli tych wykazujących właściwości hamujące aktywność nukleazową HIV-1 RT, kodowane są w ulegającej transkrypcji części genomu człowieka. Nie zidentyfikowano żadnej takiej sekwencji.

2.1.8 Analiza bioinformatyczna

Stwierdzono również, że sekwencje kodujące ATG1 i ATG2 kodują białka, które wykazują podobieństwo do białek ATG1 i ATG2 z drożdży. Wskazano, że w sekwencji transkrypcyjnej części genu ATG1 znajdują się sekwencje, które są podobne do sekwencji ATG1 z drożdży.

5.1.9 Dyskusja

Domena RNazy H HIV-1 RT jest atrakcyjnym celem terapii przeciwwirusowej. Do tej pory zidentyfikowano jednak tylko kilka inhibitorów tej aktywności odwrotnej transkryptazy [149, 150]. W wyniku przeprowadzonej selekcji *in vitro* zidentyfikowano jedną cząsteczkę specyficznie rozpoznającą i wiążącą HIV-1 RT. Miała ona długość 40 nt. Podczas procesu selekcji doszło do delecji sześci nukleotydowego fragmentu sekwencji losowej. Sekwencje flankujące cząsteczek tworzących bibliotekę kombinatoryczną zaprojektowano w taki sposób, aby parowały się ze sobą tworząc strukturę spinki do włosów, podczas gdy sekwencja losowa tworzyła pętlę. Trudno jednoznacznie stwierdzić dlaczego doszło do utraty znacznej części sekwencji losowej (6 nt z 10 nt). Fragment ten został najprawdopodobniej utracony podczas reakcji odwrotnej transkrypcji lub PCR. Istnieje wiele publikacji wskazujących, iż Mu-MLV jest zdolna do wykonywania przeskoków rekombinacyjnych. Nie można też wykluczyć, że błędy wyniknęły podczas reakcji przeprowadzanej przez polimerazę DNA z *Thermus aquaticus* (polimeaza *Taq*), chociaż charakteryzuje się ona wysoką dokładnością syntezy DNA. W pewnych sytuacjach produkty reakcji zawierają jednak błędy w postaci delecji, insercji bądź substytucji. Zaobserwowano również, że na dokładność z jaką syntetyzowana jest nić potomna wpływać może struktura drugorzędowa matrycy, szczególnie, gdy tworzy ona stabilne struktury spinki (najczęściej zbudowane z dużej ilości par GC) z pętlą terminalną [151]. To, że w puli cząsteczek po piątym cyklu selekcyjnym znalazł się tylko jeden oligorybonukleotyd (ATH1) świadczyć może o tym, że silniej niż inne, pełnej długości cząsteczki RNA, wiązał się on z odwrotną transkryptazą.

Stosując program Mfold potwierdzono wcześniejsze przypuszczenia, iż ATH1 przyjmuje strukturę spinki do włosów o trzonie długości 18. nukleotydów i pętli terminalnej długości 4. nukleotydów. Co ciekawe, w procesie selekcji *in vitro* otrzymano cząsteczkę RNA posiadającą zbliżoną strukturę drugorzędową do opisanych wcześniej w literaturze aptamerów RNA selektywnie wiążących się z domeną RNazową HIV-1 RT [148]. Zdecydowano więc nie kontynuować procesu selekcji *in vitro* i sprawdzić jak ATH1 wpływa na aktywność odwrotnej transkryptazy w porównaniu z innymi zidentyfikowanymi aptamerami. Z zawartych w literaturze informacji wynikało, że to nukleotydy tworzące trzon, a nie pętle są odpowiedzialne za właściwości inhibitorowe. Do dalszych badań postanowiono więc wykorzystać pełnej długości aptamer ATH1, a także jego dwie krótsze wersje – ATH1.1 i ATH1.2. W obu nowoutworzonych cząsteczkach skrócono trzon z 18 pz do 6 pz. Dodatkowo, w ATH1.2 zmieniono zamykającą trzon parę GC na AU, a także środkową parę UG na CG. W testach, w formie kontroli użyto także cząsteczkę MD16, która jak wynikało z badań innych

Domena RNazy H HIV-1 RT jest niezwykle cenną terapią przeciwnowotworową. Do tej pory zidentyfikowano jednak tylko kilka inhibitorów tej aktywności odwrotnej transkrypcji [148, 150]. W wyniku przeprowadzonej selekcji in vitro zidentyfikowano jedną cząstkękę specyficzną rozpraszającą i wiążącą HIV-1 RT. Między ona długość 40 nt. Podczas procesu selekcji doszło do delecji sekwencji kodującej fragment sekwencji losowej. Sekwencje flankujące cząstkękę tworzących dimerów kombinacyjnych zaprezentowano w taki sposób, aby powoływały się na sobą tworząc strukturę zpinu do włosów. Podczas gdy sekwencja losowa tworzyła pętlę. Tylko jednoznacznie stwierdzić dlaczego doszło do zmiany znacznej części sekwencji losowej (6 nt x 10 nt). Fragment ten został najprawdopodobniej usunięty podczas reakcji odwrotnej transkrypcji lub PCR. Istnieje wiele publikacji wskazujących, iż M4-MLV jest zdolna do wykonywania przekształceń rekombinacyjnych. Nie można też wykluczyć, że błędy wynikły podczas reakcji przeprowadzanej przez polimerazę DNA z Yarnum aquaticum (polimeraza Yaq), chociaż charakterystyczne są one wyspami dołączającymi DNA. W pewnych sytuacjach produkty reakcji zawierają jednak błędy w postaci delecji, inserty bądź substytucji. Zbadawano również, że na dołączanie i jaką symetryzowaną jest nie powinna wpływać może zmiana drugorzędowa drugiego sekwencji. Gdy tworzy ona stabilną strukturę zpinu (nagrzanej zbudowanie z daty) może być GC x pętla terminująca [151]. Także w pełni cząsteczek po całym cyklu selekcyjnym znalazł się tylko jeden offgodynowujący (ATH1) (związać może o tym, że bliżej niż inne, pełnej długości cząsteczki RNA, wiąże się on z odwrotną transkrypcją.

Stworzone programy Mfold powiększono wcześniejsze przeprowadzanie, iż ATH1 przynajmniej strukturę zpinu do włosów o trzynie długości 18 nukleotydów i pętli terminującej długości 4 nukleotydów. Co ciekawe, w procesie selekcji in vitro otrzymane cząsteczki RNA posiadały różnorodną strukturę drugorzędową do opisanych wcześniej w literaturze sekwencji RNA selektywnie wiążących się z domeną RNazową HIV-1 RT [148]. Zbadawano więc nie tylko, jak zmienił się proces selekcji in vitro i powoływać jak ATH1 wpływa na aktywność odwrotnej transkrypcji w porównaniu z innymi zidentyfikowanymi sekwencjami. Z zawieszonych w literaturze informacji wynikało, że to nukleotydy tworzące trzon, a nie pętle są odpowiedzialne za właściwości inhibitorowe. Do dalszych badań postanowiono więc wykorzystywać pełnej długości sekwencje ATH1, a także jego dwie krótsze wersje – ATH1.1 i ATH1.2. W celu nowotworzonych cząsteczek skrócono trzon x 18 nt do 6 nt. Dodatkowo, w ATH1.2 zmieniono zamknięcie trzonu pętli GC na AU, a także skrócono pętlę UG na GC. W testach w formie kontrolnej użyto także cząsteczek MD10, która jak wynikało z badań innych

autorów, jest silnym inhibitorem domeny RNazy H obecnej w HIV-1 RT [148] (patrz Rysunek 18).

W wyniku przeprowadzonej analizy stwierdzono, że najefektywniejszym inhibitorem RNazy H z HIV-1 RT jest ATH1.1. Obniżał on aktywność nukleazową HIV-1 RT o 82% w reakcji, w której stosunek molowy aptamer:enzym wynosił 50:1 (patrz Rysunek 19, Wykres 2). Wartość IC_{50} określa stężenie inhibitora, które jest wymagane do zredukowania aktywności cząsteczki docelowej o 50%. W przypadku ATH1.1 IC_{50} wynosiła 8 μ M. ATH1.2 okazał się być słabszym inhibitorem, gdyż obniżał aktywność RNazy H tylko o 32% (patrz Rysunek 19 Wykres 2). Zarówno ATH1.1, jak i ATH1.2 nie wpływały na pozostałe aktywności HIV-1 RT (patrz Rysunek 20, 22). Nie wykazywały także właściwości inhibitorowych wobec Mu-MLV-RT oraz RNazy H pochodzącej z *E. coli* (patrz Rysunek 23, 24). Potwierdzono zatem, że to nukleotydy wchodzące w skład trzonu dsRNA odpowiedzialne są za inhibowanie enzymu. Nie wiadomo natomiast jak bardzo istotna w oddziaływaniach z RT jest pętla terminalna inhibitorowych cząsteczek RNA. Cząsteczki ATH1.1 i ATH1.2 różniły dwie pary zasad budujące 6-nukleotydowy trzon, a wykazano, że ATH1.1 jest znacznie silniejszym inhibitorem aktywności nukleazowej niż ATH1.2.

Pełnej długości aptamer ATH1 obniżał aktywność nukleazową HIV-1 RT o 15%, dla pięćdziesięciokrotnego molowego nadmiaru wobec enzymu. Podobnie MD16 (cząsteczka kontrolna) w stosowanym układzie badawczym hamowała efektywność tworzenia produktów cięcia zaledwie o 17%.

Z opisanych do tej pory w literaturze oligonukleotydów, tylko krótkie RNA tworzące struktury spinki do włosów wykazywały selektywną zdolność do hamowania tylko aktywności nukleazowej HIV-1 RT. Analiza struktury krystalicznej HIV-1 RT ujawniła, że centra aktywności polimerazowej i nukleazowej są zlokalizowane na dwóch końcach cząsteczki, a dzielący je dystans odpowiada długości osiemnastonukleotydowego dupleksu RNA/DNA [95]. Na podstawie poczynionych obserwacji sądzić można, że w obrębie HIV-1 RT domena polimerazowa i RNazy H funkcjonują w dużej mierze niezależnie od siebie. Zebrane dotychczas przez innych autorów dane nie potwierdzają jednak tego poglądu. Wykazano bowiem, że mutacje wprowadzane w domenie polimerazowej wpływają na aktywność nukleazową i odwrotnie [95].

Ciekawe wydają się również wyniki badania wpływu aptamerów na zdolność HIV-1 RT do wykonywania przeskoków rekombinacyjnych. Cząsteczka MD16, która nie inhibowała ani aktywności polimerazowej, ani nukleazowej RT, stymulowała powstawanie rekombinantów. W reakcji, w której stosunek molowy enzym:aptamer wynosił (1:1),

ilość powstających rekombinantów wzrastała o 22.8%. Dla stukrotnego molowego nadmiaru zaobserwowano zwiększenie wydajności rekombinacji o 66%. Podobnie ATH1 stymulował powstawanie rekombinantów (wzrost wydajności rekombinacji o 17%), zarówno dla równomolowej ilości aptameru i enzymu, jak i dla stukrotnego nadmiaru ATH1. Tymczasem aptamery inhibujące aktywność RNazy H praktycznie nie wpływały na rekombinację, jeżeli ich stosunek wobec enzymu wynosił 1:1, przy stukrotnym molowym nadmiarze ATH1.1 powodował zwiększenie częstości rekombinacji o 17%, a ATH1.2 o 51%. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono zatem, że zdolność HIV-1 RT do wykonywania przeskoków rekombinacyjnych stanowić może kolejną, w dużej mierze niezależną funkcję odwrotnej transkryptazy.

Z zawartych w literaturze informacji wynika, że MD16 efektywnie hamował aktywność nukleazową HIV-1 RT ($IC_{50} = 7.8 \times 10^{-6} \text{ M}$) [148]. Okazuje się jednak, iż w przypadku enzymów wirusowych poziom inhibicji może się zmieniać w zależności od tego jaki wariant danego białka zostanie użyty. Wykazano bowiem, że MD16 tylko nieznacznie hamował aktywność odwrotnej transkryptazy wirusa HIV-1 wykorzystywanej w niniejszych badaniach. Przy najwyższym przebadanym stężeniu aptameru (15 μM , stosunek MD16:HIV-1 RT wynosiła 100:1) uzyskano obniżenie aktywności nukleazowej zaledwie o około 17%. Tymczasem przeprowadzone przez Hannousha i współpracowników testy wykazały, że MD16 skutecznie inhibował aktywność innego wariantu HIV-1 RT, wartość IC_{50} wynosiła $7,8 \times 10^{-6}$. Przeprowadzone badania dowodzą zatem, iż w przypadku białek wirusowych trudno jest uzyskać uniwersalne inhibitory ich aktywności enzymatycznych. Wniosek dotyczy nie tylko aptamerów, jest też zgodny z wieloletnimi doświadczeniami dotyczącymi leczenia chorób wirusowych. Pomimo niezwykle intensywnych poszukiwań, jak dotąd nie znaleziono żadnego leku skutecznie zwalczającego infekcje wywoływane przez wirusy RNA i renowirusy. Wiadomo, że HIV potrzebuje zwykle zaledwie kilku tygodni czy miesięcy, by stać się opornym na każdy stosowany dotychczas lek. Podstawową przyczyną takiego stanu jest niezwykle zmienność genetyczna wirusów RNA i renowirusów. W organizmie chorego nie tworzą one jednorodnych populacji, lecz stanowią zbiór wielu, często wyraźnie różnych wariantów. Z drugiej jednak strony uzyskane dane wskazują, iż istnieje szansa skutecznej inhibicji konkretnych wariantów enzymów wirusowych poprzez zastosowanie różnych aptamerów. W związku z tym istnieje ciągła potrzeba poszukiwania cząsteczek inhibitorowych, by skutecznie walczyć z infekcjami wywołwanymi przez wirus HIV-1.

Większość opisanych do tej pory substancji, hamujących specyficjnie, bądź niespecyficjnie aktywność nukleazową HIV-1 RT została opisana w pracach

liczba powstających rekombinatów wzrosła o 25,8%. Dla skutecznego molowego nadmiaru zapobiegawczo zwiększono wydajność rekombinacji o 60%. Podobnie ATH1 stymulował powstawanie rekombinatów (wartość wydajności rekombinacji o 17%), zarówno dla równomolowej ilości reagentów i enzymu, jak i dla skutecznego nadmiaru ATH1. Tymczasem reagenty - inhibitory aktywności RNazy H praktycznie nie wpływały na rekombinację, jeżeli ich stosunek wobec enzymu wynosił 1:1. Przy skutecznym molowym nadmiarze ATH1 powodował zwiększenie efektywności rekombinacji o 17%, a ATH1 3 o 31%. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono zatem, że zdolność HIV-1 RT do wykonywania przekroczeń rekombinacyjnych stanowi może kolejny w dotychczasowej niezachowanej funkcji odwrotnej transkrypcji.

Z zawartych w literaturze informacji wynika, że MDG10 skutecznie hamował aktywność odwrotnej transkrypcji HIV-1 RT ($IC_{50} = 7,8 \times 10^{-7} M$) [148]. Okazuje się jednak, iż w przypadku skutecznego poziomu inhibicji może się zdarzyć w zależności od tego jaki warunek dany jest, że niekiedy występuje. Wynikano bowiem, że MDG10 tylko nieznacznie hamował aktywność odwrotnej transkrypcji wirusa HIV-1 wykonywaną w mielnikach badawczych. Przy najwyższym przebadanym stężeniu reagentu (0,2 μM , stosunek MDG10:HIV-1 RT wynosiła 100:1) uzyskano obniżenie efektywności odwrotnej transkrypcji o około 17%. Tymczasem przeprowadzone przez Hanoussis i współpracowników testy wykazały, że MDG10 skutecznie inhibował aktywność innego wirusa HIV-1 RT, wartość IC_{50} wynosiła $7,8 \times 10^{-7}$. Przeprowadzone badania dowiodły zatem, iż w przypadku badań wirusowych trudno jest uzyskać uniwersalne inhibicje ich aktywności enzymatycznych. Wniosek dopuszczalny jest, że jest to zgodny z wieloletnimi doświadczeniami dotyczącymi leczenia chorób wirusowych. Pomimo niezwykłej skuteczności przeciwciał, jak dotąd nie znaleziono żadnego leku skutecznego zwalczającego infekcje wywoływane przez wirusy RNA i retrowirusy. Wiadomo, że HIV potrzebuje zwiększonej liczby receptorów, aby móc się przyczepić do komórki i wniknąć do wnętrza komórki. Podobnie jak w przypadku innych wirusów, niekiedy zmniejszenie liczby receptorów RNA i retrowirusów. W organizmie człowieka tworzy one jednorodne populacje, lecz stanowią zbiór wielu, często wyjątkowo różnorodnych wirusów. Z drugiej strony uzyskać dane wskazują, iż istnieje szansa skutecznego inhibicji konkretnych wirusów wirusowych poprzez zastosowanie cząsteczek reagentów. W związku z tym istnieje śluga potrzeba poszukiwania cząsteczek inhibitorycznych, by skutecznie walczyć z infekcjami wywołwanymi przez wirus HIV-1.

Większość opinii do tej pory sugeruje, iż hamujących specyficznie białek niespecyficznie aktywność odwrotnej transkrypcji HIV-1 RT zostało opisane w pracach

przeładowych Tramontano [149] i Klumppa [150]. Wynika z nich, iż uzyskane do tej pory inhibitory HIV-1 RT hamują zwykle obie aktywności RT. Uzyskane wcześniej aptamery [152] z podobną siłą hamują aktywność RNazową RT ($IC_{50} = 0.5 \times 10^{-6} \text{ M}$) oraz polimerazową HIV-1 RT ($IC_{50} = 1.5 \times 10^{-6} \text{ M}$). Naturalne substancje uzyskane z alg i grzybów, znane z właściwości antykoagulacyjnych i przeciwzapalnych (heparyna, polisialiczan ksylanu, siarczan dekstranu), inhibują aktywność nukleazową HIV-1 RT ze współczynnikiem $IC_{50} = 0,1 - 8 \times 10^{-9} \text{ M}$, wykazując wysoką specyficzność, ponieważ aktywność polimerazową hamują w znacznie wyższych stężeniach (250-5000 razy). Illimachinon, metabolit wtórny z gąbki z Morza Czerwonego *Smenospongia sp.*, wykazuje wiele różnych aktywności farmakologicznych, np.: hamuje indukowane chemicznie stany zapalne i podziały komórkowe. Inhibuje również aktywność nukleazową ($IC_{50} = 15 \times 10^{-6} \text{ M}$) i polimerazową ($IC_{50} > 140 \times 10^{-6} \text{ M}$) HIV-1 RT.

Stała dysocjacji (K_d) jest specyficznym rodzajem stałej równowagi, za pomocą której mierzy się między innymi skłonność dużych złożonych kompleksów do odwracalnego rozpadu na tworzące je mniejsze komponenty. K_d odpowiada takiemu stężeniu białka, przy którym jego miejsce wiążące jest w połowie wysycone ligandem. K_d jest mierzona w molach (M) i stanowi odwrotność stałej powinowactwa. Im mniejsza jest wartość stałej dysocjacji, tym silniej ligand oddziałuje z białkiem, a co za tym idzie - tym wyższe powinowactwo wobec niego wykazuje. Subnanomolarne stałe dysocjacji są w naturze rzadko spotykane. Wyjątkiem jest np.: kompleks biotyna-awidyna ze stałą dysocjacji 10^{-15} M [153], czy też kompleksy jakie białkowe inhibitory tworzą z ludzką rybonukleazą z trzustki ze stałą dysocjacji 10^{-15} M [154]. Stałe dysocjacji konkretnego kompleksu ligand-białko mogą się zmieniać pod wpływem temperatury, pH roztworu czy też stężenia soli. Wyznaczone dla ATH1.1 (patrz Rysunek 25A, Wykres 5) i ATH1.2 (patrz Rysunek 25B, Wykres 6) wartości stałej dysocjacji wynoszą odpowiednio $2.4 \times 10^{-7} \text{ M}$ i $2.8 \times 10^{-7} \text{ M}$.

Wykazano ponadto, że ani ATH1.1, ani ATH1.2 nie występują w ulegającej transkrypcji części genomu człowieka. Wynik ten nie był zaskoczeniem. Genomowe cząsteczki (-)ssRNA są egzogenne dla organizmu człowieka. Uważa się, że HIV pochodzi od wirusa SIV, który infekuje małpy naczelne zamieszkujące kontynent afrykański. Z kolei SIV wywodzi się najprawdopodobniej od retrowirusa, który w dalekiej przeszłości nabył zdolność infekowania małp [155]. Przodek wirusa HIV przekroczył barierę międzygatunkową małpa-człowiek najprawdopodobniej dopiero na początku ubiegłego wieku. W związku z tym, w stosunkowo krótkim czasie, jaki upłynął od momentu rozprzestrzenienia się HIV w populacji człowieka, organizm ludzki nie był najprawdopodobniej w stanie wykształcić mechanizmów

Wyniki badań nad skutecznością i toksycznością leku w modelu zwierzęcym.

W badaniach nad skutecznością leku w modelu zwierzęcym, zastosowano następujące dawki:

1. RT 0,1 - 1,7 x 10⁷ M, RT 0,1 - 1,7 x 10⁸ M, RT 0,1 - 1,7 x 10⁹ M.

W badaniach nad toksycznością leku, zastosowano następujące dawki:

1. RT 0,1 - 1,7 x 10⁷ M, RT 0,1 - 1,7 x 10⁸ M, RT 0,1 - 1,7 x 10⁹ M.

W badaniach nad skutecznością leku w modelu in vitro, zastosowano następujące dawki:

1. RT 0,1 - 1,7 x 10⁷ M, RT 0,1 - 1,7 x 10⁸ M, RT 0,1 - 1,7 x 10⁹ M.

W badaniach nad toksycznością leku w modelu in vitro, zastosowano następujące dawki:

1. RT 0,1 - 1,7 x 10⁷ M, RT 0,1 - 1,7 x 10⁸ M, RT 0,1 - 1,7 x 10⁹ M.

W badaniach nad skutecznością leku w modelu in vivo, zastosowano następujące dawki:

1. RT 0,1 - 1,7 x 10⁷ M, RT 0,1 - 1,7 x 10⁸ M, RT 0,1 - 1,7 x 10⁹ M.

W badaniach nad toksycznością leku w modelu in vivo, zastosowano następujące dawki:

1. RT 0,1 - 1,7 x 10⁷ M, RT 0,1 - 1,7 x 10⁸ M, RT 0,1 - 1,7 x 10⁹ M.

W badaniach nad skutecznością leku w modelu in vivo, zastosowano następujące dawki:

1. RT 0,1 - 1,7 x 10⁷ M, RT 0,1 - 1,7 x 10⁸ M, RT 0,1 - 1,7 x 10⁹ M.

zwiększających odporność wobec HIV (np.: miRNA). Mechanizmy takie zostały niedawno odkryte dla innych wirusów, np.: PFV-1 (ang. *primate foamy virus type 1*) [156].

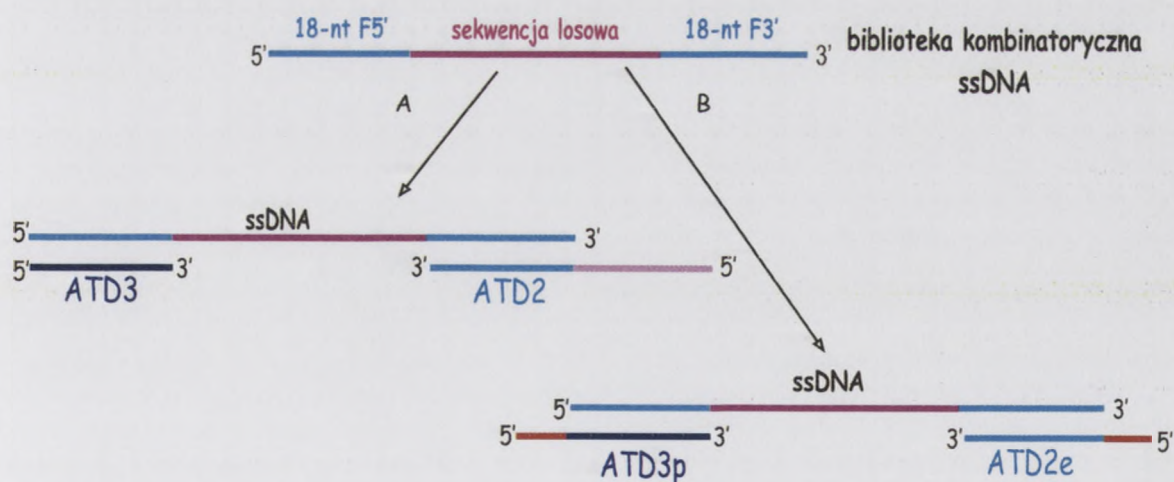
zwiększenia odporności wobec HIV (np.: miRNA). Mechanizmy takie zostały niedawno odkryte dla innych wirusów, np.: EBV-1 (ang. Epstein-Barr virus type 1) [136].

5.2 Selekcja aptamerów RNA specyficznie wiążących Dicer

5.2.1 Przygotowanie biblioteki kombinatorycznej

Podobnie jak to miało miejsce w przypadku aptamerów wiążących HIV-1 RT, proces selekcji rozpoczęto od zaprojektowania biblioteki kombinatorycznej oligodeoksynukleotydów. Tworzyły ją cząsteczki zawierające dwudziestonukleotydową sekwencję losową. Kompletna biblioteka powinna zatem zawierać 4^{20} , czyli $1,1 \times 10^{12}$ cząsteczek różniących się sekwencją losową. Do pierwszego cyklu selekcji użyto 600 pmoli ssDNA, czyli $3,6 \times 10^{14}$ cząsteczek. Teoretycznie można było zatem założyć, że wszystkie możliwe sekwencje losowe były w niej reprezentowane co najmniej jeden raz.

W zastosowanej bibliotece kombinatorycznej sekwencja losowa o długości 20. nukleotydów oflankowana była przez osiemnastonukleotydowe niekomplementarne odcinki F3' i F5' o znanej sekwencji (Rysunek 26). Zaprojektowano także dwie pary starterów: ATD2 i ATD3 oraz ATD2e i ATD3p. Startery ATD2 i ATD3 wykorzystywano do amplifikacji ssRNA po każdym cyklu selekcyjnym. 35-nukleotydowy ATD2, oprócz sekwencji identycznej jak F5', posiadał 17-nukleotydową sekwencję promotora polimerazy T7. 18-nukleotydowy ATD3 był komplementarny do F3'. Startery ATD2e i ATD3p stosowano do amplifikacji cząsteczek, które następnie klonowano do wektora pUC19. ATD2e różnił się od ATD2 tym, że sekwencję promotora polimerazy T7 zastąpiono sekwencją rozpoznawaną przez enzym restrykcyjny EcoRI. ATD3p powstał przez dodanie na końcu 5' startera ATD3 sekwencji rozpoznawanej przez enzym restrykcyjny PstI.



Rysunek 26. Biblioteka kombinatoryczna i startery wykorzystane do selekcji aptamerów wiążących Dicer.

- Startery ATD2 i ATD3 wykorzystywane były do reakcji PCR podczas procesu selekcji *in vitro*. Starter ATD2 dodatkowo zawierał promotor polimerazy RNA T7, zaznaczony na różowo.
- Startery ATD2e i ATD3p zawierały sekwencje rozpoznawane przez enzymy restrykcyjne, odpowiednio EcoRI i PstI, zaznaczone na czerwono.

5.2.2 Selekcja aptamerów wobec Dicer

W przypadku ludzkiej rybonukleazy Dicer zastosowano analogiczną procedurę selekcji aptamerów, jak dla HIV-1 RT. W pierwszym etapie zamplifikowano tworzące bibliotekę jednoniciowe cząsteczki DNA metodą PCR (rozdział 4.2.11). W tym celu wykorzystano starter ATD2, posiadający na końcu 3' sekwencję promotorową dla polimerazy RNA T7 oraz starter ATD3. Otrzymaną pulę dsDNA wykorzystano jako matryce do otrzymania jednoniciowych cząsteczek RNA metodą transkrypcji *in vitro*. Selekcję prowadzono wobec komercyjnie dostępnej ludzkiej rybonukleazy Dicer, według następującego schematu:

- znakowanie RNA na końcu 5' przy wykorzystaniu $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (rozdział 4.2.14),
- oczyszczanie wyznakowanego RNA metodą fenol/chloroform (rozdział 4.2.15),
- pomiar poziomu radioaktywności RNA przy zastosowaniu licznika scyntylicyjnego Beckmann LS 7000,
- wiązanie RNA z Dicer przy zastosowaniu 10-krotnego molowego nadmiaru RNA w stosunku do białka (rozdział 4.2.16),
- odmycie niezwiązanego RNA przy zastosowaniu sita molekularnego 30 kDa, (rozdział 4.2.16),
- izolacja RNA związanego z rybonukleazą Dicer (rozdział 4.2.16),
- pomiar poziomu radioaktywności wyizolowanego RNA przy zastosowaniu licznika scyntylicyjnego Beckmann LS 7000,
- przepisanie ssRNA na ssDNA w procesie odwrotnej transkrypcji, stosowano starter ATD3 (rozdział 4.2.17),
- amplifikacja ssDNA metodą PCR przy zastosowaniu starterów ATD2 i ATD3 (rozdział 4.2.11).

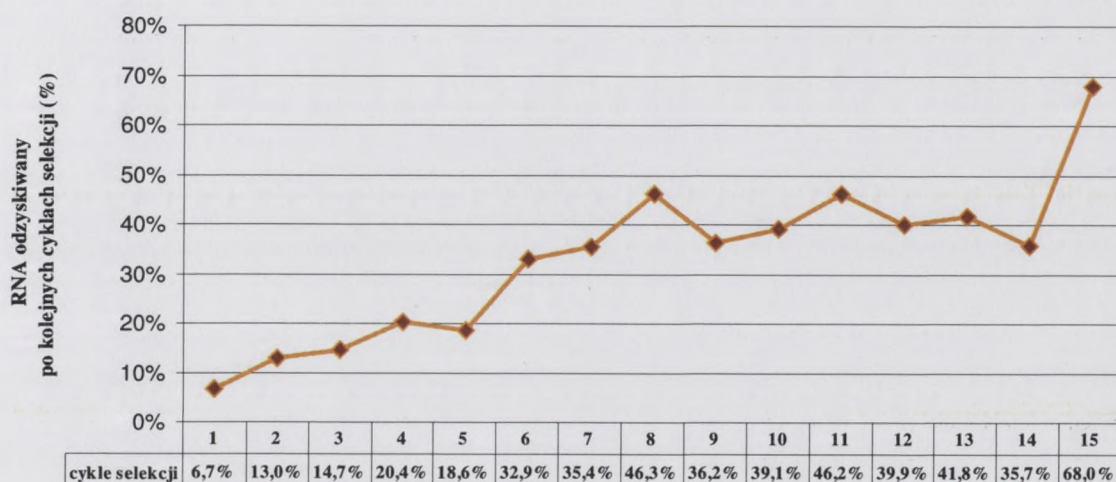
Każdy kolejny cykl selekcji rozpoczynał się od otrzymania zawężonej puli RNA metodą transkrypcji *in vitro*. W reakcji tej jako matrycę wykorzystywano dsDNA zamplifikowany w ostatnim etapie poprzedniego cyklu. Przeprowadzono 15 cykli selekcyjnych. Wzbogacenie puli RNA w sekwencje wiążące Dicer obliczano na podstawie różnicy w poziomie radioaktywności RNA użytego do selekcji i RNA odzyskanego z kompleksu z Dicer (Wykres 7). Po 1. cyklu 6,7% cząsteczek RNA z puli wyjściowej wiązało się z Dicer, a po 15. cyklu 68%. Uzyskano więc około dziesięciokrotne wzbogacenie puli RNA wiążących się z rybonukleazą.

2.2.3. Selekcja aptamerów wobec Dicer

W przypadku ludzkiej rybonukleazy Dicer zastosowano analogiczny procedurę selekcji aptamerów, jak dla HIV-1 RT. W pierwszym etapie zamplifikowano tworząc bibliotekę jednoniciowej cząsteczki DNA metodą PCR (rozdział 4.2.11). W tym celu wykorzystano starter ATD3, posiadający na końcu 3' sekwencję promotorową dla polimerazy RNA T7 oraz starter ATD1. Oczyszczoną pulę ddDNA wykorzystano jako matrycę do otrzymania jednoniciowych cząsteczek RNA metodą transkrypcji *in vitro*. Selekcję prowadzono wobec komercyjnie dostępczej ludzkiej rybonukleazy Dicer, według następującego schematu:

- znakowanie RNA na końcu 5' przy wykorzystaniu γ -³²P-ATP (rozdział 4.2.14),
- oczyszczanie wyznakowanego RNA metodą fenolochloroform (rozdział 4.2.13),
- pomiar poziomu radioaktywności RNA przy zastosowaniu licznika scyntylacyjnego Beckmana LS 7000,
- wiązanie RNA z Dicer przy zastosowaniu 10-krotnego molowego nadmiaru RNA w stosunku do białka (rozdział 4.2.10),
- odcięcie niezwiązanego RNA przy zastosowaniu siły mechanicznej 30 kDa (rozdział 4.2.16),
- izolacja RNA związanego z rybonukleazą Dicer (rozdział 4.2.16),
- pomiar poziomu radioaktywności wyizolowanego RNA przy zastosowaniu licznika scyntylacyjnego Beckmana LS 7000,
- przepisanie sRNA na cDNA w procesie odwrotnej transkrypcji, stosowano starter ATD3 (rozdział 4.2.17),
- amplifikacja sDNA metodą PCR przy zastosowaniu starterów ATD1 i ATD3 (rozdział 4.2.11)

Każdy kolejny cykl selekcji rozpoczynał się od oczyszczenia zawiesiny puli RNA metodą transkrypcji *in vitro*. W każdej tej jako matrycę wykorzystywano ddDNA zamplifikowany w ostatnim etapie poprzedniego cyklu. Przeprowadzono 15 cykli selekcji. Wzrostanie puli RNA w sekwencje wiązanej Dicer obserwowano na podstawie różnicy w poziomie radioaktywności RNA ujętego do selekcji i RNA odzyskanego z kolumny z Dicer (Wykres 7). Po 1. cyklu 6,7% cząsteczek RNA z puli wyiklowej wiązało się z Dicer, a po 15. cyklu 68%. Liczono więc około dziesięciokrotne wzroście puli RNA wiążących się z rybonukleazą.



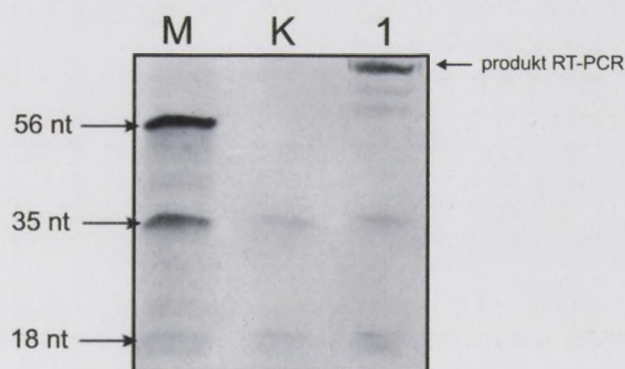
Wykres 7. Analiza wzbogacania puli RNA w cząsteczki wiążące Dicer w kolejnych cyklach selekcji.

Aby zawęzić pulę cząsteczek RNA do tych, które najsilniej wiążą się z Dicer, w końcowych etapach selekcji zaostrożono jej warunki, i tak:

- w dwunastym cyklu zastosowano dwukrotnie bardziej stężony bufor do selekcji aptamerów RNA,
- w czternastym cyklu podniesiono temperaturę inkubacji RNA z Dicer do 40°C, a w piętnastym do 42°C.

Sekwencjonowanie

Po każdym cyklu przeprowadzano analizę produktów reakcji RT-PCR w 12% denaturującym żelu poliakryloamidowym (rozdział 4.2.18).



Rysunek 27. Analiza produktów reakcji RT-PCR po 5 cyklu selekcji wobec Dicer.

Na rysunku zaznaczono uzyskany produkt RT-PCR. Jako kontrole zastosowano marker długości DNA (M) i próbkę, do której dodano tylko startery AT2 i AT3 i enzym (K).

Otrzymywany na końcu każdego cyklu selekcyjnego produkt reakcji RT-PCR powinien mieć długość 73 nukleotydów, gdyż do amplifikacji używano startery ATD2 i ATD3. Drugą parę starterów (ATD2e i ATD3p) stosowano po 5., 10., 13. i 15. cyklu selekcyjnym, kiedy to wyselekcjonowane cząsteczki poddawano sekwencjonowaniu zgodnie z procedurą opisaną w rozdziałach 4.2.19 – 4.2.22.

Po 5 cyklu określono sekwencje losowe 10. cząsteczek. Nie posiadały żadnych wspólnych motywów sekwencyjnych, dlatego przeprowadzano kolejne cykle selekcji. Po 10. cyklu przesekwencjonowano 37 cząsteczek. Posiadały one wspólne motywy, jednak wzbogacenie puli RNA w cząsteczki wiążące Dicer nie było zadowalające, dlatego też zdecydowano się wykonać kolejne cykle selekcji. Po 13. cyklu określono sekwencje 20. cząsteczek a po 15. cyklach – 86. Łącznie po 10., 13. i 15. cyklach uzyskano 143 sekwencje potencjalnych aptamerów RNA. Zawarte w nich sekwencje losowe pokazano na Rysunkach 28, 29, 30. Sekwencje wszystkich cząsteczek RNA poddane zostały analizom bioinformatycznym.

>ATD_10.1
CAACCCGAACUCGUCUCUGC
>ATD_10.4
AAUGUACUGCCACCCGUCC
>ATD_10.5
UGGCUGCUGCAUACCUAGG
>ATD_10.6
CGACCGUCCUUACCCCGCC
>ATD_10.8
CAACAGCACACCCGCCCGCC
>ATD_10.10
UCUACCCUUCUGCGCGUACC
>ATD_10.11
CAAUAAGUAAACCGCCUGUG
>ATD_10.12
UCUACCCUUCUGCGCGUACC
>ATD_10.13
CAAUAAGUAAACCGCCUGUG
>ATD_10.19
AGCACUCACUGCCUUCUUCU
>ATD_10.20
UGGUUUGCCCAACCGAUCC
>ATD_10.22
GCACCCAAUCCCUCCACUCG
ATD_10.23

UCGAUUCGACCGCCCCUG
>ATD_10.24
UCAUGACCUCUACCCGUGUCC
>ATD_10.25
UAUACGUACUGCCACACCCG
>ATD_10.27
UCAGCCUCCAACCCCGGUCC
>ATD_10.29
CCAUAGUCCACCCGACUUC
>ATD_10.31
CAAGGAUCACCGCGUGUCC
>ATD_10.32
GCCACCGUAAGCGAGUGUGC
>ATD_10.34
CGCUGGUGCCGUAUCCAUGC
>ATD_10.35
UGCCCAUUAUUGCCCCGCC
>ATD_10.37
GCUAUCUCCAUUGAGCCCAUGC
>ATD_10.40
CAUACACCCUGUCCGUGUCC
>ATD_10.42
AGCGCAGUAAACCCACGUGC
>ATD_10.47
CGAGTATGGCCACGCTGCC

>ATD_10.53
UCGACACCCGCUUACAGUCC
>ATD_10.54
UCGACACCCCUUCCAGUCC
>ATD_10.56
UCGAGGCCACGCUGUGGU
>ATD_10.57
UCGACACCCCUUCCAGUCC
>ATD_10.62
CCGCCUAAGACCUCUCGUCC
>ATD_10.63
ACUACCCAUUCGCCUUGGCC
>ATD_10.65
CGGCAAGCACGACACACGGC
>ATD_10.66
ACUACCCAUUCGCCUUGGCC
>ATD_10.67
CCGCCUAAGACCUCUCGUCC
>ATD_10.68
CGGCAAGCACGACACACGGC
>ATD_10.69
CGGCAAGCACGACACACGGC
>ATD_10.70
CGGCAAGCACGACACACGGC

Rysunek 28. Sekwencje losowe uzyskane po 10 cyklu selekcji wobec Dicer.

>ATD_13.1
GGACCGACACUCAUUGCGCC
>ATD_13.2
UCUAGUCCCGUCCUGGCC
>ATD_13.3
UAGUGCAUCUCCUUCUGGCC
>ATD_13.4
CCGCAGGUCUCGGCCCGCC
>ATD_13.5
CCCUCGUUCACUCCCC
>ATD_13.6
GGUGUGUGAGUCGUGGUGCC
>ATD_13.7
CGGCUCCCCGCACUACCUCC

>ATD_13.8
GAUUGUGGCCCGACCCGUCC
>ATD_13.9
UGCACAGUCCUUCUGCUCUCC
>ATD_13.10
GCAACUUGCCGUACCCCGCC
>ATD_13.11
UACACUCACCAAUCCCGCC
>ATD_13.12
GUCAAUCAUCCUUG
>ATD_13.13
CUGCCC
>ATD_13.14
CUCCCC

>ATD_13.15
CUCCCC
>ATD_13.16
CUCCCC
>ATD_13.17
CUGCCC
>ATD_13.18
CUCCCC
>ATD_13.19
CUCCCC
>ATD_13.20
CUCCCC

Rysunek 29. Sekwencje losowe uzyskane po 13 cyklu selekcji wobec Dicer.

Ogryzany na końcu każdego cykła selekcyjnego produktu reakcji RT-PCR powinien mieć długość 73 nukleotydów, gdyż do amplifikacji używane są sekwencje ATD2 i ATD3. Drugi par sekwencji (ATD2 i ATD3a) stosowano po 2, 10, 13 i 15. cyklu selekcyjnym, kiedy to wyliczono wartość efektywności poddawano skwantyfikowanemu zgodnie z procedurą opisaną w nawiązaniu 4.3.19-4.3.23.

Do 2 cyklu określono skuteczność łowną 10. etapem. Nie posiadamy żadnych wyników, ponieważ selekcja została przerywana. Kolejne cykle selekcyjne. Do 10 cyklu skwantyfikowano 37 etapem. Posiadamy one wspólne wartości, dlatego też w tabeli podano tylko RNA w ekspercie wartość. Dla nie było zadowolające, dlatego też skwantyfikowano się wykonać kolejne cykle selekcyjne. Po 13. cyklu określono skuteczność 20. etapem a po 15. cyklu - 80. etapem po 10, 13 i 15. cyklach uzyskano 143 sekwencje pochodzących z fragmentów RNA. Z uwagi na niską skuteczność łowną podano na rysunkach 18, 19, 20. Wykresy wartości efektywności RNA podane zostały w tabeli.

Rysunek 18. Wykresy wartości efektywności RNA podane zostały w tabeli.		Rysunek 19. Wykresy wartości efektywności RNA podane zostały w tabeli.		Rysunek 20. Wykresy wartości efektywności RNA podane zostały w tabeli.	
ATD 18	0,00	ATD 18	0,00	ATD 18	0,00
ATD 19	0,00	ATD 19	0,00	ATD 19	0,00
ATD 20	0,00	ATD 20	0,00	ATD 20	0,00
ATD 21	0,00	ATD 21	0,00	ATD 21	0,00
ATD 22	0,00	ATD 22	0,00	ATD 22	0,00
ATD 23	0,00	ATD 23	0,00	ATD 23	0,00
ATD 24	0,00	ATD 24	0,00	ATD 24	0,00
ATD 25	0,00	ATD 25	0,00	ATD 25	0,00
ATD 26	0,00	ATD 26	0,00	ATD 26	0,00
ATD 27	0,00	ATD 27	0,00	ATD 27	0,00
ATD 28	0,00	ATD 28	0,00	ATD 28	0,00
ATD 29	0,00	ATD 29	0,00	ATD 29	0,00
ATD 30	0,00	ATD 30	0,00	ATD 30	0,00
ATD 31	0,00	ATD 31	0,00	ATD 31	0,00
ATD 32	0,00	ATD 32	0,00	ATD 32	0,00
ATD 33	0,00	ATD 33	0,00	ATD 33	0,00
ATD 34	0,00	ATD 34	0,00	ATD 34	0,00
ATD 35	0,00	ATD 35	0,00	ATD 35	0,00
ATD 36	0,00	ATD 36	0,00	ATD 36	0,00
ATD 37	0,00	ATD 37	0,00	ATD 37	0,00
ATD 38	0,00	ATD 38	0,00	ATD 38	0,00
ATD 39	0,00	ATD 39	0,00	ATD 39	0,00
ATD 40	0,00	ATD 40	0,00	ATD 40	0,00
ATD 41	0,00	ATD 41	0,00	ATD 41	0,00
ATD 42	0,00	ATD 42	0,00	ATD 42	0,00
ATD 43	0,00	ATD 43	0,00	ATD 43	0,00
ATD 44	0,00	ATD 44	0,00	ATD 44	0,00
ATD 45	0,00	ATD 45	0,00	ATD 45	0,00
ATD 46	0,00	ATD 46	0,00	ATD 46	0,00
ATD 47	0,00	ATD 47	0,00	ATD 47	0,00
ATD 48	0,00	ATD 48	0,00	ATD 48	0,00
ATD 49	0,00	ATD 49	0,00	ATD 49	0,00
ATD 50	0,00	ATD 50	0,00	ATD 50	0,00
ATD 51	0,00	ATD 51	0,00	ATD 51	0,00
ATD 52	0,00	ATD 52	0,00	ATD 52	0,00
ATD 53	0,00	ATD 53	0,00	ATD 53	0,00
ATD 54	0,00	ATD 54	0,00	ATD 54	0,00
ATD 55	0,00	ATD 55	0,00	ATD 55	0,00
ATD 56	0,00	ATD 56	0,00	ATD 56	0,00
ATD 57	0,00	ATD 57	0,00	ATD 57	0,00
ATD 58	0,00	ATD 58	0,00	ATD 58	0,00
ATD 59	0,00	ATD 59	0,00	ATD 59	0,00
ATD 60	0,00	ATD 60	0,00	ATD 60	0,00
ATD 61	0,00	ATD 61	0,00	ATD 61	0,00
ATD 62	0,00	ATD 62	0,00	ATD 62	0,00
ATD 63	0,00	ATD 63	0,00	ATD 63	0,00
ATD 64	0,00	ATD 64	0,00	ATD 64	0,00
ATD 65	0,00	ATD 65	0,00	ATD 65	0,00
ATD 66	0,00	ATD 66	0,00	ATD 66	0,00
ATD 67	0,00	ATD 67	0,00	ATD 67	0,00
ATD 68	0,00	ATD 68	0,00	ATD 68	0,00
ATD 69	0,00	ATD 69	0,00	ATD 69	0,00
ATD 70	0,00	ATD 70	0,00	ATD 70	0,00
ATD 71	0,00	ATD 71	0,00	ATD 71	0,00
ATD 72	0,00	ATD 72	0,00	ATD 72	0,00
ATD 73	0,00	ATD 73	0,00	ATD 73	0,00
ATD 74	0,00	ATD 74	0,00	ATD 74	0,00
ATD 75	0,00	ATD 75	0,00	ATD 75	0,00
ATD 76	0,00	ATD 76	0,00	ATD 76	0,00
ATD 77	0,00	ATD 77	0,00	ATD 77	0,00
ATD 78	0,00	ATD 78	0,00	ATD 78	0,00
ATD 79	0,00	ATD 79	0,00	ATD 79	0,00
ATD 80	0,00	ATD 80	0,00	ATD 80	0,00
ATD 81	0,00	ATD 81	0,00	ATD 81	0,00
ATD 82	0,00	ATD 82	0,00	ATD 82	0,00
ATD 83	0,00	ATD 83	0,00	ATD 83	0,00
ATD 84	0,00	ATD 84	0,00	ATD 84	0,00
ATD 85	0,00	ATD 85	0,00	ATD 85	0,00
ATD 86	0,00	ATD 86	0,00	ATD 86	0,00
ATD 87	0,00	ATD 87	0,00	ATD 87	0,00
ATD 88	0,00	ATD 88	0,00	ATD 88	0,00
ATD 89	0,00	ATD 89	0,00	ATD 89	0,00
ATD 90	0,00	ATD 90	0,00	ATD 90	0,00
ATD 91	0,00	ATD 91	0,00	ATD 91	0,00
ATD 92	0,00	ATD 92	0,00	ATD 92	0,00
ATD 93	0,00	ATD 93	0,00	ATD 93	0,00
ATD 94	0,00	ATD 94	0,00	ATD 94	0,00
ATD 95	0,00	ATD 95	0,00	ATD 95	0,00
ATD 96	0,00	ATD 96	0,00	ATD 96	0,00
ATD 97	0,00	ATD 97	0,00	ATD 97	0,00
ATD 98	0,00	ATD 98	0,00	ATD 98	0,00
ATD 99	0,00	ATD 99	0,00	ATD 99	0,00
ATD 100	0,00	ATD 100	0,00	ATD 100	0,00


```

>ATD_15.1
GGCGAAUUGGACGUGCCCUC
>ATD_15.2
GCAGCCGACUGUACCCGUCC
>ATD_15.3
CCCGUUCUCGCGCCGUCC
>ATD_15.4
UACACCGCACGUGUACUCC
>ATD_15.5
GCUAUCACUGCUGUCC
>ATD_15.6
AUCGUCUCAUUCGGCUGC
>ATD_15.7
GGGGGCUAUCUCCACACUCC
>ATD_15.8
UCACUACACACUCCCGCCC
>ATD_15.9
UGUGUACGUCCCCCGGCC
>ATD_15.10
ACCACGUCCUGUCCCCGCC
>ATD_15.12
CCAGCACACUCCCGCCUCC
>ATD_15.13
GUGUGUAGUGUGCCGUUGCC
>ATD_15.14
CGGGCCUCCCCAUCCUGCC
>ATD_15.15
UGGGGUGACAUUCCUCC
>ATD_15.16
UAUGGACGUGUGCGUAUCC
>ATD_15.17
AGUCCAAUGUCAUCCGUCC
>ATD_15.18
UCGCACCGCGCUGUACCGC
>ATD_15.19
CUCCUCCGUCUCUACCGUCC
>ATD_15.20
UGCAAACAUAUCGCCGUGCC
>ATD_15.21
ACUGUGGUCCCGUACCCUCC
>ATD_15.22
CAUGCCAUCGUCGCGCCGCC
>ATD_15.23
CGUCC
>ATD_15.24
UCGGGACAUGUUGCCGCC
>ATD_15.25
CCAUGUCGUGUCCCGUCC
>ATD_15.26
ACAUUGAGUGUUGCCUCC
>ATD_15.27
UCCCAUAGUGUGCGCCGCC
>ATD_15.28
UGCCGACACCAUACCAGUCC
>ATD_15.29
UAGCGGUGUGCCCCGUGGCC
>ATD_15.30
GCAGUGAGUCGUUGUGCUGC
>ATD_15.31
GUCUCCCUGGCCCCUCC
>ATD_15.32
GCGUGAGUCGUGUCCGUGU
>ATD_15.33
UACCAGUACCCCGUUAACC
>ATD_15.34
UUACACAUGUUGCCGUGCC
>ATD_15.35
CCAACGCUUGGUGCCUGUCC
>ATD_15.36
GACACGUUGAUACCGCGCC
>ATD_15.37
CCAAUGUCCCUAUCGGUCC
>ATD_15.38
UGUACACAUCGCCCGGCC
>ATD_15.39
CCACCGUCAUCCAUUGCUGC
>ATD_15.40
GACAUGGACUGUGUUGGCC
>ATD_15.41
CAUUACUGCACACCCUGCC
>ATD_15.42
ACCACAGUCUUCGGUGGCC
>ATD_15.43
CCAUCACACUCAACCGGCC
>ATD_15.44
GUCCACACGCUUACCUCC
>ATD_15.45
UGGUCACAUCCCAACCGGCC
>ATD_15.46
GUCAAUCAUCCUUGC
>ATD_15.47
UUGCAGCUAACACAUGGCC
>ATD_15.48
CAAUCACACCUACGCGUUG
>ATD_15.49
CGUGAUGUCUAUCCCGGCC
>ATD_15.50
UCCCAUACGCCACUUGCC
>ATD_15.51
UAGCCCGAUGUGUCC
>ATD_15.52
GCAGUGAGUCGUUGUGCUGC
>ATD_15.53
ACCAUUGCCGUGCCUCCUCC
>ATD_15.54
UACGAUCUUCGCCACGUGCC
>ATD_15.55
CCAUUGACACACCUUGUCC
>ATD_15.56
AUGCGGUGUACUUCUGGCC
>ATD_15.57
GUGUGCCGACUCCGUGUCC
>ATD_15.58
AAUCGUGUUCUGUCCUGC
>ATD_15.59
CCCAACCGCACUGGCCGCC
>ATD_15.60
CCAAUGCACACUUCGGCUGCC
>ATD_15.61
CUUGGCAUUCACACGUGCC
>ATD_15.62
CAUGACCGUACUGCGCCCC
>ATD_15.63
CUAUAGUGUGUGCGGUGCGCC
>ATD_15.64
UGGCAGUGAGUGUGUGGCC
>ATD_15.65
AGGCCACCUCUCCCCCGCC
>ATD_15.66
ACCACGUAUCACCCCGUCC
>ATD_15.67
UCCAUGUGUGACUGUGCC
>ATD_15.68
ACAUUGAGUGUUGCCUCC
>ATD_15.69
CCCAUGGACACUCCCGGCC
>ATD_15.70
AUCGUCUCAUUCGGCUGC
>ATD_15.71
GGGGGCUAUCUCCACACUCC
>ATD_15.72
ACAGAUUCGCCCCUAGUCC
>ATD_15.73
UCACUACACACUCCCGGCC
>ATD_15.74
GGCGAAUUGGACGUGCCCUC
>ATD_15.75
GGGGGUGAGUGUGUGUCC
>ATD_15.76
ACGUGUGGAGUGUGGCC
>ATD_15.77
CAUCGUGUGCUCUCCUGCC
>ATD_15.78
CCUAUCACGUGCACCC
>ATD_15.79
ACAUUGAGUGUUGCCUCC
>ATD_15.80
UGCCGACACCAUACCAGUCC
>ATD_15.81
CGUGAGUGUGUACCGUCC
>ATD_15.82
ACCAUAUACCGCGCCUCC
>ATD_15.83
UGUAGUGGGUGUGCGUGUG
>ATD_15.84
CAGCUCUCCUUCGUGCCGUCC
>ATD_15.85
UCCCAUAGUGUGCGCCGCC
>ATD_15.86
ACUGCCAUCGUGUGUGUCC
>ATD_15.87
CGGAUGAGUGUGUGU

```

Rysunek 30. Sekwencje losowe uzyskane po 15 cyklu selekcji wobec Dicer.

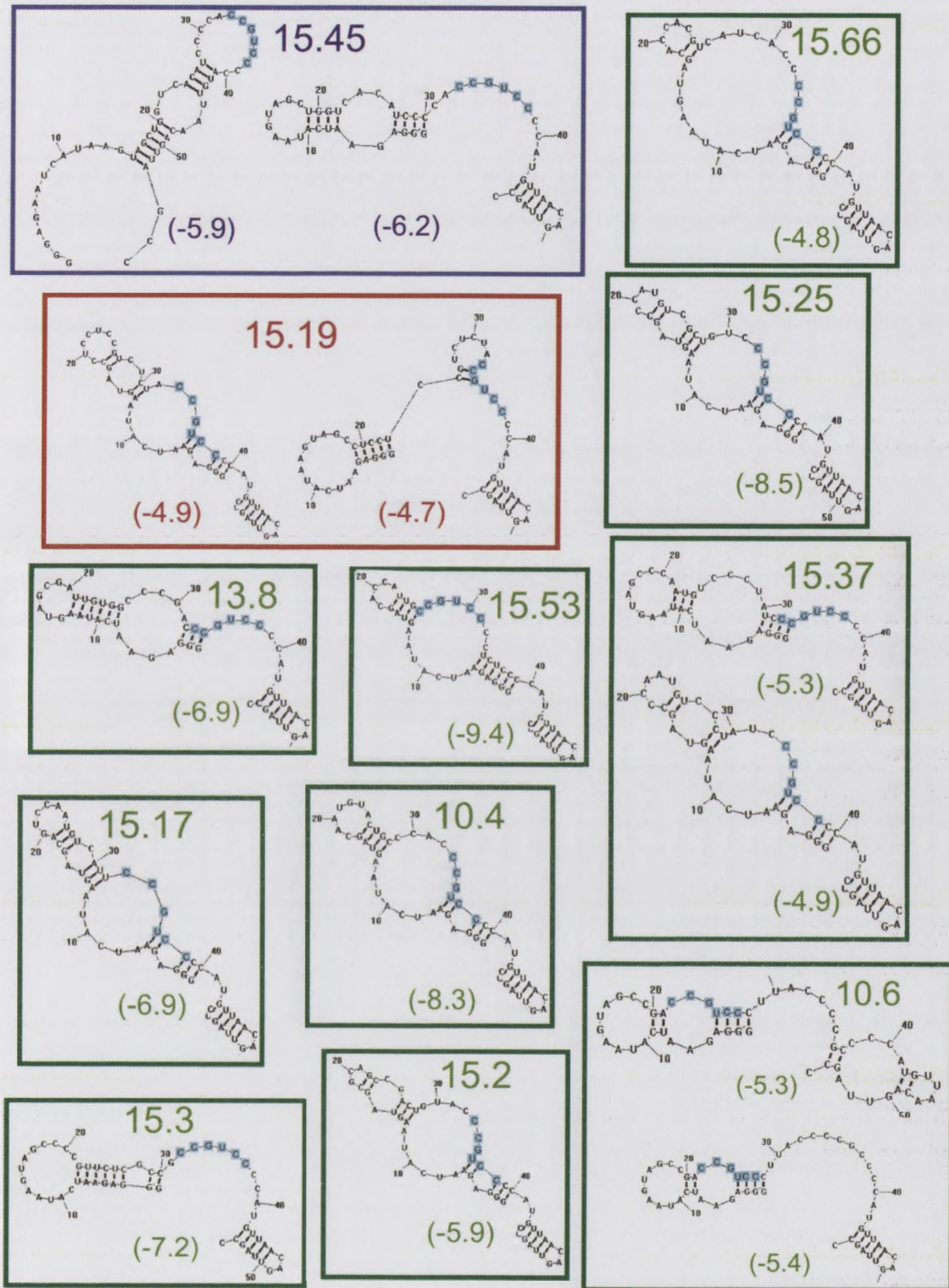
5.2.3 Analiza sekwencji wyselekcjonowanych cząsteczek RNA

Aptamery uzyskane drogą selekcji *in vitro* zbudowane były w przeważającej części z 56. nukleotydów (18. nukleotydowe sekwencje flankujące F5' i F3' oraz 20. nukleotydowa sekwencja losowa). Jednakże podczas procesu selekcji sekwencja losowa niektórych aptamerów została wydłużona (4 cząsteczki) lub skrócona o kilka nukleotydów (29 cząsteczek). W skrajnym przypadku, dla aptamerów oznaczonych jako ATD13.13-13.20

obserwowano czternastonukleotydową delecję. Długość sekwencji losowej wynosiła zatem 6 nukleotydów. W wariantach ATD13.14-13.16, ATD13.18-13.20 była to sekwencja 5'CUCCCC3', a w wariantach ATD13.13 i ATD13.17 - sekwencja 5'CUGCCC3'. Różniły się one zatem tylko jednym nukleotydem. Najdłuższą insercją zaobserwowano dla cząsteczki ATD15.13 posiadającej 22. nukleotydową sekwencję losową.

Analizę otrzymanych aptamerów rozpoczęto od wyszukania wspólnych motywów sekwencyjnych. Wykorzystano w tym celu program MEME, a także BioEdit. Zidentyfikowano osiem motywów pięcionukleotydowych ([1] 5'ACACA3', [2] 5'AGUCC, [3] 5'CCAAU3', [4] 5'GCCGC3', [5] 5'GUCGU3', [6] 5'GUGCC3', [7] 5'GUGUG3', [8] 5'UGCCG3'), pięć motywów sześcienukleotydowych ([9] 5'ACACCC3', [10] 5'ACACUC3', [11] 5'CCGUCC3', [12] 5'GCACAC3', [13] 5'GCCGCC3'), cztery motywy siedmionukleotydowe ([14] 5'CCCCGCC3', [15] 5'CCCUGCC3', [16] 5'CCCUUCC3', [17] 5'GUGCUGC3'), jeden ośmionukleotydowy ([18] 5'ACCCGUCC3'), jeden dwunastonukleotydowy ([19] 5'CACUCCCCGCC3'). Motywy oznaczone numerami 7 i 11 występowały 13 razy w sekwencjach losowych wszystkich wyselekcjonowanych aptamerów, motyw 5 – 12 razy, motyw 8 – 11 razy, motyw 6 – 10 razy, motywy 1, 2, 14 – 9 razy, motyw 4 – 8 razy, motyw 13 – 7 razy, motywy 9 i 10 – 6 razy, motywy 3, 16 i 17 – 5 razy, motyw 12 – 4 razy, motyw 15 – 3 razy, a motywy 18 i 19 – 2 razy. Szczegółowe dane na temat występowania poszczególnych motywów w aptamerach umieszczono w Aneksie 1.

W kolejnym etapie, wykorzystując program RNAstructure [157], określono struktury drugorzędowe wyselekcjonowanych RNA. Dla 91. cząsteczek program ten generował jedną strukturę, dla 36. dwie, dla 13. trzy, dla 2. cztery, a dla 1. pięć. Analiza porównawcza pozwoliła podzielić uzyskane struktury na trzy rodziny: R1 – struktury, w obrębie których występowała jedna szpilka, R2 - struktury z dwiema szpilkami i R3 – struktury z trzema szpilkami. Następnie określono położenie zidentyfikowanych wcześniej motywów sekwencyjnych w obrębie uzyskanych struktur drugorzędowych. Uzyskane wyniki przedstawiono na przykładzie motywu 5'CCGUCC3'.



Rysunek 31. Struktury drugorzędowe aptamerów z zaznaczonym na niebiesko motywem CCGUCC.
 W zielonych ramkach umieszczono cząsteczki należące do rodziny R2, w czerwonej cząsteczki należącą do rodziny R2/R3. We fioletowej ramce umieszczono cząsteczkę należącą do rodziny R1/R2. W nawiasach przedstawiono wartości energii swobodnej obliczonej dla każdej cząsteczki.



Рисунок 31. Структурные диаграммы олигонуклеотидов и комплексов их с ДНК. В некоторых случаях олигонуклеотиды взаимодействуют с ДНК в виде двойной цепи. В некоторых случаях олигонуклеотиды взаимодействуют с ДНК в виде тройной цепи.

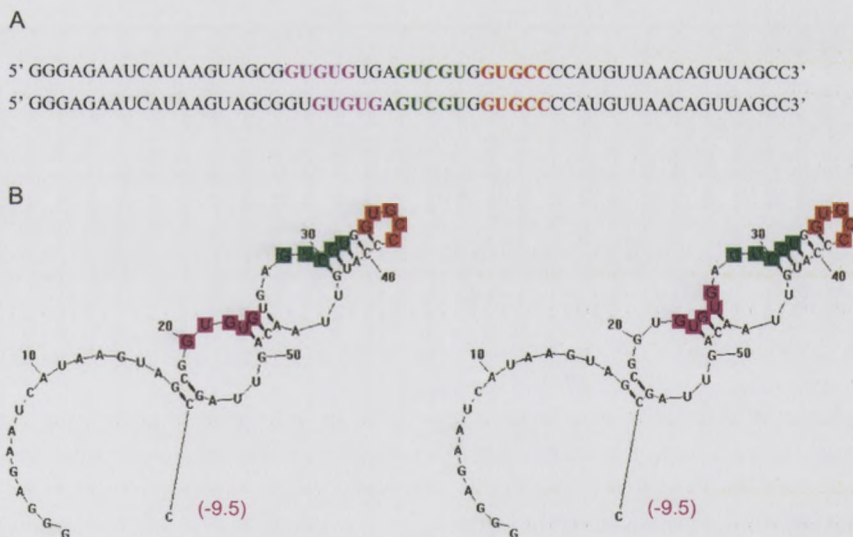
5.2.4 Charakterystyka wybranych aptamerów

Przy wyborze aptamerów do dalszych badań posłużono się następującymi kryteriami:

- ilość zidentyfikowanych motywów sekwencyjnych występujących w danej cząsteczce,
- umiejscowienie motywów sekwencyjnych,
- struktura drugorzędowa generowana przez program RNAstructure,
- częstość występowania danej cząsteczki w puli wyselekcjonowanych RNA.

Biorąc pod uwagę powyższe kryteria, do dalszych szczegółowych badań wybrano 4 aptamery – ATD13.6, ATD15.14, ATD15.26, ATD15.52.

Aptamer ATD13.6 występuje tylko raz w uzyskanej puli cząsteczek, posiada trzy konserwatywne motywy (zaznaczone na różowo, zielono i pomarańczowo). Motyw 5'GUGUG3' występuje 13 razy w puli wyselekcjonowanych aptamerów, 5'GUCGU3' – 12 razy, a 5'GUGCC3' – 10 razy. Poniżej zamieszczono strukturę pierwszorzędowną i przewidzianą przez program RNAstructure strukturę drugorzędową ATD13.6.



Rysunek 32. Struktura pierwszorzędowna (A) i drugorzędowa (B) aptameru ATD13.6.

Struktura drugorzędowa wygenerowana została w programie RNAstructure, kolorami oznaczono konserwatywne motywy sekwencyjne. Cząsteczki A i B różnią się położeniem motywu GUGUG (zaznaczonego na różowo). W nawiasie podano wartość energii swobodnej obliczonej w programie RNAstructure.

Aptamer ATD15.14 występuje raz w puli 143. wyselekcjonowanych cząsteczek, zawiera jeden konserwatywny motyw (zaznaczony na fioletowo 5'CCUGCC3'), który występuje 3 razy w puli sekwencji losowych wszystkich wyselekcjonowanych aptamerów.

3.2.4 Charakterystyka wybranych aptamerów

Przy wyborze aptamerów do dalszych badań postawiono się następującymi kryteriami:

- ilość zidentyfikowanych motywów sekencyjnych występujących w danej cząsteczce,
- umiejscowienie motywów sekencyjnych,
- struktura drugorzędowa generowana przez program RNAstructure,
- czystość wyizolowania danej cząsteczki w pułi wyselkjonowanych RNA.

Biorąc pod uwagę powyższe kryteria, do dalszych szczegółowych badań wybrano 4 aptamery - ATD12.6, ATD12.14, ATD12.28, ATD12.52.

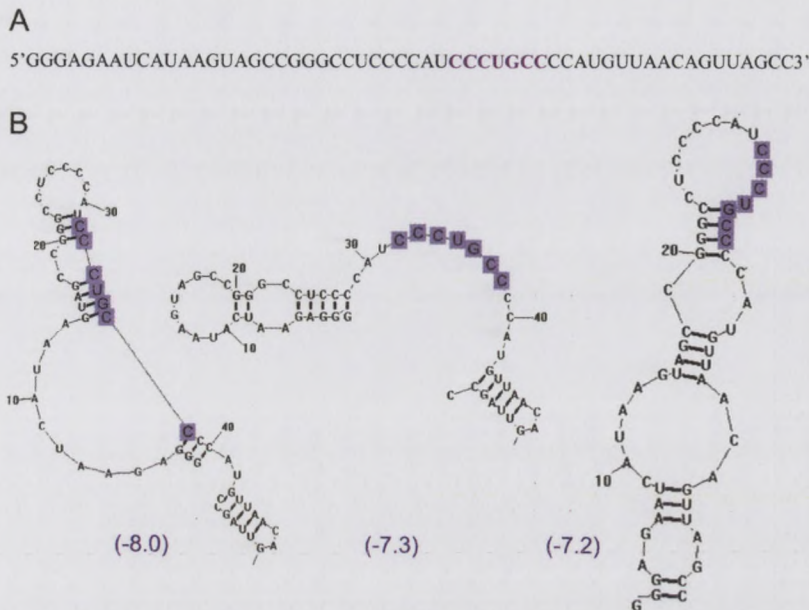
Aptamer ATD12.6 występuje tylko raz w uzyskanej pułi cząsteczek, posiada trzy konserwatywne motywy (zsumowane na rdzowo, zielono i pomarańczowo). Motyw 2'GUUGUCC' występuje 13 razy, w pułi wyselkjonowanych aptamerów, 3'UCUUGU - 12 razy, a 2'GUUGCC' - 10 razy. Położenie sumarycznego struktury pierwszorzędowej i przedstawienie przez program RNAstructure struktury drugorzędowej ATD12.6.



Rysunek 32. Struktura pierwszorzędowa (A) i drugorzędowa (B) aptameru ATD12.6. Struktura drugorzędowa wygenerowana została w programie RNAstructure. Kolorem pomarańczowym oznaczono konserwatywne motywy 2'GUUGUCC' (A i B) oraz 3'UCUUGU (zsumowane na rdzowo). W kolorze zielonym i czerwonym oznaczono pozostałe motywy. W skali podano liczbę nukleotydów występujących w programie RNAstructure.

Aptamer ATD12.14 występuje raz w pułi 143 wyselkjonowanych cząsteczek, zawiera jeden konserwatywny motyw (zsumowany na rdzowo 2'CCUUGCC') który występuje 3 razy w pułi sekencyj losowych wyselkjonowanych aptamerów.

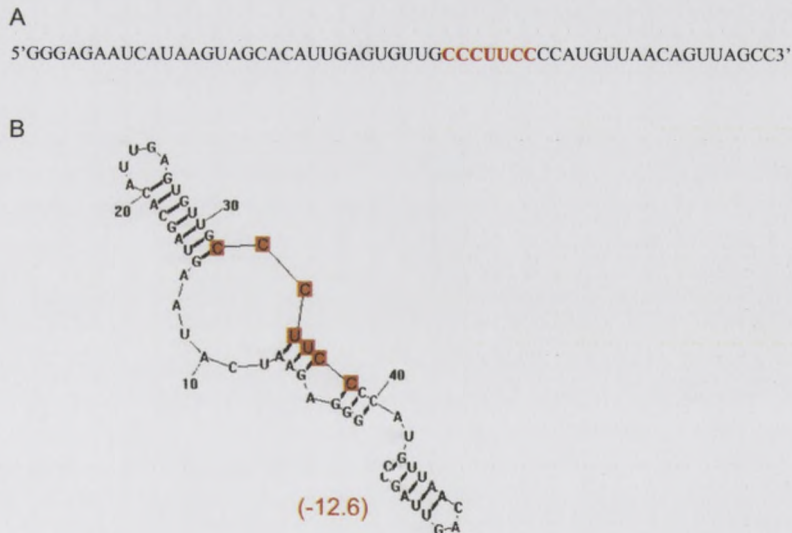
Poniżej zamieszczono strukturę pierwszorzędową i wygenerowaną w programie RNAstructure strukturę drugorzędową ATD15.14.



Rysunek 33. Struktura pierwszorzędowa (A) i drugorzędowa (B) aptameru ATD15.14.

Struktura drugorzędowa wygenerowana została w programie RNAstructure, kolorami oznaczono konserwatywne motywy sekwencyjne. W nawiasie podano wartość energii swobodnej obliczonej w programie RNAstructure.

Cząsteczka ATD15.26 występuje trzykrotnie w puli wyselekcjonowanych aptamerów (także ATD15.68 i ATD15.79), posiada jeden konserwatywny motyw 5'CCCUUCC3' (występujący pięciokrotnie w obrębie sekwencji losowych uzyskanych aptamerów). Poniżej zamieszczono struktury pierwszorzędową i drugorzędową aptameru ATD15.26 (przewidzianą w programie RNAstructure).

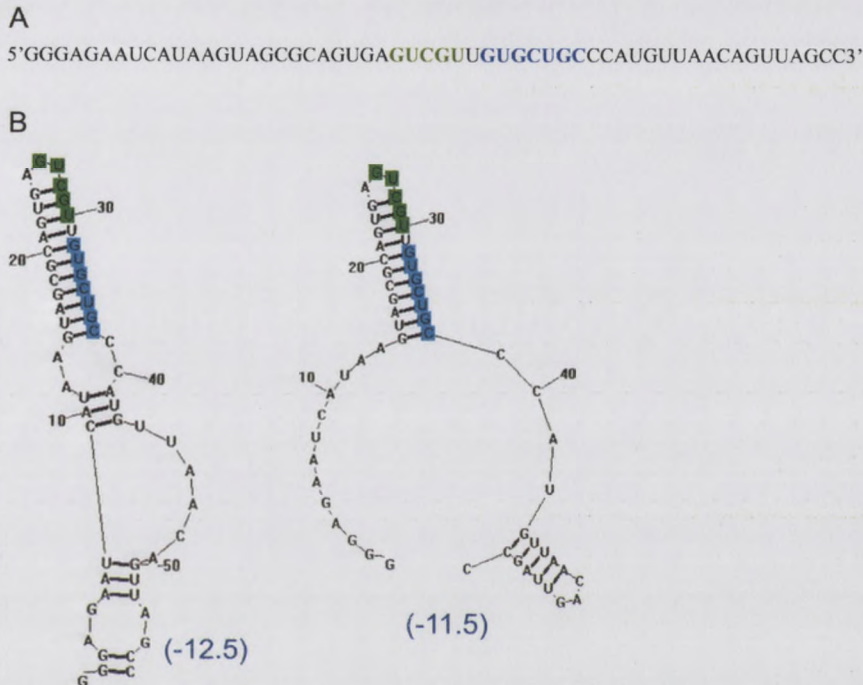


Rysunek 34. Struktura pierwszorzędowa (A) i drugorzędowa (B) aptameru ATD15.26.

Struktura drugorzędowa wygenerowana została w programie RNAstructure, kolorami oznaczono konserwatywne motywy sekwencyjne. W nawiasie podano wartość energii swobodnej obliczonej w programie RNAstructure.

Main body of the document containing several paragraphs of extremely faint text. The text is illegible due to low contrast and blurring.

Aptamer ATD15.52 występuje dwukrotnie w puli wszystkich cząsteczek (także ATD 15.30), posiada dwa konserwatywne motywy sekwencyjne (zaznaczone na zielono i niebiesko). Motyw 5'GUCGU3' występuje 12 razy w puli wyselekcjonowanych aptamerów, a 5'GUGCUGC3' – 5 razy. Poniżej zamieszczono strukturę pierwszorzędową i przewidzianą przez program RNAstructure strukturę drugorzędową ATD15.52.



Rysunek 35. Struktura pierwszorzędowa (A) i drugorzędowa (B) aptameru ATD15.52.

Struktura drugorzędowa wygenerowana została w programie RNAstructure, kolorami oznaczono konserwatywne motywy sekwencyjne. W nawiasie podano wartość energii swobodnej obliczonej w programie RNAstructure.

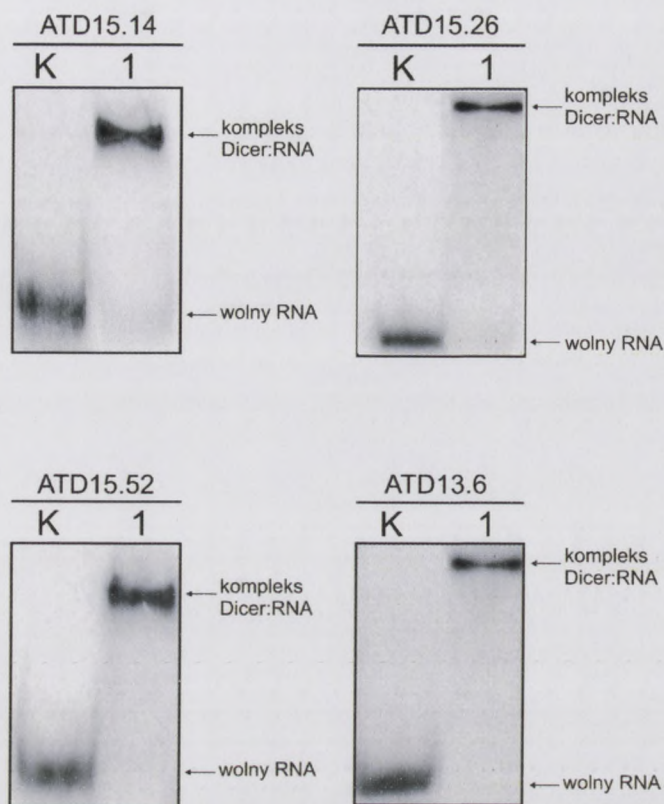
5.2.4.1 Aptamery jako substraty rybonukleazy Dicer

Wyselekcjonowane aptamery są podobnej długości jak naturalne substraty Dicer (ok. 60 nt), sprawdzano więc czy 4 wybrane aptamery wiążą się z rybonukleazą (opis procedury rozdział 4.2.24). Dicer na wstępie preinkubowano w buforze (patrz rozdział 4.1.8) w temperaturze pokojowej, a następnie 20 minut w 4°C w celu obniżenia jej aktywności nukleazowej. Następnie Dicer oraz znakowane radioizotopowo aptamery inkubowano w buforze w 4°C, po czym mieszaninę rozdzielano w 8% żelu polakrylamidowym w warunkach natywnych. Jako kontrolę stosowano analogiczną próbkę nie zawierającą białka. Produkty reakcji po rozdzielaniu elektroforetycznym analizowano wykorzystując skaner materiałów znakowanych radioizotopowo (Phosphorimager, Typhoon 8600).

Abstract of the 1997 Annual Meeting of the American Psychological Association, Washington, DC, September 1-5, 1997. The abstracts are arranged in alphabetical order by author. The abstracts are published in the *Journal of Applied Behavior Analysis*, 30(1), 1-100. The abstracts are published in the *Journal of Applied Behavior Analysis*, 30(1), 1-100.

The abstracts are published in the *Journal of Applied Behavior Analysis*, 30(1), 1-100. The abstracts are published in the *Journal of Applied Behavior Analysis*, 30(1), 1-100. The abstracts are published in the *Journal of Applied Behavior Analysis*, 30(1), 1-100.

The abstracts are published in the *Journal of Applied Behavior Analysis*, 30(1), 1-100. The abstracts are published in the *Journal of Applied Behavior Analysis*, 30(1), 1-100. The abstracts are published in the *Journal of Applied Behavior Analysis*, 30(1), 1-100.



Rysunek 36. Kompleksy tworzone przez aptamery i Dicer.

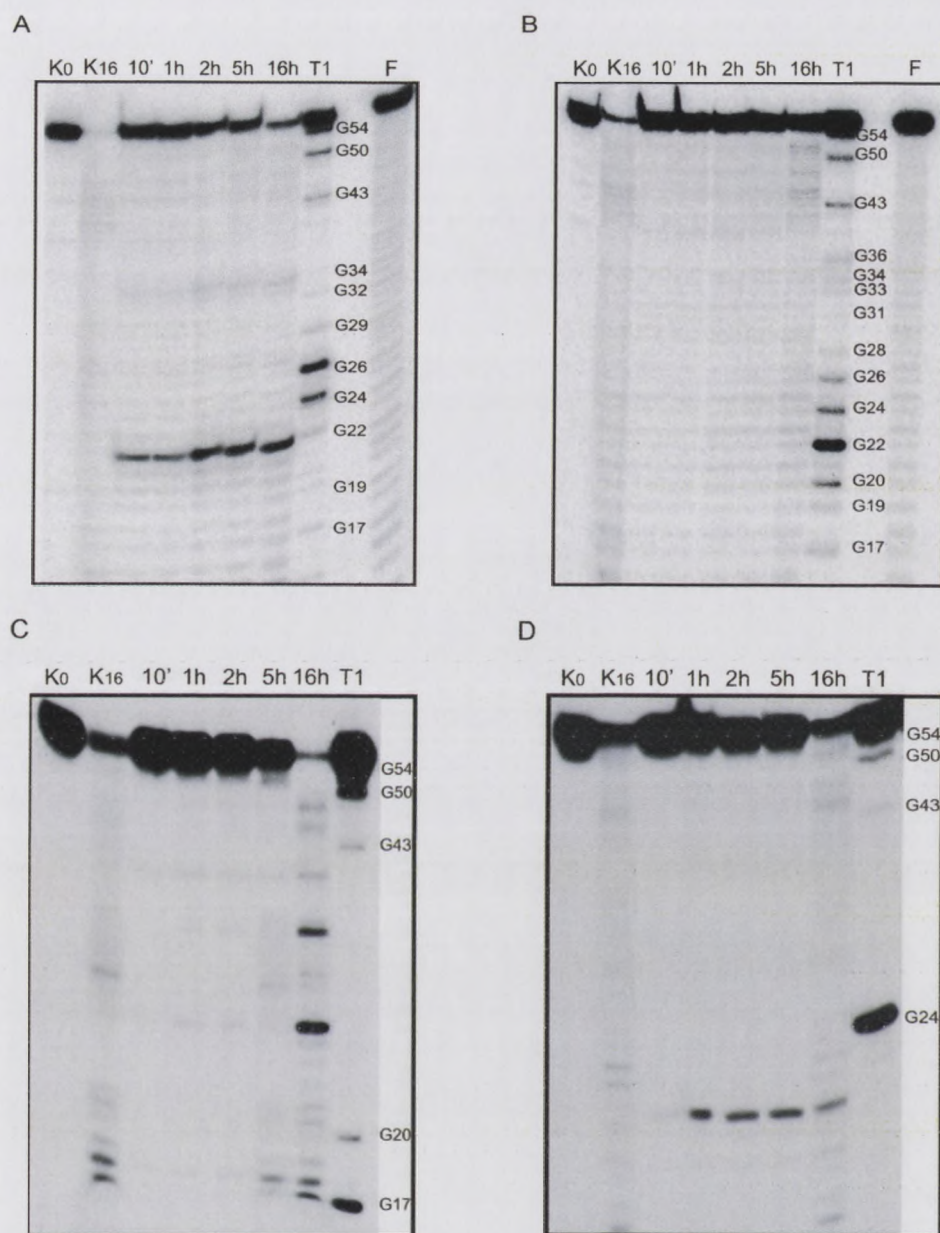
Próbki oznaczone numerem 1 zawierały białko i RNA, jako kontrolę stosowano mieszaniny, do których podawano jedynie wyznakowany RNA (K).

Zaobserwowano, że wszystkie testowane aptamery tworzyły kompleks z rybonukleazą Dicer (Rysunek 36). Niezwiązane RNA migrowały znacznie szybciej niż te związane z białkiem.

W kolejnym etapie sprawdzono czy testowane aptamery mogą być substratami dla Dicer (rozdział 4.2.29). W tym celu wyznakowano je radioizotopowo na końcu 5' i inkubowano z enzymem przez 10 minut, 1h, 2h, 5h i 16h.

Stwierdzono, że ATD15.52 i ATD15.26 były wydajnie cięte przez Dicer. W przypadku ATD15.52 enzym hydrolizował wiązanie internukleotydowe między G22 i A21 oraz G34 a U33, a w ATD15.26 pomiędzy A21 a C20. Obecność produktów trawienia obserwowano już po dziesięciominutowej inkubacji z enzymem (Rysunek 37A). W przypadku aptameru ATD15.14 dopiero po 16h inkubacji z enzymem zaobserwowano na żelu dwa produkty hydrolizy. Równocześnie stwierdzono, że ATD13.6 nie był substratem dla rybonukleazy, zaobserwowano jedynie niespecyficzną degradację RNA (Rysunek 37B).

Faint, illegible text covering the page, possibly bleed-through from the reverse side. The text is too light to transcribe accurately.

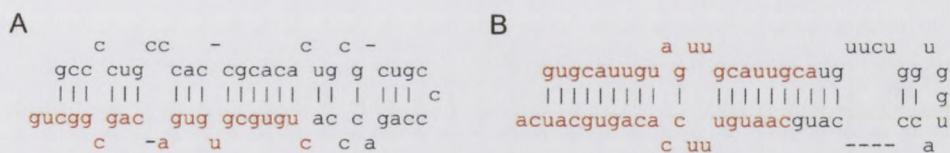


Rysunek 37. Trawienie aptamerów ATD15.52 (A), ATD13.6 (B), ATD15.14 (C) i ATD15.26 (D) rybonukleazą Dicer.

Jako 10', 1h, 2h, 5h i 16h oznaczono ścieżki, dla których mieszaniny reakcyjne inkubowano odpowiednio 10', 1h, 2h, 5h i 16h. T1 – RNA cięte przez rybonukleazę T1, F – hydroliza formamidowa. K0 – reakcja kontrolna bez enzymu, K16 – kontrola, w której RNA inkubowano w buforze reakcyjnym przez 16h.

5.2.4.2 Badanie wpływu aptamerów na aktywność ludzkiej rybonukleazy Dicer

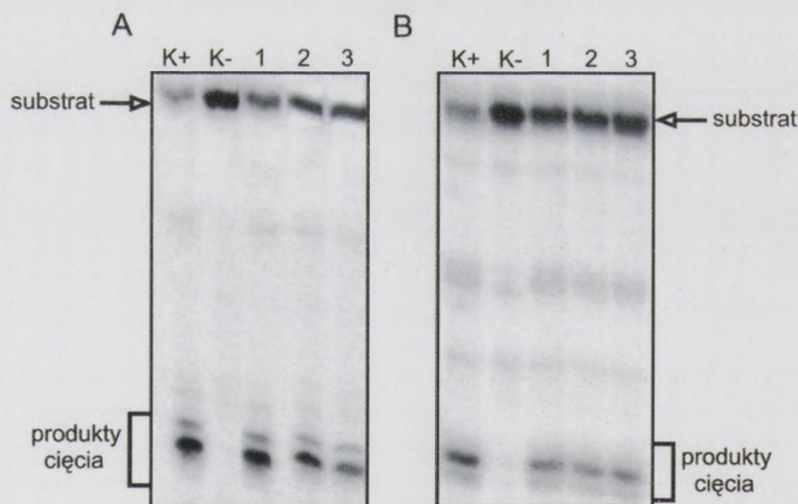
Wpływ aptamerów na aktywność Dicer badano wykorzystując znakowane radioizotopowo na końcu 5' ludzkie prekursor mikroRNA – hsa-miR-33a i hsa-miR-210 (rozdział 4.1.1, 4.2.32) (<http://microrna.sanger.ac.uk>). Sposób ich trawienia przez Dicer został wcześniej szczegółowo zbadany przez Króla i wsp. (dane uzyskane bezpośrednio od autorów).



Rysunek 38. Struktura drugorzędowa hsa-miR-33a (A) i hsa-miR-210 (B).

Na wstępie inkubowano aptamery z enzymem. W poszczególnych próbkach stosunek molowy aptamer:Dicer wynosił: 1:1, 10:1 i 100:1. Następnie dodawano wyznakowany radioizotopowo pre-miRNA i inkubowano całość 10 minut w 37°C. Równolegle przeprowadzano dwie reakcje kontrolne. W jednej z nich (kontrola dodatnia, K+) do mieszaniny reakcyjnej nie dodawano aptameru, a do drugiej (kontrola ujemna, K-) nie dodawano enzymu. Produkty reakcji rozdzielano w 15% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (rozdział 4.2.18), a następnie analizowano z pomocą skanera materiałów znakowanych radioizotopowo (Phosphorimager, Typhoon 8600). Stosując program Image Quant ustalono stopień przereagowania substratu. Dla każdego aptameru całe doświadczenie powtarzano trzykrotnie.

Aptamer ATD15.14



Rysunek 39. Wpływ ATD15.14 na zdolność Dicer do cięcia hsa-miR33a (A) i hsa-miR210 (B).

W reakcjach oznaczonych numerem 1 stosunek molowy aptamer:Dicer wynosił 1:1, numerem 2 – 10:1, numerem 3 – 100:1. Przeprowadzono dwie reakcje kontrolne- K+ (bez aptameru) i K- (bez enzymu).

Stwierdzono, że obecne na autoradiogramie prążki odpowiadają substratowi i produktom jego cięcia (Rysunek 39). Zaobserwowano, że wraz ze wzrostem stężenia aptamerów malała ilość produktów trawienia. Efekt ten był bardziej widoczny, gdy substratem

Książka jest przeznaczona dla uczniów i nauczycieli, którzy chcą poznać historię i kulturę naszego kraju. Zawiera ciekawe informacje o tradycjach i zwyczajach, które przetrwały mimo trudnych warunków historycznych.

W książce znajdują się również ilustracje, które pomagają w zrozumieniu opisywanych zjawisk. Dzięki temu czytelnik może łatwiej wyobrazić sobie przeszłość i doświadczyć jej klimat.

Jest to doskonała lektura dla każdego, kto interesuje się historią i kulturą. Książka jest napisana przystępnym językiem, który umożliwia zrozumienie trudnych zagadnień.

Bibliografia

- 1. Janowski, J. (1998). *Historia i kultura polska*. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN.
- 2. Kowalski, A. (2005). *Tradycje i zwyczaje polskie*. Kraków: Wydawnictwo Literackie.
- 3. Nowak, M. (2010). *Historia kultury polskiej*. Łódź: Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego.
- 4. Piątkowski, S. (2002). *Wzrost państwa polskiego*. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN.
- 5. Szymański, P. (2007). *Historia sztuki polskiej*. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN.

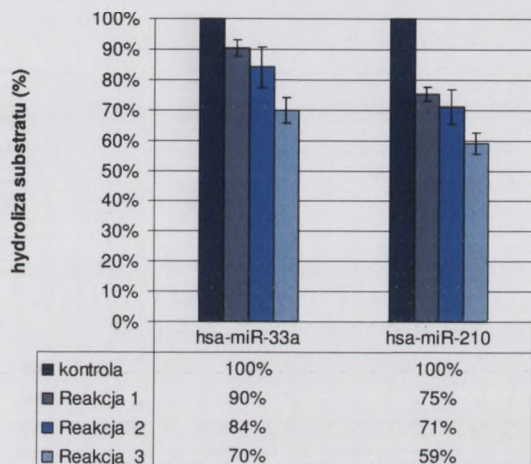
Książka jest przeznaczona dla uczniów i nauczycieli, którzy chcą poznać historię i kulturę naszego kraju. Zawiera ciekawe informacje o tradycjach i zwyczajach, które przetrwały mimo trudnych warunków historycznych.

W książce znajdują się również ilustracje, które pomagają w zrozumieniu opisywanych zjawisk. Dzięki temu czytelnik może łatwiej wyobrazić sobie przeszłość i doświadczyć jej klimat.

Jest to doskonała lektura dla każdego, kto interesuje się historią i kulturą. Książka jest napisana przystępnym językiem, który umożliwia zrozumienie trudnych zagadnień.

w reakcji był hsa-miR-210. Przy stosunku molowym aptamer:enzym - 1:1, ATD15.14 inhibował cięcie substratu o 25%, a przy stukrotnym molowym nadmiarze aptameru o 41%.

W przypadku substratu hsa-miR-33a efekt inhibitorowy był mniej widoczny. Przy stosunkach molowych 1:1, 10:1 i 100:1, ATD15.14 obniżał efektywność trawienia substratu odpowiednio o około 10%, 15% i 30% (Wykres 8).

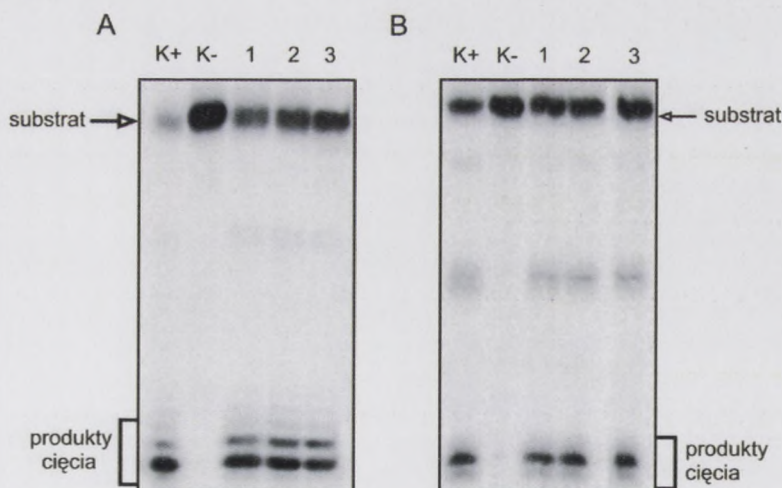


Wykres 8. Wpływ ATD15.14 na zdolność Dicer do trawienia hsa-miR33a oraz hsa-miR210.

W reakcji oznaczonej numerem 1 stosunek molowy aptamer:Dicer wynosił 1:1, numerem 2 - 10:1, numerem 3 - 100:1. Wyniki są średnimi z trzech przeprowadzonych eksperymentów.

Podsumowując, aptamer ATD15.14 jedynie w niewielkim stopniu wpływał na aktywność Dicer. Wyraźnie słabiej hamował proces powstawania miRNA 33a niż miRNA 210.

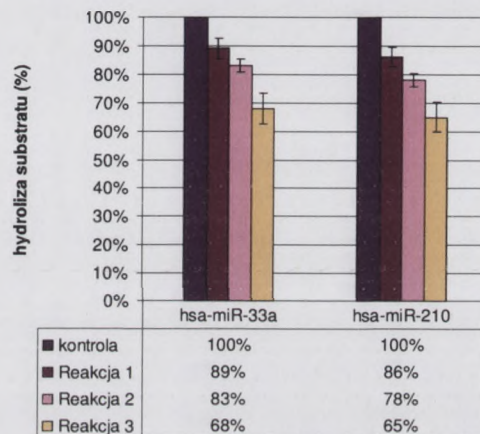
Aptamer ATD15.26



Rysunek 40. Wpływ ATD15.26 na zdolność Dicer do trawienia hsa-miR33a (A) oraz hsa-miR210 (B).

W reakcjach oznaczonych numerem 1 stosunek molowy aptamer:Dicer wynosił 1:1, numerem 2 - 10:1, numerem 3 - 100:1. Przeprowadzono dwie reakcje kontrolne- K+ (bez aptameru) i K- (bez enzymu).

Zaobserwowano, że wzrostowi stężenia aptameru towarzyszyło zmniejszenie ilości produktów trawienia (Rysunek 40). Efekt ten był porównywalny dla obu substratów. Trawienie hsa-miR-33a przy stosunku molowym aptamer:enzym 1:1 było obniżone o 11%. Poziom inhibicji wzrastał wraz ze wzrostem ilości aptameru, osiągając 32% przy stukrotnym molowym nadmiarze ATD15.26. W przypadku matrycy hsa-miR-210 efekt inhibitorowy był zbliżony. Przy stosunkach molowych ATD15.26:Dicer 1:1, 10:1 i 100:1, aktywność enzymu obniżała się o około 14%, 22% i 35%, odpowiednio (Wykres 9).

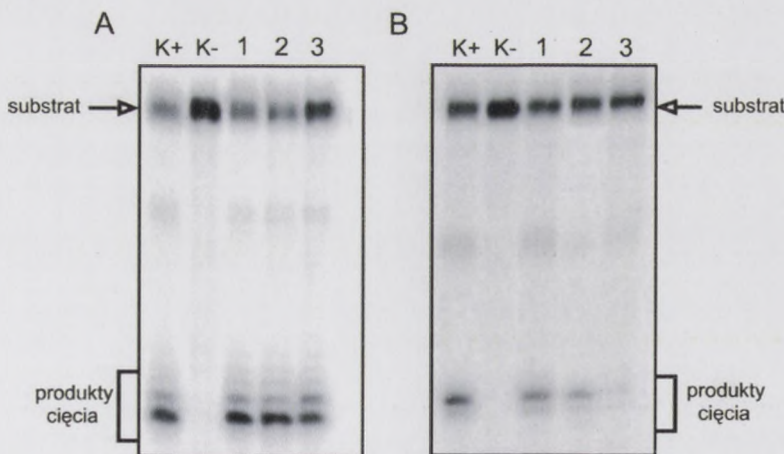


Wykres 9. Wpływ ATD15.26 na zdolność Dicer do cięcia jest hsa-miR33a i hsa-miR210.

W reakcji oznaczonej numerem 1 stosunek molowy aptamer:Dicer wynosił 1:1, numerem 2 –10:1, numerem 3 –100:1. Wyniki są średnimi z trzech przeprowadzonych eksperymentów.

Podsumowując, aptamer ATD15.26 w niewielkim stopniu hamował powstawanie produktów trawienia. Efekt inhibitorowy był zbliżony dla obu substratów.

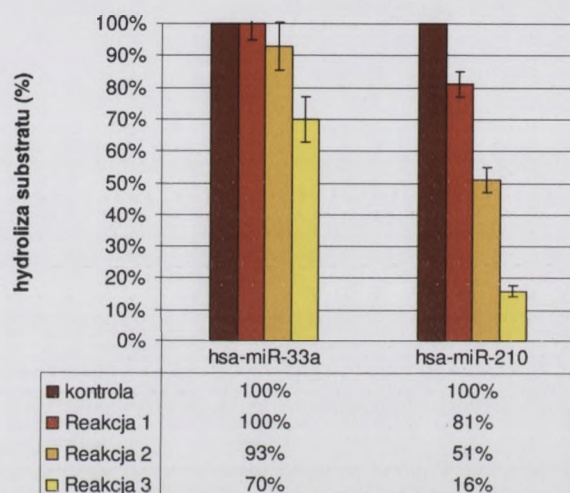
Aptamer ATD15.52



Rysunek 41. Wpływ ATD15.52 na zdolność Dicer do cięcia hsa-miR33a (A) i hsa-miR210 (B).

W reakcjach oznaczonych numerem 1 stosunek molowy aptamer:enzym wynosił 1:1, numerem 2 – 10:1, numerem 3 –100:1. Przeprowadzono dwie reakcje kontrolne- K+ (bez aptameru) i K- (bez enzymu).

Dla obu substratów zaobserwowano, że ilość produktów trawienia malała wraz ze wzrostem stężenia aptameru (Rysunek 41). Efekt ten był bardzo wyraźny dla substratu hsa-miR-210, gdzie już przy stosunku molowym aptamer:enzym 1:1, zaobserwowano obniżenie wydajności cięcia o 19%. Przy dziesięciokrotnym molowym nadmiarze aptameru zaobserwowano około 50% inhibicję, a dla stukrotnego nadmiaru - 84%. Dla substratu pre-miR-33a efekt inhibitorowy był znacznie niższy (30% inhibicji dla stukrotnego nadmiaru ATD15.52) (Wykres 10).



Wykres 10. Wpływ ATD15.52 na zdolność Dicer do trawienia hsa-miR-33a i hsa-miR-210.

W reakcji oznaczonej numerem 1 stosunek molowy aptamer:Dicer wynosił 1:1, numerem 2 –10:1, numerem 3 –100:1. Wyniki są średnimi z trzech przeprowadzonych eksperymentów.

Podsumowując, wykazano, że ATD15.52 hamował aktywność Dicer, gdy substratem był hsa-miR-210. Tymczasem hsa-miR-33a był wydajnie cięty nawet przy stukrotnym molowym nadmiarze aptameru. Poziomą inhibicję Dicer wobec tego substratu był zbliżony do poziomu obserwowanego dla ATD15.14 i ATD15.26.

with an emphasis on the use of visual aids and the use of a structured format. The format includes a title page, an abstract, an introduction, a description of the intervention, a description of the results, and a conclusion. The format is designed to be used by students in a graduate-level course in behavior analysis. The format is also designed to be used by students in a graduate-level course in applied behavior analysis. The format is also designed to be used by students in a graduate-level course in behavior analysis.

The format is designed to be used by students in a graduate-level course in behavior analysis. The format is also designed to be used by students in a graduate-level course in applied behavior analysis. The format is also designed to be used by students in a graduate-level course in behavior analysis.

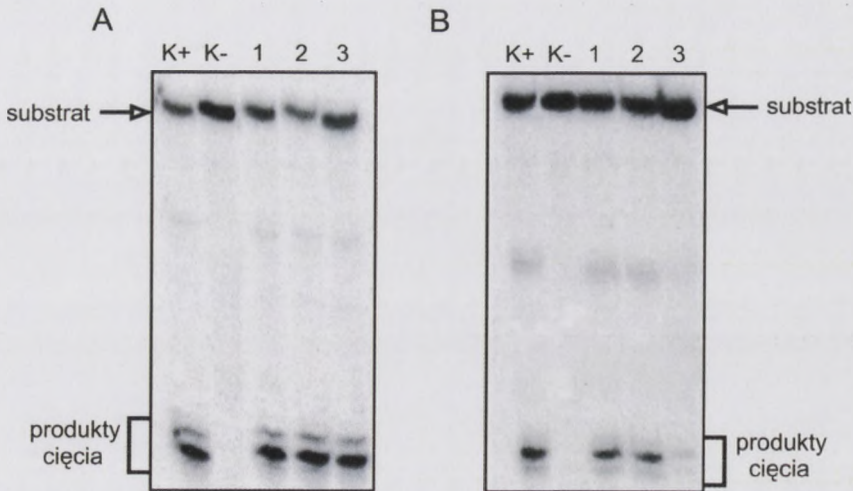
The format is designed to be used by students in a graduate-level course in behavior analysis. The format is also designed to be used by students in a graduate-level course in applied behavior analysis. The format is also designed to be used by students in a graduate-level course in behavior analysis.

The format is designed to be used by students in a graduate-level course in behavior analysis. The format is also designed to be used by students in a graduate-level course in applied behavior analysis. The format is also designed to be used by students in a graduate-level course in behavior analysis.

The format is designed to be used by students in a graduate-level course in behavior analysis. The format is also designed to be used by students in a graduate-level course in applied behavior analysis. The format is also designed to be used by students in a graduate-level course in behavior analysis.

The format is designed to be used by students in a graduate-level course in behavior analysis. The format is also designed to be used by students in a graduate-level course in applied behavior analysis. The format is also designed to be used by students in a graduate-level course in behavior analysis.

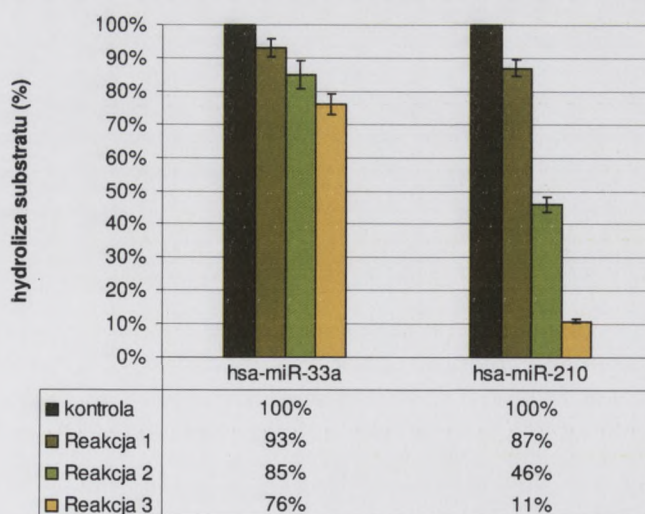
Aptamer ATD13.6



Rysunek 42. Wpływ ATD13.6 na zdolność Dicer do cięcia hsa-miR33a (A) i hsa-miR210 (B).

W reakcjach oznaczonych numerem 1 stosunek molowy aptamer:enzym wynosił 1:1, numerem 2 – 10:1, numerem 3 – 100:1. Przeprowadzono dwie reakcje kontrolne- K+ (bez aptameru) i K- (bez enzymu).

Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów stwierdzono, że ATD13.6 efektywnie hamował trawienie substratu hsa-miR-210. Dla stukrotnego molowego nadmiaru aptameru zaobserwowano około 89% inhibicję Dicer, a przy równomolowym stosunku aptamer:enzym inhibicja wynosiła jedynie 13%. Dla dziesięciokrotnego molowego nadmiaru aptameru zaobserwowano 54% inhibicję. ATD13.6 inhibował także cięcie hsa-miR-33a, jednak zdecydowanie mniej wydajnie. Dla stukrotnego nadmiaru molowego aptameru wydajność, z jaką powstawały produkty trawienia hsa-miR-33a została zredukowana o 24% (Rysunek 42, Wykres 11).



Wykres 11. Wpływ ATD13.6 na zdolność Dicer do cięcia hsa-miR-33a i hsa-miR-210.

W reakcji oznaczonej numerem 1 stosunek molowy aptamer:Dicer wynosił 1:1, numerem 2 – 10:1, numerem 3 – 100:1. Wyniki są średnimi z trzech przeprowadzonych eksperymentów.

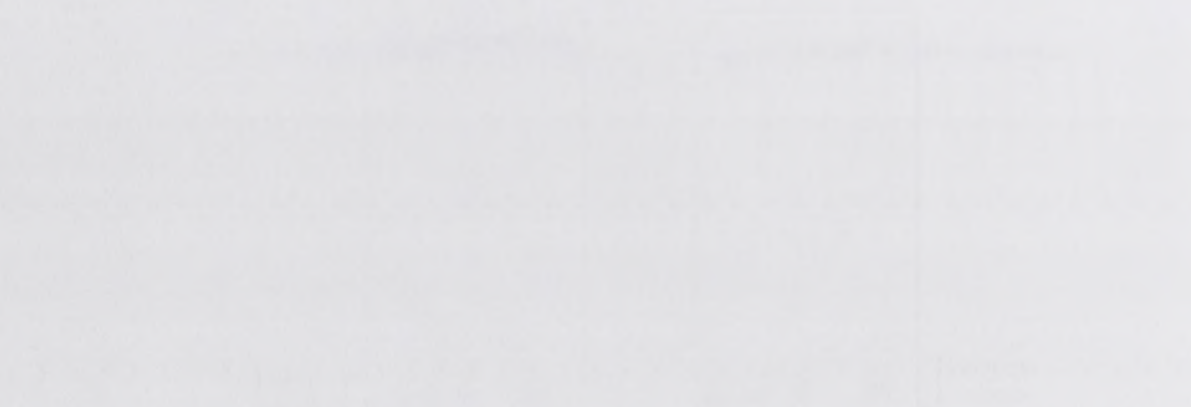


Figure 1. A line graph showing the relationship between two variables. The x-axis is labeled 'Independent Variable' and the y-axis is labeled 'Dependent Variable'. The graph shows a positive linear trend. The data points are approximately as follows:

Independent Variable	Dependent Variable
1	1.5
2	2.5
3	3.5
4	4.5
5	5.5



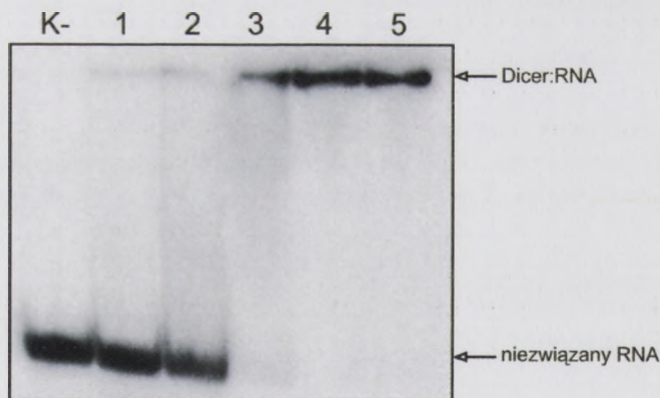
Figure 2. A line graph showing the relationship between two variables. The x-axis is labeled 'Independent Variable' and the y-axis is labeled 'Dependent Variable'. The graph shows a positive linear trend. The data points are approximately as follows:

Independent Variable	Dependent Variable
1	1.5
2	2.5
3	3.5
4	4.5
5	5.5

Podsumowując, można stwierdzić, że ATD13.6 był efektywnym inhibitorem rybonuklasy Dicer, gdy jako substrat zastosowano hsa-miR-210. Niski poziom inhibicji zaobserwowano dla substratu hsa-miR-33a.

5.2.4.3 Określanie stałej dysocjacji kompleksu ATD13.6-Dicer

W związku z tym, że ATD15.14 i ATD15.26 były mało efektywnymi inhibitorami Dicer, a ATD15.52 był trawiony przez ten enzym zdecydowano się wyznaczyć stałą dysocjacji jedynie dla ATD13.6 i Dicer. Do jej wyznaczenia wykorzystano tę samą metodę, co w przypadku HIV-1 RT, polegającą na określeniu jak zmienia się ilość wiązanego RNA ze wzrostem stężenia białka (rozdział 4.2.24). Wyznakowany radioizotopowo na końcu 5' aptamer renaturowano na wstępie przez podgrzanie do 95°C i powolne schłodzenie do osiągnięcia temperatury pokojowej. Dicer (w stężeniach od 13,3 pM do 1,33 μM) preinkubowano w buforze najpierw w temperaturze pokojowej, a później w 4°C w celu obniżenia aktywności nukleazowej. Następnie do enzymu dodawano aptamer i inkubowano całość przez 20 minut w 4°C. Mieszaniny reakcyjne rozdzielano w 8% żelu poliakryloamidowym w warunkach natywnych. Próbkę kontrolną zawierała tylko wyznakowane radioizotopowo RNA. Po rozdziale elektroforetycznym stopień wiązania analizowano wykorzystując skaner materiałów znakowanych radioizotopowo (Phosphorimager, Typhoon 8600). Na podstawie komputerowej analizy intensywności prążków na autoradiogramie (program Image Quant), określano jaki procent RNA został związany przez Dicer.



Rysunek 43. Określenie stałej dysocjacji kompleksu Dicer/ATD13.6

Próbki zawierające aptamer i białko rozdzielano w 8% natywnym żelu poliakryloamidowym. Na autoradiogramie zaznaczono położenie kompleksu aptamer:białko i niezwiązanego RNA. Jako K- oznaczono kontrolę zawierającą tylko RNA, do próbek oznaczonych numerem 1, 2, 3, 4, 5 dodawano następujące ilości Dicer: 0,013 μM, 0,133 μM, 0,4 μM, 0,93 μM, 1,33 μM.

Zaobserwowano, że wraz ze wzrostem ilości podawanego do mieszaniny reakcyjnej białka zaczynają pojawiać się kompleksy aptamer:Dicer (Rysunek 43). Niezwiązane RNA migrowały bowiem szybciej, niż te związane z białkiem.

Aby wyznaczyć stałą dysocjacji określono zależność pomiędzy stężeniem Dicer a stopniem związania RNA (Wykres 12). W oparciu o uzyskaną krzywą ustalono wielkość stałej dysocjacji. Dla kompleksu Dicer:ATD13.6 wynosiła ona 6×10^{-7} M.



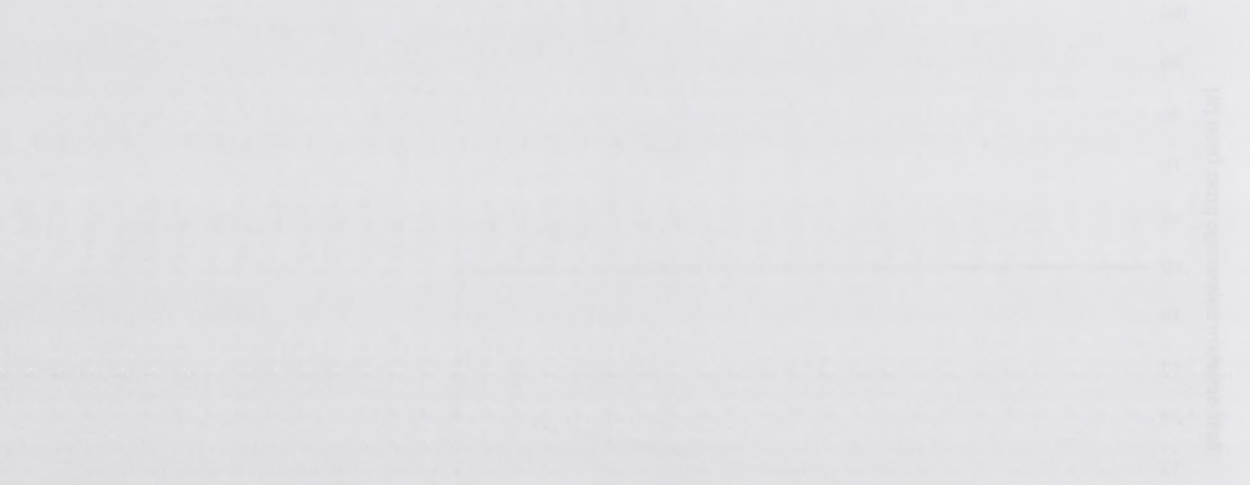
Wykres 12. Zależność pomiędzy stężeniem Dicer a wyrażonym w procentach stopniem związania aptameru ATD13.6.

Wynik jest wartością średnią z trzech przeprowadzonych eksperymentów. Według definicji wartość K_d oznacza takie stężenie białka, przy którym 50% RNA zostaje związane przez białko.

5.2.4.4 Badania mechanizmu inhibicji działania aptamerów ATD15.52 i ATD13.6

Przeprowadzone dotychczas badania pozwoliły stwierdzić, że uzyskano dwa efektywne inhibitory Dicer – ATD15.52 i ATD13.6. Jeden z nich (ATD13.6) hamował powstawanie miRNA 210, ale sam nie był cięty przez rybonukleazę, można zatem przypuszczać, że jest inhibitorem allosterycznym. Drugi aptamer – ATD15.52 – ulegał cięciu, mógłby zatem działać jako inhibitor kompetycyjny. Aby potwierdzić przypuszczalny mechanizm działania obu aptamerów badano jak zmienia się ich zdolność do inhibowania Dicer w czasie. Założono, że jeśli aptamer działa jako inhibitor allosteryczny to powinien przez cały czas hamować białko na podobnym poziomie. Inhibitor kompetycyjny po czasie, w którym uległ strawieniu, powinien przestać inhibować enzym. Z danych dostarczonych przez producenta wynika, że Dicer zachowuje aktywność przez 16h. Próbkę zawierającą rybonukleazę, substrat oraz jeden z aptamerów (ATD15.52 lub ATD13.6), w stosunku molowym wobec Dicer 100:1,

Wzrostki *Arabidopsis thaliana* (L.) Hegetsch. (Arabidopsis) w wieku 4 tygodni, uprawiane w szklarni, poddano trójfazowemu cyklowi światła (16 godzin światła / 8 godzin ciemności). Wzrostki podzielono na trzy grupy: kontrolną (K), traktowaną 2,4-D (2,4-D) oraz traktowaną 2,4-D w obecności 2,6-D (2,4-D+2,6-D). Wzrostki traktowane 2,4-D i 2,4-D+2,6-D poddawano dodatkowej trójfazowej kwarantannie (16 godzin światła / 8 godzin ciemności) przez 2 tygodnie przed pomiarami.



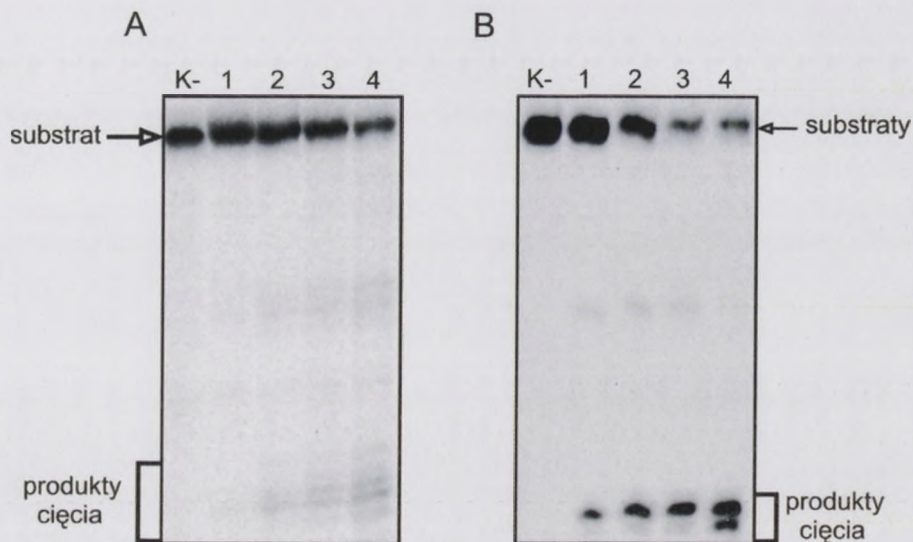
Wykres 1. Wzrostki *Arabidopsis thaliana* (L.) Hegetsch. w wieku 4 tygodni, uprawiane w szklarni, poddane trójfazowemu cyklowi światła (16 godzin światła / 8 godzin ciemności). Wzrostki podzielono na trzy grupy: kontrolną (K), traktowaną 2,4-D (2,4-D) oraz traktowaną 2,4-D w obecności 2,6-D (2,4-D+2,6-D). Wzrostki traktowane 2,4-D i 2,4-D+2,6-D poddawano dodatkowej trójfazowej kwarantannie (16 godzin światła / 8 godzin ciemności) przez 2 tygodnie przed pomiarami.

Wzrostki traktowane 2,4-D i 2,4-D+2,6-D poddawano dodatkowej trójfazowej kwarantannie (16 godzin światła / 8 godzin ciemności) przez 2 tygodnie przed pomiarami. Wyniki pomiarów przedstawiono na Wykresie 1.

3.2.4. Wzrostki *Arabidopsis thaliana* (L.) Hegetsch. w wieku 4 tygodni, uprawiane w szklarni, poddane trójfazowemu cyklowi światła (16 godzin światła / 8 godzin ciemności).

Wzrostki *Arabidopsis thaliana* (L.) Hegetsch. w wieku 4 tygodni, uprawiane w szklarni, poddane trójfazowemu cyklowi światła (16 godzin światła / 8 godzin ciemności). Wzrostki podzielono na trzy grupy: kontrolną (K), traktowaną 2,4-D (2,4-D) oraz traktowaną 2,4-D w obecności 2,6-D (2,4-D+2,6-D). Wzrostki traktowane 2,4-D i 2,4-D+2,6-D poddawano dodatkowej trójfazowej kwarantannie (16 godzin światła / 8 godzin ciemności) przez 2 tygodnie przed pomiarami. Wyniki pomiarów przedstawiono na Wykresie 1.

inkubowano więc przez 10', 1h, 5h, 16h. Równocześnie przeprowadzono reakcje kontrolne bez dodatku aptameru, a także reakcje kontrolne bez dodatku enzymu.

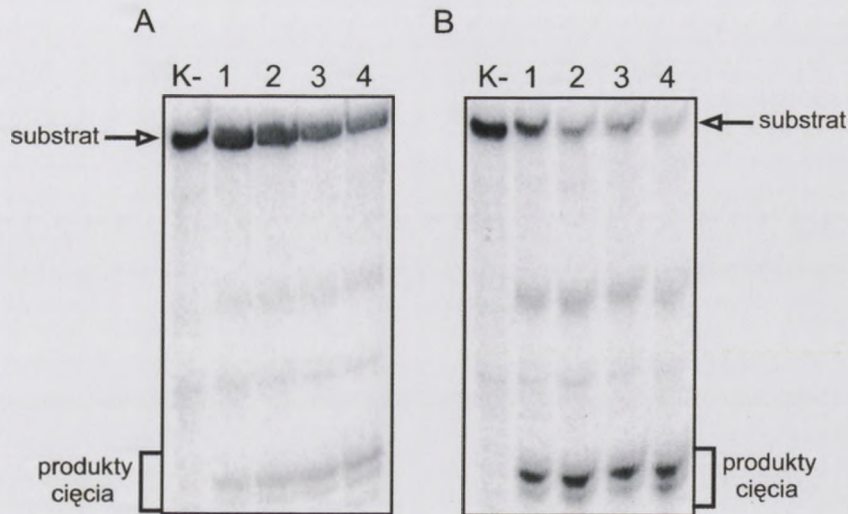


Rysunek 44. Hydroliza hsa-miR-210 w obecności stukrotnego nadmiaru ATD15.52 (A) w porównaniu z reakcją kontrolną bez dodatku aptameru (B). Próbkę inkubowane 10', 1h, 5h i 16h, oznaczono numerami odpowiednio 1, 2, 3 i 4. Reakcje kontrolne nie zawierały aptameru. Jako K- oznaczono próbki, do których nie dodano enzymu.

Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń stwierdzono, że w miarę wydłużania czasu inkubacji w niewielkim stopniu wzrastała ilość produktów cięcia dla stukrotnego molowego nadmiaru aptameru ATD15.52 (Rysunek 44). Efekt inhibitorowy widoczny był nawet podczas szesnastogodzinnej inkubacji mieszanin reakcyjnych.

Bardzo zbliżony obraz otrzymano dla aptameru ATD13.6 (Rysunek 45). Na autoradiogramie wyraźnie widać prążki odpowiadające substratowi i produktom cięcia. Ilość powstających produktów cięcia tylko nieznacznie wzrastała podczas wydłużonego czasu inkubacji próbek.



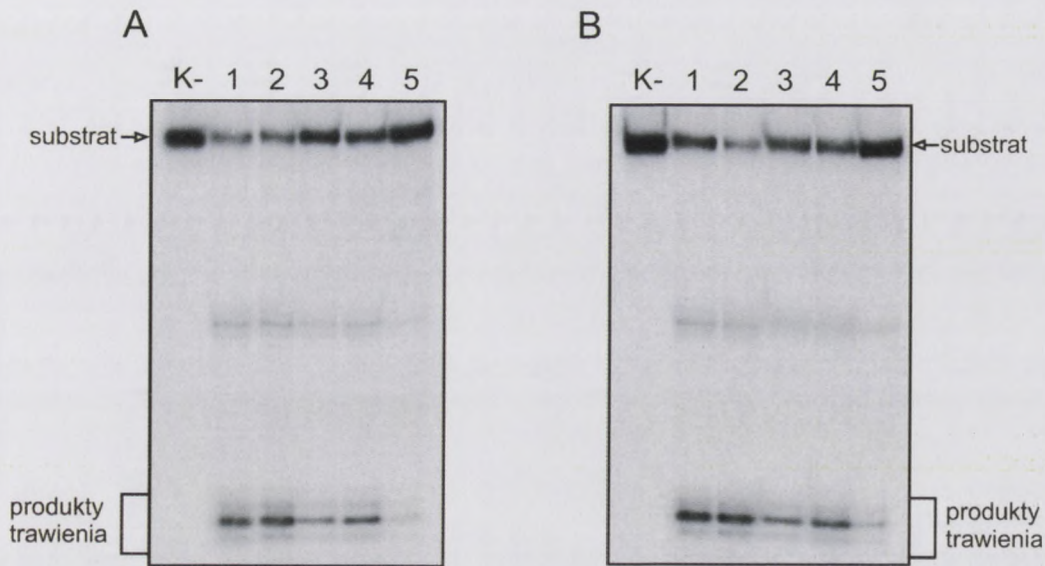


Rysunek 45. Hydroliza hsa-miR-210 w obecności stukrotnego nadmiaru ATD13.6 (A) w porównaniu z reakcją kontrolną (B).

Próbki inkubowano 10', 1h, 5h i 16h, oznaczono je numerami 1, 2, 3 i 4. W reakcjach kontrolnych nie podawano aptameru. Jako K- oznaczono próbki, do których nie podano enzymu.

W związku z tym, że przy stukrotnym molowym nadmiarze aptameru wobec białka poziom inhibicji był bardzo wysoki nie obserwowano wyraźnego przyrostu produktów trawienia substratu. Postanowiono zatem w kolejnym eksperymencie zastosować jedynie pięciokrotny nadmiar każdego z aptamerów. Na wstępie przeprowadzono pięciogodzinną inkubację ATD15.52 lub ATD13.6 z Dicer. Przeprowadzono ją, by pozwolić na całkowite strawienie aptameru będącego substratem dla Dicer. Do próbek podawano następnie wyznakowane radioizotopowo hsa-miR-210 i inkubowano całość kolejne 5h. Równoległe prowadzono reakcje, w których równocześnie podawano aptamer, substrat i enzym, inkubując całość 5h i 10h. Jako reakcje kontrolne zastosowano mieszaniny reakcyjne, w których inkubowano tylko substrat hsa-miR-210 z enzymem przez 5h i 10h. Wyniki dla każdego aptameru są średnimi z trzech eksperymentów.





Rysunek 46. Hydroliza hsa-miR-210 w obecności ATD15.52 (A) i ATD13.6 (B).

Numerami 1 i 2 oznaczono próbki, w których substrat inkubowano z Dicer odpowiednio przez 5h i 10h, numerami 3 i 4 próbki, w których jednocześnie podawano substrat, Dicer i aptamer i inkubowano odpowiednio 5h i 10h, numerem 5 próbkę, w której aptamer preinkubowano z enzymem 5h, a następnie podano substrat i inkubowano kolejne 5h. Jako K- oznaczono reakcję kontrolną bez enzymu.

Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów stwierdzono, że w miarę wydłużania czasu inkubacji wzrastała ilość produktów trawienia, zarówno dla reakcji kontrolnych, jak i dla tych, w których jednocześnie podawano substrat i aptamer (Rysunek 46). Podczas dziesięciogodzinnej inkubacji substratu, aptameru i enzymu trawienie substratu zostało obniżone o około 34,4% i 31,6%, odpowiednio dla ATD15.52 i ATD13.6. Ilość powstających produktów trawienia była o około 7% mniejsza dla pięciogodzinnej inkubacji mieszanin reakcyjnych, dla obu aptamerów. Zaobserwowano ponadto, że preinkubacja aptameru z enzymem powodowała niemal dwukrotne obniżenie ilości powstających produktów trawienia, o 67,9% dla ATD15.52 i o 65,2% dla ATD13.6.

Analogiczne reakcje przeprowadzono dla dziesięciokrotnego molowego nadmiaru aptameru w stosunku do Dicer (dane zilustrowane na Wykresie 13B). Stwierdzono, że jednoczesne podawanie do mieszaniny reakcyjnej aptameru, substratu i enzymu powoduje obniżenie powstawania produktów cięcia o 44,4% i 37% dla ATD15.52 (odpowiednio 5h i 10h inkubacji) i o 56,8% i 51,7% dla ATD13.6 (odpowiednio 5h i 10h inkubacji). W wyniku pięciogodzinnej preinkubacji tej ilości aptameru (zarówno ATD15.52, jak i ATD13.6) z enzymem zaobserwowano 90% inhibicję cięcia hsa-miR-210 (Wykres 13).

Dla obu aptamerów zaobserwowano więc bardzo podobne efekty inhibitorowe. Pozwala to sądzić, że oba aptamery działały allosterycznie, przy czym jeden z nich (ATD13.6) najprawdopodobniej wiązał się z enzymem, ale nie był cięty, drugi natomiast wiązał się

Ważnym elementem jest...

Ważnym elementem jest...

Ważnym elementem jest...

Ważnym elementem jest...

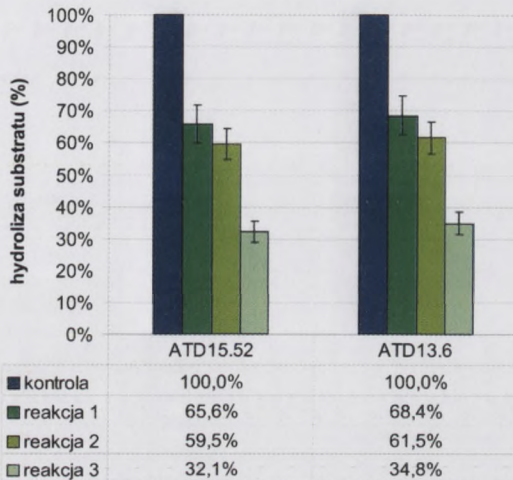
Ważnym elementem jest...

Ważnym elementem jest...

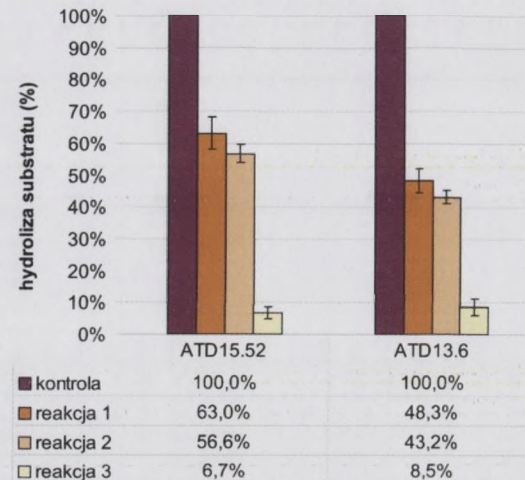
Ważnym elementem jest...

z Dicer, był trawiony, ale pozostawał związany z białkiem i w ten sposób hamował jego aktywność.

A



B



Wykres 13. Wpływ aptamerów ATD15.52 i ATD13.6 na zdolność Dicer do cięcia hsa-miR-210 przy pięciokrotnym (A) i dziesięciokrotnym (B) nadmiarze aptameru.

Numerami 1 i 2 oznaczono próbki, w których jednocześnie podawano substrat i aptamer i inkubowano je odpowiednio 5h i 10h, numerem 3 próbkę, w której aptamer preinkubowano z enzymem 5h, a następnie podawano substrat i inkubowano kolejne 5h. Wyniki są średnimi z trzech przeprowadzonych eksperymentów.

Podsumowując, wykazano, że oba aptamery na podobnym poziomie hamują aktywność Dicer dla substratu hsa-miR-210. Preinkubacja aptamerów z Dicer dodatkowo znacząco obniża ilość powstających produktów trawienia.

Kompetycja między hsa-miR-33a i hsa-miR-210

Uzyskane dotychczas wyniki badań pozwalają sądzić, że Dicer może preferencyjnie wiązać się z niektórymi RNA i to właśnie one ulegają strawieniu. Te, które wykazują wyższe powinowactwo wobec enzymu powinny zatem hamować cięcie cząsteczek o niższym powinowactwie. Sprawdzone więc czy kompetycja o miejsce wiązania i cięcia może zachodzić także między cząsteczkami będącymi naturalnymi substratami Dicer (hsa-miR-33a i hsa-miR-210). Wykonano zatem eksperymenty, w których do mieszanin reakcyjnych podawano:

A. hsa-miR-210 wyznakowany radioizotopowo na końcu 5' i hsa-miR-33a w trzech stosunkach molowych wobec Dicer (1:1, 10:1, 100:1),

B. hsa-miR-33a wyznakowany radioizotopowo na końcu 5' i hsa-miR-210 w trzech stosunkach molowych wobec Dicer (1:1, 10:1, 100:1).

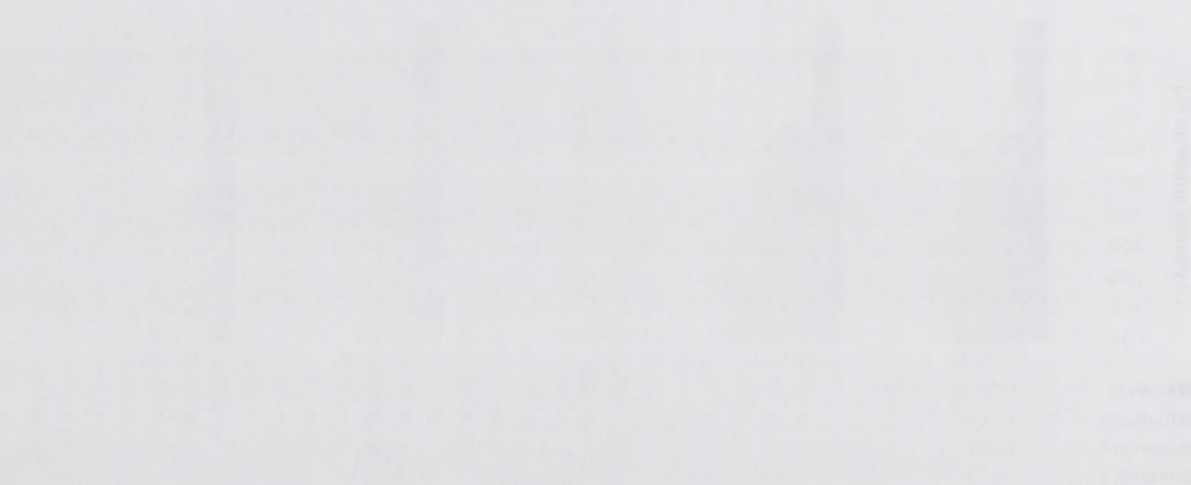


Figure 1. Distribution of the variable across the four categories. The y-axis represents the percentage of observations, and the x-axis represents the categories: Control, Low, High, and Very High.

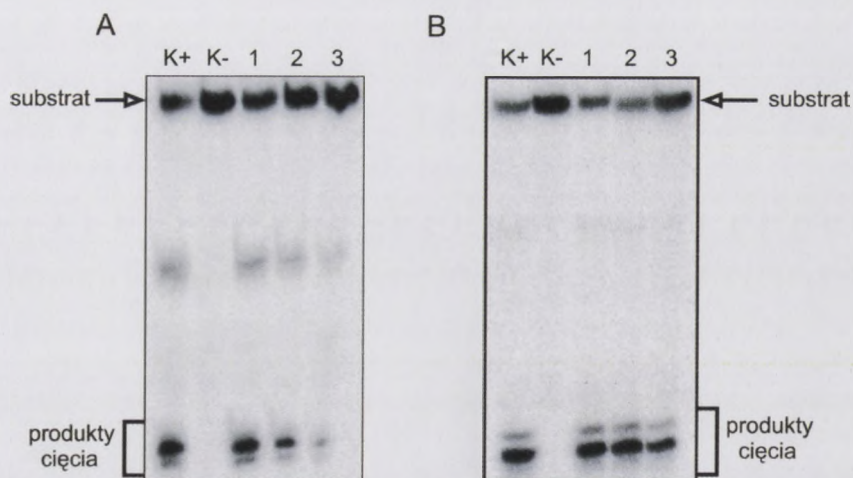
Results of the regression analysis are presented in Table 1. The dependent variable is the percentage of observations in the 'Control' category. The independent variables are the control variables and the interaction terms.

The control variables include age, gender, and education. The interaction terms represent the joint effects of the independent variables. The results show that the control variables have a significant impact on the dependent variable.

Specifically, the interaction term between age and gender is significant, indicating that the effect of age on the dependent variable varies by gender. The interaction term between education and gender is also significant, suggesting that the effect of education on the dependent variable is different for males and females.

Overall, the regression analysis indicates that the control variables and the interaction terms are important predictors of the percentage of observations in the 'Control' category. The results provide valuable insights into the relationships between the independent variables and the dependent variable.

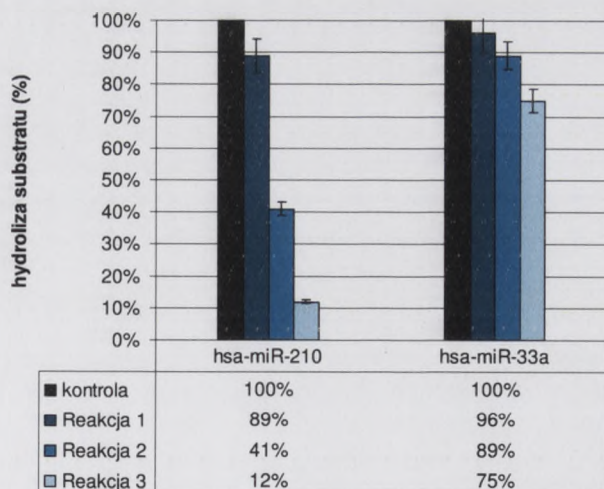
Table 1. Regression coefficients and standard errors for the dependent variable 'Control'.



Rysunek 47. Wpływ hsa-miR-33a na zdolność Dicer do trawienia hsa-miR-210 (A) i hsa-miR-210 na zdolność Dicer do trawienia hsa-miR-33a (B).

W reakcjach oznaczonych numerem 1 stosunek molowy substrat:enzym wynosił 1:1 wobec Dicer, numerem 2 – 10:1, numerem 3 – 100:1. Przeprowadzono dwie reakcje kontrolne- K+ (bez aptameru) i K- (bez enzymu).

Na podstawie uzyskanych wyników widać wyraźnie, że substraty konkurowały ze sobą o miejsce wiązania Dicer. Efekt ten był znacznie bardziej wyraźny, gdy wyznakowanym radioizotopowo substratem był hsa-miR-210. Poziom inhibicji cięcia tego pre-miRNA wzrastał wraz ze wzrostem ilości dodawanego niewyznakowanego hsa-miR-33a. Zaobserwowano 88.4% inhibicję przy stukrotnym molowym nadmiarze hsa-miR-33a. Znacznie słabszy wpływ inhibitorowy wykazywał podawany w nadmiarze hsa-miR-210, gdy wyznakowanym radioizotopowo substratem w reakcji był hsa-miR-33a. Przy równomolowej ilości hsa-miR-210 i rybonukleazy Dicer obserwowano zaledwie 4% obniżenie ilości produktów trawienia, dla dziesięciokrotnego nadmiaru – 11%, dla stukrotnego – 25%.



Wykres 14. Wpływ hsa-miR-33a na zdolność Dicer do trawienia hsa-miR-210 i hsa-miR-210 na zdolność Dicer do trawienia hsa-miR-33a.

W reakcji oznaczonych numerem 1 stosunek molowy substrat:enzym wynosił 1:1 wobec Dicer, numerem 2 – 10:1, numerem 3 – 100:1. Wyniki są średnimi z trzech przeprowadzonych eksperymentów.



Podsumowując, wykazano, że naturalne dla Dicer substraty – pre-mikroRNA konkurują o miejsce wiązania i cięcia w enzymie. hsa-miR-210 ma niższe powinowactwo wobec enzymu niż hsa-miR-33a.

5.2.5 Analiza bioinformatyczna

Sprawdzono również czy wyselekcjonowane sekwencje są kodowane w ulegającej transkrypcji części genomu ludzkiego. Dla 72. cząsteczek znaleziono w transkryptomie szesnastonukleotydowe, bądź dłuższe, fragmenty sekwencji losowych, dla 48. cząsteczek nie. Wyniki analizy zamieszczono poniżej. Na zielono zaznaczono wyniki dla czterech aptamerów wybranych do dalszych badań, czyli ATD13.6, ATD15.14, ATD15.26 i ATD15.52, resztę zamieszczono w Aneksie 2.

84,3% sekwencji aptamerów uzyskanych drogą selekcji *in vitro* a zidentyfikowanych w genomie, znajduje się w intronach, 14,1% w eksonach, a 1,6% w rejonach międzygenowych. Dla niektórych aptamerów zidentyfikowane sekwencje występują w transkryptomie człowieka wielokrotnie, np.: 10.19 - 15 razy, 13.9 - 24 razy, 15.14 - 28 razy, 15.31 - 12 razy, 15.65 - 10 razy i 15.69 - 13 razy.

Spośród genów, w których występują poszukiwane sekwencje wyróżnić można między innymi geny kodujące:

- białka receptorowe (THRA, IL3RA, IL17RD, PTPRN2, GRB10, GPR120, PRIC285, RARB, CHRM3, PTPRN2, TGFBR2, PTPRS, TGFR-2),
- białka transporterowe (należące do rodziny SLC (ang. *Solute Carrier Family*) – SLC8A2, SLC26A10, SLC1A7, SLC7A14, SLC30A10, SLC24A3, SLC9A3, a także białko MTCH1 odpowiedzialne za lokalizację mitochondrialną),
- kinazy (NEK11, MAP2K3, MAP3K1, ITPK1, SNRK, PIK3C2G, MAG11),
- białka tworzące kanały jonowe (potasowe - KCNMB2 i KCNQ5, wapniowe – CACNA1HB i CACNA2D3 i sodowy – ACCN4),
- białka uczestniczące w procesie ubikwitynylacji (USP13, UBAP2, UBE2H i FBXL7),
- białka posiadające motywy palca cynkowego (ZMYM4, ZNF533, ST18, ZMIZI, ZGPAT, ZNF764, ZNF498, PRIC285). Poniżej przedstawiono wyniki występowania sekwencji losowych cząsteczek ATD13.6, ATD15.14, ATD15.26 i ATD15.52.

1. Introduction
2. Methodology
3. Results
4. Discussion
5. Conclusion

3.2.3. Analysis of variance
The analysis of variance was conducted to determine the effect of the independent variables on the dependent variable. The results are presented in Table 3.

With regard to the interaction effect, the results showed that the interaction between the independent variables was significant. This indicates that the effect of one independent variable on the dependent variable depends on the level of the other independent variable.

The main effect of the independent variable was also significant. This indicates that the independent variable has a significant effect on the dependent variable, regardless of the level of the other independent variable.

1.2.3.4. Discussion
The results of the analysis of variance indicate that the independent variable has a significant effect on the dependent variable. This is consistent with the hypothesis that the independent variable has a positive effect on the dependent variable.

1.2.3.5. Conclusion
The results of the analysis of variance indicate that the independent variable has a significant effect on the dependent variable. This is consistent with the hypothesis that the independent variable has a positive effect on the dependent variable.

1.2.3.6. References
The following references were used in the analysis of variance:
1. [Reference 1]
2. [Reference 2]
3. [Reference 3]

1.2.3.7. Appendix
The following appendix was used in the analysis of variance:
1. [Appendix 1]
2. [Appendix 2]
3. [Appendix 3]

Tabela 21. Wyniki analizy transkryptomu człowieka pod kątem wyselekcjonowanych wobec Dicer sekwencji losowych cząsteczek ATD13.6, ATD15.14, ATD15.26 i ATD15.52.

W tabeli przedstawiono fragment sekwencji losowej aptameru zidentyfikowanej w ludzkim genomie, gen, w którym dana sekwencja występuje i lokalizację na chromosomie.

¹ w nawiasie podano długość sekwencji losowej aptameru

² w nawiasie podano długość sekwencji identycznej lub prawie identycznej (zidentyfikowanej w genomie człowieka) z sekwencją losową aptameru

³ wyłuszczone jedno-, dwu- lub trzynukleotydowe różnice między sekwencją zidentyfikowaną w genomie a sekwencją losową aptameru

Nazwa aptameru	Nazwa genu, w którym zidentyfikowano fragment sekwencji losowej aptameru	Lokalizacja genu w chromosomie	Zidentyfikowany w ludzkim genomie fragment sekwencji losowej aptameru (długość, nt)
13.6 (20 nt) ¹	RARB , retinoic acid receptor, beta	3p24 , intron 3	gggtgtgtagtcgtgg (16) ²
	CACNA2D3 , calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta 3 subunit	3p21.1 , intron	gggtgtgtagtgggtgg (18)
15.14 (20 nt)	HMGCLL1 , 3-hydroxymethyl-3-methylglutaryl-Coenzyme A lyase-like 1	6p12.1 , intron	cctcccatccctgcc (16)
	ROPNIL , ropporin 1-like	5p15.2 , intron	ggcctcccatccctg (16)
	CDH23 , cadherin-like 23	10q21-q22 , intron	ggcctcccatccct (16)
	THRA , thyroid hormone receptor, alpha (erythroblastic leukemia viral (v-erb-a) oncogene homolog, avian)	17q11.2 , intron	gcctcccatccctgc (16)
	ITGAE , integrin, alpha E (antigen CD103, human mucosal lymphocyte antigen 1; alpha polypeptide)	17p13 , intron	ggcctcccatccctg (16)
	NFATC1 , nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1	18q23 , intron	cctcccatccctgcc (16)
	LYPD3 , LY6/PLAUR domain containing 3	19q13.31 , intron	cctcccatccctgcc (16)
	IL31RA , interleukin 31 receptor A	5q11.2 , intron	cctcccatccctgcc (16)
	AFF3 , AF4/FMR2 family, member 3	2q11.2-q12 , intron	cctcccatccctgcc (16)
	MTCH1 , mitochondrial carrier homolog 1 (C. elegans)	6pter-p24.1 , intron	cctcccatccctgcc (16)
	VAV2 , vav 2 guanine nucleotide exchange factor	9q34.1 , intron	ggcctcccatccct (16)
	IL17RD , interleukin 17 receptor	3q21 , intron	ggcctcccaccctgcc (17)
	IL17RD , interleukin 17 receptor D	3p14.3 , intron	ggcctcccatccctg (17)
	DLGAP4 , discs, large (Drosophila) homolog-associated protein 4	20q11.23 , intron	gcctcccatccctgcc (17)
	PIK3C2G , phosphoinositide-3-kinase, class 2, gamma polypeptide	12p12 , intron	ggcctcccatccatgcc ³ (18)
ZADH1 , zinc binding alcohol dehydrogenase, domain containing 1	14q24.3 , intron	ggcctcccctccctgcc (18)	

Table 1. Summary of the results of the analysis of variance for the dependent variables of the study. The dependent variables were: (1) the number of correct responses, (2) the number of incorrect responses, (3) the number of responses, (4) the number of correct responses per second, (5) the number of incorrect responses per second, and (6) the number of responses per second. The independent variables were: (1) the number of trials, (2) the number of correct responses, (3) the number of incorrect responses, and (4) the number of responses. The results are presented in the following table.

Dependent Variable	Independent Variable	F(1, 10)	p
Number of correct responses	Number of trials	1.2	.33
	Number of correct responses	0.8	.38
	Number of incorrect responses	0.5	.48
	Number of responses	0.3	.58
Number of incorrect responses	Number of trials	1.5	.23
	Number of correct responses	1.0	.32
	Number of incorrect responses	0.7	.41
	Number of responses	0.4	.53
Number of responses	Number of trials	1.8	.19
	Number of correct responses	1.2	.28
	Number of incorrect responses	0.9	.35
	Number of responses	0.6	.44
Number of correct responses per second	Number of trials	1.1	.31
	Number of correct responses	0.9	.36
	Number of incorrect responses	0.6	.44
	Number of responses	0.4	.53
Number of incorrect responses per second	Number of trials	1.4	.25
	Number of correct responses	1.0	.32
	Number of incorrect responses	0.8	.38
	Number of responses	0.5	.48
Number of responses per second	Number of trials	1.7	.21
	Number of correct responses	1.3	.26
	Number of incorrect responses	1.0	.32
	Number of responses	0.7	.41

	PPCDC , phosphopantothenoylcysteine decarboxylase	15q24.2 , intron	gggctccccatccctgc (18)
	HIF3A , hypoxia inducible factor 3, alpha subunit	19q13.32 , 3 nt eksonu, reszta intronu	gggcctccccagccctg (18)
	APOL6 , apolipoprotein L, 6	22q12.3 , ostatni ekson	gggcctccccaccctgc (18)
	PHC2 , polyhomeotic homolog 2 (<i>Drosophila</i>)	1p34.3 , intron	ggcctccccaccctgcc (18)
	ASB1 , ankyrin repeat and SOCS box-containing 1	2q37 , ostatni ekson	ggcctccccagccctgcc (18)
	PTPRN2 , protein tyrosine phosphatase, receptor type, N polypeptide 2	7q36 , intron	gggcctccgcacccctgc (18)
	GRB10 , growth factor receptor-bound protein 10	7p12-p11.2 , ekson 4	gggcctccccatgcctg (18)
	PSD , pleckstrin and Sec7 domain containing	10q24 , intron	ggcctgccatccctgcc (18)
	GPR120 , G protein-coupled receptor 120	10q23.33 , intron	ggcctccccctccctgcc (18)
	NUMA1 , Nuclear mitotic apparatus protein 1	11q13 , intron	gggcctccccatccctgcc (19)
	peroxisomal proliferator-activated receptor A interacting complex 285	20q13.33 , intron	gggcctccccatccctgcc (19)
	CENTD3 , centaurin, delta 3	5q31.3 , intron	cggecctccccatccctgcc (20)
15.26	TRIM13 , tripartite motif-containing 13	13q14 , intron 1	attgagtgttgcctt (16)
15.68			
15.79	TRIM13 , tripartite motif-containing 13	13q14 , intron 3	attgagtgttgcctt (16)
(20 nt)			
	BANP , BTG3 associated nuclear protein	16q24.2-q24.3 , intron	attgagtgttcccttcc (18)
	ASXL2 , additional sex combs like 2 (<i>Drosophila</i>)	2p24.1 , intron	attgagtgttgccttcc (18)
15.30	SPOCK1 , sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan (testican) 1	5q31 , intron	tgagtcgttgtgctgc (16)
15.52			
(20 nt)			
	MAG11 , membrane associated guanylate kinase, WW and PDZ domain containing 1	3p14.1 , intron	gcagtgagtgttgtgct (18)
	ADARB1 , Adenosine deaminase, RNA-specific, B1 (RED1 homolog rat)	21q22.3 , intron	agtgagtcggtgtgctgc (18)
	TAC4 , tachykinin 4 (hemokinin)	17q21.33 , intron	gcagtgagtcggtgtgctgc (23)

Faint, illegible text, possibly bleed-through from the reverse side of the page.

Faint, illegible text, possibly bleed-through from the reverse side of the page.

5.2.6 Dyskusja

Do tej pory nie wiadomo jaki jest mechanizm regulacji aktywności rybonukleazy Dicer w komórkach. Jak dotąd w literaturze nie ukazała się żadna informacja o próbie hamowania aktywności rybonukleazy Dicer z pomocą kwasów rybonukleinowych. Postanowiono zatem sprawdzić czy krótkie cząsteczki RNA mogą być nie tylko jej substratami, lecz także regulatorami aktywności tego enzymu. Wykorzystując metodę selekcji *in vitro* uzyskano łącznie 143 cząsteczki zdolne do wiązania się z ludzką rybonukleazą Dicer. Przeprowadzono 15 cykli selekcji uzyskując dziesięciokrotne wzbogacenie puli cząsteczek RNA wiążących się z Dicer.

W wyniku podjętych badań zidentyfikowano dwie cząsteczki (ATD15.14 i ATD15.26), które wiążą się z Dicer i w podobnym stopniu hamują trawienie dwóch substratów – hsa-miR-33a i hsa-miR-210 (patrz Rysunek 39, 40). Inhibicja cięcia substratu przy stukrotnym molowym nadmiarze aptameru ATD15.14 wobec Dicer wynosiła 30% i 41%, odpowiednio dla hsa-miR-33a i hsa-miR-210 (patrz Wykres 8). ATD15.26 hamował powstawanie produktów trawienia o 32% dla substratu hsa-miR-33a i o 35% dla hsa-miR-210 (patrz Wykres 9). Inhibicja Dicer była mało wydajna, nie dochodzono więc jaka jest natura oddziaływań aptamer:enzym. Przeprowadzono jednak reakcje, w których testowane aptamery posłużyły jako substraty dla Dicer. ATD15.26 był hydrolizowany przez Dicer dając jeden widoczny produkt, natomiast dopiero po 16h inkubacji ATD15.14 z enzymem zaobserwowano pojawienie się dwóch produktów cięcia (patrz Rysunek 37 C i D). Program RNAstructure wygenerował trzy potencjalne struktury drugorzędowe ATD15.14 (patrz Rysunek 33). Dwie z nich zbudowane są z dwóch szpilek, jedną strukturę tworzy pojedyncza szpilka. Wszystkie posiadają pętle wewnętrzne lub niesparowania, a zakończone są pętlami terminalnymi z jednym niesparowaniem na końcu 3' lub 5'. Dla ATD15.26 RNAstructure wygenerował tylko jedną strukturę drugorzędową, w obrębie której występują dwie szpilki zawierające pętlę wewnętrzną i niesparowanie (patrz Rysunek 34). Na końcu 3' występuje jeden niesparowany nukleotyd. Struktury zaproponowane dla ATD14.15 i ATD15.26 różnią się od struktur typowych substratów dla Dicer. Nie znaczy to jednak, że nie są rozpoznawane i że nie mogą być cięte przez ten enzym. Efektywność cięcia, szczególnie dla ATD15.14, jest jednak niska. Należy również wziąć pod uwagę fakt, iż struktury te nie zostały potwierdzone eksperymentalnie i te rzeczywiste mogą się różnić od zaproponowanych przez program RNAstructure. W związku z tym, że cząsteczki ATD15.14 i ATD15.26 są słabymi inhibitorami ludzkiej Dicer postanowiono zaniechać przeprowadzanie dalszych eksperymentów.

Wykonane testy pozwoliły także zidentyfikować dwie cząsteczki RNA (ATD15.52 i ATD13.6), które inhibowały proces trawienia tylko jednego (hsa-miR-210) z dwóch zastosowanych do badań substratów. Obie cząsteczki hamowały cięcie hsa-miR-210 na podobnym poziomie, ATD15.52 w 84% (patrz Rysunek 41, Wykres 10), a ATD13.6 w 89% (patrz Rysunek 42, Wykres 11), przy stukrotnym molowym nadmiarze aptameru wobec Dicer. Co ciekawe, na podstawie wcześniejszych eksperymentów wykazano, że analogicznie, jak w przypadku ATD15.14 i ATD15.26, obie cząsteczki ATD15.52 i ATD13.6 wiązały się z Dicer (patrz Rysunek 36), ale tylko jedna z nich (ATD15.52) była przez nią efektywnie cięta (patrz Rysunek 37 A i B). Wynik ten jest bardzo interesujący, ponieważ nasuwa się pytanie, w jaki sposób wyselekcjonowano cząsteczki (ATD15.52 i ATD15.26), które są substratem dla Dicer, a uzyskano je w całości? W świetle przeprowadzonych badań i uzyskanych wyników wydaje się, że procesy wiązania i cięcia substratu przez Dicer nie zachodzą równocześnie. Najprawdopodobniej najpierw dochodzi do rozpoznania substratów, a dopiero w kolejnym etapie ten z nich, który wykazuje wyższe powinowactwo wobec enzymu ulega trawieniu. Może to tłumaczyć funkcjonowanie aptameru ATD15.52 jako inhibitora hsa-miR-210. Uzyskane dane pozwalają sądzić, że nie istnieje jedna uniwersalna cząsteczka hamująca aktywność Dicer. Dla konkretnych substratów mogą więc istnieć cząsteczki inhibitorowe, które wykazują wyższe powinowactwo do rybonukleazy Dicer.

Rozpatrując powinowactwo różnych cząsteczek RNA do białka stwierdzono także, że sekwencje losowe aptamerów ATD13.6 i ATD15.52 (silne inhibitory hsa-miR-210) cechuje obecność dużej liczby reszt guanozyny. W ATD13.6 jest aż 10 reszt G, czyli stanowią one 50% sekwencji losowej tej cząsteczki. W przypadku ATD15.52 w obrębie sekwencji losowej jest 8 reszt G. Dla cząsteczek ATD15.14 i ATD15.26, a więc słabych inhibitorów, w sekwencji losowej znajdują się tylko 4 reszty G. Wydaje się zatem, że za siłę rozpoznawania i oddziaływania może odpowiadać także skład nukleotydowy aptamerów. Oczywiście nie jest to jedyny czynnik odpowiadający za oddziaływanie substrat:Dicer. Bardzo istotna jest również: sekwencja, struktura drugorzędowa, obecność lub brak pętli wewnętrznych (symetrycznych bądź niesymetrycznych), a także obecność niesparowań, zarówno w trzonie dsRNA, jak i na końcach 3' i 5' cząsteczki.

W kolejnym etapie badań należałoby zatem określić eksperymentalnie struktury drugorzędowe inhibitorów Dicer, czyli cząsteczek ATD13.6 i ATD15.52. Program RNAstructure wygenerował tylko jedną potencjalną strukturę ATD13.6, dla której wartość energii swobodnej (ΔG) wynosiła -9.5 kcal/mol (patrz Rysunek 32). Na końcu 5' występuje długi szesnastonukleotydowy odcinek jednoniciowy, a następnie struktura szpilki do włosów

The first part of the paper discusses the importance of the

second part of the paper discusses the importance of the

third part of the paper discusses the importance of the

fourth part of the paper discusses the importance of the

fifth part of the paper discusses the importance of the

sixth part of the paper discusses the importance of the

seventh part of the paper discusses the importance of the

eighth part of the paper discusses the importance of the

ninth part of the paper discusses the importance of the

tenth part of the paper discusses the importance of the

eleventh part of the paper discusses the importance of the

twelfth part of the paper discusses the importance of the

thirteenth part of the paper discusses the importance of the

fourteenth part of the paper discusses the importance of the

fifteenth part of the paper discusses the importance of the

sixteenth part of the paper discusses the importance of the

seventeenth part of the paper discusses the importance of the

eighteenth part of the paper discusses the importance of the

nineteenth part of the paper discusses the importance of the

twentieth part of the paper discusses the importance of the

twenty-first part of the paper discusses the importance of the

twenty-second part of the paper discusses the importance of the

twenty-third part of the paper discusses the importance of the

twenty-fourth part of the paper discusses the importance of the

twenty-fifth part of the paper discusses the importance of the

twenty-sixth part of the paper discusses the importance of the

twenty-seventh part of the paper discusses the importance of the

twenty-eighth part of the paper discusses the importance of the

twenty-ninth part of the paper discusses the importance of the

thirtieth part of the paper discusses the importance of the

thirty-first part of the paper discusses the importance of the

thirty-second part of the paper discusses the importance of the

thirty-third part of the paper discusses the importance of the

thirty-fourth part of the paper discusses the importance of the

thirty-fifth part of the paper discusses the importance of the

z dwiema pętlami wewnętrznymi i pętlą terminalną. Na końcu 3' znajduje się jeden niesparowany nukleotyd. Dla ATD15.52 RNAstructure przewidział dwie struktury drugorzędowe (patrz Rysunek 35). Jedna zbudowana jest ze szpilki i zawiera jedno wybrzuszenie, dwie pętle wewnętrzne i pętlę terminalną. Na końcu 5' występuje niesparowany nukleotyd. Druga struktura zaproponowana przez program komputerowy zbudowana jest z dwóch szpilek połączonych czteronukleotydowym odcinkiem jednoniciowym i zakończonych pętlami terminalnymi. Na końcach 5' i 3' występują odpowiednio 13-nukleotydowy odcinek jednoniciowy i pojedyncze niesparowanie. We wcześniejszych badaniach wykazano, że typowe substraty dla Dicer powinny zawierać grupę monofosforanową na końcu 5' i dwa niesparowane nukleotydy na końcu 3' [158]. Częsteczki dsRNA posiadające na końcu 5' grupę monofosforanową lub trójfosforanową i dwa nukleotydy na końcu 3', bądź tępe końce, mogą być również substratami dla rybonukleazy Dicer [115]. Cięte przez rybonukleazę mogą być również cząsteczki posiadające niesparowany nukleotyd na końcu 5' [122], a trawienie dsRNA postępuje od końców cząsteczki [54, 159]. Brak cięcia ATD13.6 może wynikać zatem z obecności długiego jednoniciowego odcinka przy końcu 5' cząsteczki. Struktury przewidziane przez program komputerowy należy jednak potwierdzić eksperymentalnie. Dla ATD13.6 określono również stałą dysocjacji (patrz Rysunek 43). Jej wartość wynosi $6 \times 10^{-7} \mu\text{M}$ (patrz Wykres 12).

Wyniki pierwszych eksperymentów pozwalały przypuszczać, że ATD15.52 hamował trawienie hsa-miR-210 na zasadzie kompetycji, a ATD13.6 na zasadzie zawady przestrzennej. Założono więc, że jeśli aptamer działał jako inhibitor allosteryczny to powinien przez cały czas hamować Dicer na podobnym poziomie. W przypadku inhibitora kompetycyjnego powinno się zaobserwować stopniowy wzrost ilości produktów trawienia w miarę wydłużania czasu inkubacji. Na podstawie wyników uzyskanych w kolejnych eksperymentach, w których stosowano piecio-, dziesięcio- i stukrotne molowe nadmiary aptameru w stosunku do białka stwierdzono, że oba aptamery w podobny sposób hamowały enzym (patrz Rysunek 44, 45, 46, Wykres 13). Wydaje się zatem, że oba aptamery działały na zasadzie inhibitorów allosterycznych, przy czym jeden z nich (ATD13.6) najprawdopodobniej wiązał się z enzymem, ale nie był cięty, drugi natomiast (ATD15.52) wiązał się z Dicer, był trawiony, ale pozostawał związany z białkiem i w ten sposób hamował jego aktywność. Aby potwierdzić wyniki tych eksperymentów należałoby przeprowadzić bardziej szczegółowe badania.

Jeżeli przypuszczenia, że najpierw dochodzi do konkurencji o miejsce wiązania w Dicer, a dopiero potem dochodzi do cięcia są słuszne, to wówczas prekursorzy miRNA powinny układać się w szereg powinowactwa wobec Dicer. Za takim schematem biogenezy



miRNA przemawia także fakt, iż aptamery ATD15.52 i ATD13.6 inhibowały cięcie tylko jednego pre-miRNA, praktycznie nie wpływając na drugi. Ostatecznych dowodów potwierdzających tę hipotezę dostarczył eksperyment, w którym hsa-miR33a hamował cięcie hsa-miR-210 (patrz Rysunek 47A). Z drugiej strony nawet duży nadmiar hsa-miR-210 nie wpływał znacząco na zdolność Dicer do trawienia hsa-miR-33a (patrz Rysunek 47B). Wykazano zatem, że hsa-miR-33a wykazuje wyższe powinowactwo do enzymu niż hsa-miR-210.

Pula wszystkich cząsteczek wyselekcjonowanych wobec ludzkiej rybonukleazy Dicer jest bardzo zróżnicowana, zarówno pod względem sekwencji, jak i struktury. Wcześniej wykazano, że Dicer tnie spinki RNA zbudowane z powtórzeń CNG (praca doktorska J. Król). Stwierdzono także, że reaktywność Dicer zależy od typu zasad wchodzących w skład powtórzenia (praca doktorska J. Król). Określono ponadto, że struktura drugorzędowa prekursora miRNA może wpływać na powstawanie aktywnych miRNA. Wykazano, że w strukturze prekursorów miRNA wzdłuż trzonu występuje mozaika stabilnych i niestabilnych rejonów. Zasugerowano, że miejsca stabilne mogą odpowiadać za wiązanie z białkami uczestniczącymi w ścieżce RNAi [160]. Niestabilne natomiast mogą wyznaczać miejsca cięcia dla Dicer [160]. Stwierdzono również, że występowanie struktur typu jednostronne wybrzuszenia, czy niesymetryczne pętle wewnętrzne powoduje słabsze oddziaływanie z rybonukleazą Dicer, a co za tym idzie także mniej efektywne cięcie. Elementy destabilizujące strukturę dsRNA wpływają również na długość powstających produktów cięcia (rozprawa doktorska J. Król). Pośród sekwencji wszystkich cząsteczek uzyskanych drogą selekcji *in vitro* zidentyfikowano tylko 18 wspólnych motywów. Wykorzystując program RNAstructure wyróżniono aptamery tworzące trzy rodziny: z jedną, dwiema lub trzema szpilkami, z pojedynczymi lub wielokrotnymi jednostronnymi lub dwustronnymi wypętlzeniami, niesparowaniami i pętlami terminalnymi. Liczba wspólnych motywów sekwencyjnych jest niska, natomiast różnorodność struktur zaproponowanych przez program RNAstructure wysoka. Wskazuje to, iż Dicer może oddziaływać z bardzo różnorodnymi substratami.

Aby stwierdzić, czy aktywność Dicer może być regulowana przez cząsteczki RNA zakodowane w genomie człowieka, porównano zidentyfikowane sekwencje losowe ze wszystkimi znanymi transkryptami ludzkimi. Dla 72. spośród wyselekcjonowanych cząsteczek RNA, zidentyfikowano co najmniej jeden szesnastonukleotydowy, bądź dłuższy, fragment sekwencji losowej identyczny, bądź prawie identyczny, z tym występującym w ulegającej transkrypcji części genomu. Dla sekwencji losowych 48. aptamerów takich

1984
1985
1986
1987
1988
1989
1990
1991
1992
1993
1994
1995
1996
1997
1998
1999
2000
2001
2002
2003
2004
2005
2006
2007
2008
2009
2010
2011
2012
2013
2014
2015
2016
2017
2018
2019
2020
2021
2022
2023
2024
2025

2026
2027
2028
2029
2030
2031
2032
2033
2034
2035
2036
2037
2038
2039
2040
2041
2042
2043
2044
2045
2046
2047
2048
2049
2050
2051
2052
2053
2054
2055
2056
2057
2058
2059
2060
2061
2062
2063
2064
2065
2066
2067
2068
2069
2070
2071
2072
2073
2074
2075
2076
2077
2078
2079
2080
2081
2082
2083
2084
2085
2086
2087
2088
2089
2090
2091
2092
2093
2094
2095
2096
2097
2098
2099
2100

2101
2102
2103
2104
2105
2106
2107
2108
2109
2110
2111
2112
2113
2114
2115
2116
2117
2118
2119
2120
2121
2122
2123
2124
2125
2126
2127
2128
2129
2130
2131
2132
2133
2134
2135
2136
2137
2138
2139
2140
2141
2142
2143
2144
2145
2146
2147
2148
2149
2150
2151
2152
2153
2154
2155
2156
2157
2158
2159
2160
2161
2162
2163
2164
2165
2166
2167
2168
2169
2170
2171
2172
2173
2174
2175
2176
2177
2178
2179
2180
2181
2182
2183
2184
2185
2186
2187
2188
2189
2190
2191
2192
2193
2194
2195
2196
2197
2198
2199
2200

2201
2202
2203
2204
2205
2206
2207
2208
2209
2210
2211
2212
2213
2214
2215
2216
2217
2218
2219
2220
2221
2222
2223
2224
2225
2226
2227
2228
2229
2230
2231
2232
2233
2234
2235
2236
2237
2238
2239
2240
2241
2242
2243
2244
2245
2246
2247
2248
2249
2250
2251
2252
2253
2254
2255
2256
2257
2258
2259
2260
2261
2262
2263
2264
2265
2266
2267
2268
2269
2270
2271
2272
2273
2274
2275
2276
2277
2278
2279
2280
2281
2282
2283
2284
2285
2286
2287
2288
2289
2290
2291
2292
2293
2294
2295
2296
2297
2298
2299
2300

2301
2302
2303
2304
2305
2306
2307
2308
2309
2310
2311
2312
2313
2314
2315
2316
2317
2318
2319
2320
2321
2322
2323
2324
2325
2326
2327
2328
2329
2330
2331
2332
2333
2334
2335
2336
2337
2338
2339
2340
2341
2342
2343
2344
2345
2346
2347
2348
2349
2350
2351
2352
2353
2354
2355
2356
2357
2358
2359
2360
2361
2362
2363
2364
2365
2366
2367
2368
2369
2370
2371
2372
2373
2374
2375
2376
2377
2378
2379
2380
2381
2382
2383
2384
2385
2386
2387
2388
2389
2390
2391
2392
2393
2394
2395
2396
2397
2398
2399
2400

fragmentów nie znaleziono. Spośród genów, w których występują poszukiwane sekwencje wyróżnić można geny kodujące: białka receptorowe, białka transporterowe, kinazy, czy też tworzące kanały jonowe (potasowe, wapniowe, sodowy). Zidentyfikowano również geny białek uczestniczących w procesie ubikwitynylacji czy też posiadające motywy palca cynkowego. Stwierdzono ponadto, że sekwencje niektórych aptamerów występują wielokrotnie w transkryptomie człowieka, np.: 15.65 – 10 razy, 15.31 – 12 razy, 15.69 – 13 razy, 10.19 – 15 razy, 13.9 – 24 razy, 15.14 – 28 razy. Bardzo ciekawe są także wyniki wskazujące na istnienie wielokrotnych powtórzeń danej sekwencji w konkretnym genie. Dla ATD10.11 (ATD10.13) znaleziono dwie sekwencje siedemnastonukleotydowe w intronach 13. i 14. genu NEK11 (ang. *NIMA (Never In Mitosis Gene A)- Related Kinase 11*). Podobnie dla ATD10.34 – 16 nukleotydów sekwencji losowej występuje dwukrotnie w obrębie intronów 4. i 5. genu kodującego białko ZNF533 (ang. *Zinc Finger Protein 533*). Fragmenty sekwencji losowej długości 18. nukleotydów (z jednym niesparowaniem) aptameru ATD13.9 zidentyfikowano sześć razy w obrębie genu kodującego białko plaça cynkowego ZGPAT (ang. *Zinc Finger, CCCH-Type With G Patch Domain*). Aż siedem razy w obrębie genu SLC9A3 (ang. *Solute Carrier Family 9 (Sodium/Hydrogen Exchanger), Member 3*) kodującego białko transporterowe, występuje fragment sekwencji losowej (od 16. do 20. nukleotydów) aptameru ATD15.69. Nie stwierdzono, by istniały proste związki pomiędzy białkami zakodowanymi w genach, a ewentualnymi właściwościami regulatorowymi kodujących je transkryptów.

Pośród sekwencji losowych aptamerów zidentyfikowanych w transkryptomie człowieka 84,3% znajduje się w intronach, 14,1% w eksonach, a 1,6% w rejonach międzygenowych. Introny stanowią około 30% genomu i aż 80% pre-mRNA człowieka i mogą być głównym źródłem srRNA produkowanych równolegle z białkami [161, 162]. Wykazano, że niemal wszystkie snoRNA i znaczna część miRNA jest zakodowana w intronach, zarówno w sekwencjach kodujących, jak i niekodujących białka [76-79]. Wcześniej sądzono, że introny po wycięciu z pierwotnych transkryptów ulegają degradacji. Obecnie wiadomo już, że mogą być cięte do krótszych cząsteczek dsRNA o znaczącym okresie półtrwania w organizmie i specyficznych subkomórkowych lokalizacjach [163, 164]. Stwierdzono ponadto, że ilość intronów rośnie wraz ze wzrostem złożoności organizmów [162], a także, że wiele konserwatywnych i ultrakonserwatywnych sekwencji znajdowanych jest w intronach [165]. Do tej pory nie określono jednak jaka część informacji zawartej w intronach ulega przekształceniu do srRNA. Problem ten wydaje się jednak bardzo interesujący i sądzę, iż wymaga dalszych pogłębionych badań.



6. PODSUMOWANIE

Podstawowym celem podjętych badań było znalezienie aptametów RNA inhibujących aktywność nukleazową HIV-1 RT oraz Dicer i stwierdzenie, czy wyselekcjonowane cząsteczki mogą być obecne w transkryptomie człowieka. Najistotniejsze rezultaty przeprowadzonych prac oraz wypływające z nich wnioski przedstawione zostały poniżej.

1. W wyniku przeprowadzenia selekcji aptamerów RNA wobec odwrotnej transkryptazy wirusa HIV-1 uzyskano tylko jeden aptamer ATH1.
2. Szczegółowe badania uzyskanego aptameru i jego zmodyfikowanych wariantów pozwoliły stwierdzić, że:
 - ATH1.1 redukował aktywność nukleazową HIV-1 RT o 82% przy stosunku molowym aptamer : enzym 50:1, wartość IC_{50} dla tego aptameru wynosiła 8 μ M.
 - ATH1.2 redukował aktywność nukleazową HIV-1 RT o 32% przy stosunku molowym aptamer : enzym 50:1.
 - ATH1 redukował aktywność nukleazową HIV-1 RT o 15% przy stosunku molowym aptamer : enzym 50:1.
 - w zastosowanym układzie badawczym, zidentyfikowany przez innych badaczy aptamer MD16 redukował aktywność nukleazową HIV-1 RT o 17%, przy stosunku molowym aptamer : enzym 50:1. We wcześniejszych badaniach wykazano, że MD16 efektywnie inhibował aktywność nukleazową HIV-1 RT ($IC_{50} = 7,8 \times 10^{-6}$ M). Tym samym stwierdzono, że krótkie cząsteczki RNA mogą w różny sposób wpływać na aktywność HIV-1 RT pochodzących z różnych wariantów wirusa HIV-1.
 - żaden z przetestowanych aptamerów nie wpływał na aktywność polimerazową HIV-1 RT.
 - ATH1.1 i ATH1.2 nie wpływały na aktywność rekombinacyjną HIV-1 RT, a ATH1 i MD16 stymulowały powstawanie rekombinantów.
 - żaden z aptamerów nie wpływał na aktywności odwrotnej transkryptazy wirusa Mu-MLV ani RNazy H z *E.coli*.
3. Stwierdzono, że aptamery ATH1.1 i ATH1.2 wiązały się specyficznie z HIV-1 RT, wartość stałej dysocjacji wynosiła odpowiednio $2,4 \times 10^{-5}$ M i $2,8 \times 10^{-5}$ M.

4. Stwierdzono, że w ulegającej transkrypcji części genomu człowieka nie występują sekwencje identyczne lub prawie identyczne z sekwencjami aptamerów ATH1.1 i ATH1.2.
5. W wyniku przeprowadzenia selekcji aptamerów RNA wobec ludzkiej rybonukleazy Dicer zidentyfikowano łącznie 143 cząsteczki.
6. Analiza strukturalna pozwoliła zidentyfikować w obrębie sekwencji losowych 18 wspólnych motywów sekwencyjnych. Biorąc pod uwagę struktury drugorzędowe aptamerów, podzielono je na 3 rodziny.
7. Stwierdzono, że 4 wybrane do dalszych szczegółowych badań cząsteczki ATD15.14, ATD15.26, ATD15.52 i ATD13.6 wiązały się z rybonukleazą Dicer, dla jednej z nich – ATD13.6 wyznaczono wartość stałej dysocjacji ($K_d = 6 \times 10^{-7}$ M).
8. Wykazano, że ATD13.6 i ATD15.14 nie były substratami dla Dicer, podczas gdy ATD15.52 i ATD15.26 były trawione przez ten enzym.
9. W wyniku przeprowadzonych badań wpływu wybranych aptamerów RNA na aktywność Dicer, stwierdzono, że:
 - aptamer ATD15.14 jedynie w nieznacznym stopniu hamował trawienie substratów przez Dicer. Dla hsa-miR-210 wykazywał nieco silniejsze właściwości inhibitorowe niż dla hsa-miR-33a.
 - aptamer ATD15.26, podobnie jak ATD15.14, tylko w niewielkim stopniu redukował aktywność Dicer. Efekt inhibitorowy był zbliżony dla obu substratów.
 - ATD15.52 istotnie redukował zdolność Dicer do cięcia pre-miRNA-210. Efekt ten był najprawdopodobniej spowodowany kompetycją między hsa-miR-210, a aptamerem. Na podstawie przeprowadzonych badań wnioskować można też, że produkt cięcia pozostawał związany z enzymem. Równocześnie ATD15.52 jedynie w ograniczonym stopniu wpływał na aktywność Dicer wobec hsa-miR-33a.
 - ATD13.6 efektywnie obniżał zdolność Dicer do cięcia hsa-miR-210. Wykazano ponadto, że efekt ten utrzymywał się podczas wielogodzinnej inkubacji. W przypadku zastosowania hsa-miR-33a, jako substratu Dicer, efekt inhibitorowy był znacznie słabszy.
10. Wykazano, że ludzkie pre-mikroRNA wykazują różne powinowactwo wobec Dicer - hsa-miR-210 był efektywniej cięty niż hsa-miR-33a.



11. W przypadku 72. aptamerów wiążących się z Dicer stwierdzono, że co najmniej szesnastonukleotydowe fragmenty ich sekwencji losowej występują w transkrypcie człowieka. 84,3% zidentyfikowanych sekwencji ulokowanych jest w intronach, 14,1% w eksonach, a 1,6% w rejonach międzygenowych. Dla 48. aptamerów sekwencji takich nie znaleziono.



7. WYKAZ TABEL

Tabela 1. Wykorzystywane w badaniach oligonukleotydy DNA	38
Tabela 2. Wykorzystywane w badaniach oligorybonukleotydy.....	39
Tabela 3. Skład typowej reakcji PCR.....	49
Tabela 4. Warunki reakcji PCR.....	49
Tabela 5. Skład mieszaniny do reakcji transkrypcji	49
Tabela 6. Radioizotopowe znakowanie ssRNA - skład mieszaniny reakcyjnej.....	50
Tabela 7. Reakcja wiązania RNA z białkami - skład mieszaniny.....	51
Tabela 8. Odwrotnej transkrypcji - skład mieszaniny reakcyjnej.....	52
Tabela 9. Przygotowanie żeli poliakryloamidowych.....	52
Tabela 10. Trawienie dsDNA enzymami restrykcyjnymi - skład mieszaniny reakcyjnej.....	53
Tabela 11. Ligacja - skład mieszaniny reakcyjnej.....	54
Tabela 12. Reakcja sekwencjonowania - skład mieszaniny reakcyjnej.....	54
Tabela 13. Warunki reakcji sekwencjonowania plazmidów.....	55
Tabela 14. Określanie stałej dysocjacji kompleksów RNA-białko - skład mieszaniny.....	55
Tabela 15. Testowanie aktywności nukleazowej - preinkubacja aptamerów z HIV-1 RT.....	57
Tabela 16. Testowanie aktywności polimerazowej - preinkubacja aptamerów z HIV-1 RT.....	58
Tabela 17. Testowanie wpływu aptamerów na aktywność rekombinacyjną HIV-1 RT - przygotowanie substratów.....	59
Tabela 18. Testowanie wpływu aptamerów na aktywność rekombinacyjną HIV-1 RT - preinkubacja aptamerów z HIV-1 RT.....	59
Tabela 19. Cięcie aptamerów przez Dicer - skład mieszaniny.....	60
Tabela 20. Testowanie wpływu aptamerów na aktywność Dicer - skład mieszaniny.....	61
Tabela 21. Wyniki analizy transkryptomu człowieka pod kątem wyselekcjonowanych wobec Dicer sekwencji losowych cząsteczek ATD13.6, ATD15.14, ATD15.26 i ATD15.52...114	
Tabela 22 Wyniki analizy transkryptomu człowieka pod kątem wyselekcjonowanych wobec Dicer cząsteczek.....	140

Table 1. ...

Table 2. ...

Table 3. ...

Table 4. ...

Table 5. ...

Table 6. ...

Table 7. ...

Table 8. ...

Table 9. ...

Table 10. ...

Table 11. ...

Table 12. ...

Table 13. ...

Table 14. ...

Table 15. ...

Table 16. ...

Table 17. ...

Table 18. ...

Table 19. ...

Table 20. ...

Table 21. ...

Table 22. ...

Table 23. ...

Table 24. ...

Table 25. ...

Table 26. ...

Table 27. ...

Table 28. ...

Table 29. ...

Table 30. ...

Table 31. ...

Table 32. ...

Table 33. ...

Table 34. ...

Table 35. ...

Table 36. ...

Table 37. ...

Table 38. ...

Table 39. ...

Table 40. ...

Table 41. ...

Table 42. ...

Table 43. ...

Table 44. ...

Table 45. ...

Table 46. ...

Table 47. ...

Table 48. ...

Table 49. ...

Table 50. ...

Table 51. ...

Table 52. ...

Table 53. ...

Table 54. ...

Table 55. ...

Table 56. ...

Table 57. ...

Table 58. ...

Table 59. ...

Table 60. ...

Table 61. ...

Table 62. ...

Table 63. ...

Table 64. ...

Table 65. ...

Table 66. ...

Table 67. ...

Table 68. ...

Table 69. ...

Table 70. ...

Table 71. ...

Table 72. ...

Table 73. ...

Table 74. ...

Table 75. ...

Table 76. ...

Table 77. ...

Table 78. ...

Table 79. ...

Table 80. ...

Table 81. ...

Table 82. ...

Table 83. ...

Table 84. ...

Table 85. ...

Table 86. ...

Table 87. ...

Table 88. ...

Table 89. ...

Table 90. ...

Table 91. ...

Table 92. ...

Table 93. ...

Table 94. ...

Table 95. ...

Table 96. ...

Table 97. ...

Table 98. ...

Table 99. ...

Table 100. ...

8. WYKAZ WYKRESÓW

Wykres 1. Analiza wzbogacania sekwencji RNA w kolejnych cyklach selekcji wobec HIV-1 RT.....	68
Wykres 2. Wpływ aptamerów na aktywność nukleazową HIV-1 RT.....	73
Wykres 3. Wpływ aptamerów na aktywność rekombinacyjną HIV-1 RT.....	77
Wykres 4. Wpływ aptamerów na aktywność nukleazową Mu-MLV RT.....	79
Wykres 5. Wiązanie ATH1.1 przez HIV-1 RT.....	82
Wykres 6. Wiązanie ATH1.2 przez HIV-1 RT.....	82
Wykres 7. Analiza wzbogacania puli RNA w cząsteczki wiążące Dicer w kolejnych cyklach selekcji.....	91
Wykres 8. Wpływ ATD15.14 na zdolność Dicer do trawienia hsa-miR33a oraz hsa-miR210.....	102
Wykres 9. Wpływ ATD15.26 na zdolność Dicer do cięcia jest hsa-miR33a i hsa-miR210.	103
Wykres 10. Wpływ ATD15.52 na zdolność Dicer do trawienia hsa-miR-33a i hsa-miR-210.....	104
Wykres 11. Wpływ ATD13.6 na zdolność Dicer do cięcia hsa-miR-33a i hsa-miR-210.	105
Wykres 12. Zależność pomiędzy stężeniem Dicer a wyrażonym w procentach stopniem związania aptameru ATD13.6.....	107
Wykres 13. Wpływ aptamerów ATD15.52 i ATD13.6 na zdolność Dicer do cięcia hsa-miR-210 przy pięciokrotnym (A) i dziesięciokrotnym (B) nadmiarze aptameru.....	111
Wykres 14. Wpływ hsa-miR-33a na zdolność Dicer do trawienia hsa-miR-210 i hsa-miR-210 na zdolność Dicer do trawienia hsa-miR-33a.....	112

Walter J. ...

Walter J. ...

Walter J. ...

Walter J. ...

Walter J. ...

Walter J. ...

Walter J. ...

Walter J. ...

Walter J. ...

Walter J. ...

Walter J. ...

Walter J. ...

Walter J. ...

Walter J. ...

Walter J. ...

Walter J. ...

Walter J. ...

Walter J. ...

Walter J. ...

Walter J. ...

Walter J. ...

Walter J. ...

Walter J. ...

Walter J. ...

Walter J. ...

Walter J. ...

Walter J. ...

Walter J. ...

Walter J. ...

9. WYKAZ RYSUNKÓW

Rysunek 1. Kwasy rybonukleinowe i ich funkcje.	6
Rysunek 2. Wyciszenie ekspresji genów za pomocą RNA.	13
Rysunek 3. Proces odwrotnej transkrypcji wirusa HIV-1.	20
Rysunek 4. Schematyczne przedstawienie budowy HIV-1 RT.	21
Rysunek 5. Struktura krystaliczna odwrotnej transkryptazy wirusa HIV-1.	22
Rysunek 6. Triada katalityczna HIV-1 RT.	23
Rysunek 7. Struktura krystaliczna domeny RNazy H odwrotnej transkryptazy wirusa HIV-1.	24
Rysunek 8. Struktura krystaliczna rybonukleazy Dicer pochodzącej z <i>G. intestinalis</i>	27
Rysunek 9. Domeny rybonukleazy Dicer ludzkiej (A) i pochodzącej z <i>G. Intestinalis</i> (B).	28
Rysunek 10. Model działania rybonukleazy Dicer.	30
Rysunek 11. Mechanizm przekazywania aktywnej nici srRNA do kompleksu RISC.	32
Rysunek 12. Schematyczne przedstawienie metody SELEX.	34
Rysunek 13. Schemat oczyszczania HIV-1 RT metodą chromatografii powinowactwa.	64
Rysunek 14. Analiza preparatów białkowych otrzymanych na poszczególnych etapach izolacji i oczyszczania HIV-1 RT.	65
Rysunek 15. Biblioteka kombinatoryczna i startery wykorzystane do selekcji aptamerów wiążących HIV-1 RT.	66
Rysunek 16. Analiza produktów reakcji PCR po 2 (A) i 5 (B) cyklu selekcji wobec HIV-1 RT.	69
Rysunek 17. Przewidywana struktura drugorzędowa aptameru ATH1.	70
Rysunek 18. Przewidywane struktury drugorzędowe aptameru MD16 oraz ATH1 i jego dwóch skróconych wersji – ATH 1.1 i 1.2.	71
Rysunek 19. Wpływ aptamerów na aktywność nukleazową HIV-1 RT.	72
Rysunek 20. Wpływ aptamerów na aktywność polimerazową HIV-1 RT na matrycy RNA (A) i DNA (B).	75
Rysunek 21. Schematyczny opis procesu rekombinacji.	76
Rysunek 22. Wpływ aptamerów na aktywność rekombinacyjną HIV-1 RT.	77
Rysunek 23. Wpływ aptamerów na aktywność nukleazową Mu-MLV RT.	78
Rysunek 24. Wpływ aptamerów na aktywność RNazy H pochodzącej z <i>E. Coli</i>	79
Rysunek 25. Określenie stałej dysocjacji kompleksu HIV-1 RT:aptamer.	81
Rysunek 26. Biblioteka kombinatoryczna i startery wykorzystane do selekcji aptamerów wiążących Dicer.	89
Rysunek 27. Analiza produktów reakcji RT-PCR po 5 cyklu selekcji wobec Dicer.	91
Rysunek 28. Sekwencje losowe uzyskane po 10 cyklu selekcji wobec Dicer.	92
Rysunek 29. Sekwencje losowe uzyskane po 13 cyklu selekcji wobec Dicer.	92
Rysunek 30. Sekwencje losowe uzyskane po 15 cyklu selekcji wobec Dicer.	93
Rysunek 31. Struktury drugorzędowe aptamerów z zaznaczonym na niebiesko motywem CCGUCC.	95
Rysunek 32. Struktura pierwszorzędowa (A) i drugorzędowa (B) aptameru ATD13.6.	96
Rysunek 33. Struktura pierwszorzędowa (A) i drugorzędowa (B) aptameru ATD15.14.	97
Rysunek 34. Struktura pierwszorzędowa (A) i drugorzędowa (B) aptameru ATD15.26.	97
Rysunek 35. Struktura pierwszorzędowa (A) i drugorzędowa (B) aptameru ATD15.52.	98
Rysunek 36. Kompleksy tworzone przez aptamery i Dicer.	99
Rysunek 37. Trawienie aptamerów ATD15.52 (A), ATD13.6 (B), ATD15.14 (C) i ATD15.26 (D) rybonukleazą Dicer.	100
Rysunek 38. Struktura drugorzędowa hsa-miR-33a (A) i hsa-miR-210 (B).	101
Rysunek 39. Wpływ ATD15.14 na zdolność Dicer do cięcia hsa-miR33a (A) i hsa-miR210 (B).	101



Rysunek 40. Wpływ ATD15.26 na zdolność Dicer do trawienia hsa-miR33a (A) oraz hsa-miR210 (B).....	102
Rysunek 41. Wpływ ATD15.52 na zdolność Dicer do cięcia hsa-miR33a (A) i hsa-miR210 (B).....	103
Rysunek 42. Wpływ ATD13.6 na zdolność Dicer do cięcia hsa-miR33a (A) i hsa-miR210 (B).....	105
Rysunek 43. Określenie stałej dysocjacji kompleksu Dicer/ATD13.6.....	106
Rysunek 44. Hydroliza hsa-miR-210 w obecności stukrotnego nadmiaru ATD15.52 (A) w porównaniu z reakcją kontrolną bez dodatku aptameru (B).....	108
Rysunek 45. Hydroliza hsa-miR-210 w obecności stukrotnego nadmiaru ATD13.6 (A) w porównaniu z reakcją kontrolną (B).....	109
Rysunek 46. Hydroliza hsa-miR-210 w obecności ATD15.52 (A) i ATD13.6 (B).....	110
Rysunek 47. Wpływ hsa-miR-33a na zdolność Dicer do trawienia hsa-miR-210 (A) i hsa-miR-210 na zdolność Dicer do trawienia hsa-miR-33a (B).....	112

Round 10: ...
Round 11: ...
Round 12: ...
Round 13: ...
Round 14: ...
Round 15: ...
Round 16: ...
Round 17: ...
Round 18: ...
Round 19: ...
Round 20: ...

10. LITERATURA

1. Mattick, J.S. and I.V. Makunin, *Non-coding RNA*. Hum Mol Genet, 2006. **15 Spec No 1**: p. R17-29.
2. Mattick, J.S., *Non-coding RNAs: the architects of eukaryotic complexity*. EMBO Rep, 2001. **2**(11): p. 986-91.
3. Venter, J.C., et al., *The sequence of the human genome*. Science, 2001. **291**(5507): p. 1304-51.
4. Lander, E.S., et al., *Initial sequencing and analysis of the human genome*. Nature, 2001. **409**(6822): p. 860-921.
5. Ashe, H.L., et al., *Intergenic transcription and transinduction of the human beta-globin locus*. Genes Dev, 1997. **11**(19): p. 2494-509.
6. Wroe, S.F., et al., *An imprinted transcript, antisense to Nesp, adds complexity to the cluster of imprinted genes at the mouse Gnas locus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(7): p. 3342-6.
7. Lau, N.C., et al., *An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in Caenorhabditis elegans*. Science, 2001. **294**(5543): p. 858-62.
8. Lagos-Quintana, M., et al., *Identification of tissue-specific microRNAs from mouse*. Curr Biol, 2002. **12**(9): p. 735-9.
9. Kapranov, P., et al., *Large-scale transcriptional activity in chromosomes 21 and 22*. Science, 2002. **296**(5569): p. 916-9.
10. Okazaki, Y., et al., *Analysis of the mouse transcriptome based on functional annotation of 60,770 full-length cDNAs*. Nature, 2002. **420**(6915): p. 563-73.
11. Carninci, P., et al., *The transcriptional landscape of the mammalian genome*. Science, 2005. **309**(5740): p. 1559-63.
12. Mattick, J.S., *Challenging the dogma: the hidden layer of non-protein-coding RNAs in complex organisms*. Bioessays, 2003. **25**(10): p. 930-9.
13. Mattick, J.S. and I.V. Makunin, *Small regulatory RNAs in mammals*. Hum Mol Genet, 2005. **14 Spec No 1**: p. R121-32.
14. Szymanski, M. and J. Barciszewski, *Regulatory RNAs in mammals*. Handb Exp Pharmacol, 2006(173): p. 45-72.
15. Olivera, A., et al., *Sphingosine kinase expression increases intracellular sphingosine-1-phosphate and promotes cell growth and survival*. J Cell Biol, 1999. **147**(3): p. 545-58.
16. Imamura, T., et al., *Non-coding RNA directed DNA demethylation of Sphk1 CpG island*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **322**(2): p. 593-600.
17. Heard, E., *Recent advances in X-chromosome inactivation*. Curr Opin Cell Biol, 2004. **16**(3): p. 247-55.
18. Chureau, C., et al., *Comparative sequence analysis of the X-inactivation center region in mouse, human, and bovine*. Genome Res, 2002. **12**(6): p. 894-908.
19. Plath, K., et al., *Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation*. Science, 2003. **300**(5616): p. 131-5.
20. Shibata, S. and J.T. Lee, *Tsix transcription- versus RNA-based mechanisms in Xist repression and epigenetic choice*. Curr Biol, 2004. **14**(19): p. 1747-54.
21. Sleutels, F., R. Zwart, and D.P. Barlow, *The non-coding Air RNA is required for silencing autosomal imprinted genes*. Nature, 2002. **415**(6873): p. 810-3.
22. Sleutels, F., et al., *Imprinted silencing of Slc22a2 and Slc22a3 does not need transcriptional overlap between Igf2r and Air*. EMBO J, 2003. **22**(14): p. 3696-704.
23. Kloc, M., G. Spohr, and L.D. Etkin, *Translocation of repetitive RNA sequences with the germ plasm in Xenopus oocytes*. Science, 1993. **262**(5140): p. 1712-4.

1	Introduction
2	Chapter I
3	Chapter II
4	Chapter III
5	Chapter IV
6	Chapter V
7	Chapter VI
8	Chapter VII
9	Chapter VIII
10	Chapter IX
11	Chapter X
12	Chapter XI
13	Chapter XII
14	Chapter XIII
15	Chapter XIV
16	Chapter XV
17	Chapter XVI
18	Chapter XVII
19	Chapter XVIII
20	Chapter XIX
21	Chapter XX
22	Chapter XXI
23	Chapter XXII
24	Chapter XXIII
25	Chapter XXIV
26	Chapter XXV
27	Chapter XXVI
28	Chapter XXVII
29	Chapter XXVIII
30	Chapter XXIX
31	Chapter XXX
32	Chapter XXXI
33	Chapter XXXII
34	Chapter XXXIII
35	Chapter XXXIV
36	Chapter XXXV
37	Chapter XXXVI
38	Chapter XXXVII
39	Chapter XXXVIII
40	Chapter XXXIX
41	Chapter XL
42	Chapter XLI
43	Chapter XLII
44	Chapter XLIII
45	Chapter XLIV
46	Chapter XLV
47	Chapter XLVI
48	Chapter XLVII
49	Chapter XLVIII
50	Chapter XLIX
51	Chapter L
52	Chapter LI
53	Chapter LII
54	Chapter LIII
55	Chapter LIV
56	Chapter LV
57	Chapter LVI
58	Chapter LVII
59	Chapter LVIII
60	Chapter LIX
61	Chapter LX
62	Chapter LXI
63	Chapter LXII
64	Chapter LXIII
65	Chapter LXIV
66	Chapter LXV
67	Chapter LXVI
68	Chapter LXVII
69	Chapter LXVIII
70	Chapter LXIX
71	Chapter LXX
72	Chapter LXXI
73	Chapter LXXII
74	Chapter LXXIII
75	Chapter LXXIV
76	Chapter LXXV
77	Chapter LXXVI
78	Chapter LXXVII
79	Chapter LXXVIII
80	Chapter LXXIX
81	Chapter LXXX
82	Chapter LXXXI
83	Chapter LXXXII
84	Chapter LXXXIII
85	Chapter LXXXIV
86	Chapter LXXXV
87	Chapter LXXXVI
88	Chapter LXXXVII
89	Chapter LXXXVIII
90	Chapter LXXXIX
91	Chapter LXXXX
92	Chapter LXXXXI
93	Chapter LXXXXII
94	Chapter LXXXXIII
95	Chapter LXXXXIV
96	Chapter LXXXXV
97	Chapter LXXXXVI
98	Chapter LXXXXVII
99	Chapter LXXXXVIII
100	Chapter LXXXXIX
101	Chapter LXXXXX

24. Khanam, T., et al., *Two primate-specific small non-protein-coding RNAs in transgenic mice: neuronal expression, subcellular localization and binding partners*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(2): p. 529-39.
25. Dahm, R., M. Kiebler, and P. Macchi, *RNA localisation in the nervous system*. Semin Cell Dev Biol, 2007. **18**(2): p. 216-23.
26. Ohashi, S., et al., *The single-stranded DNA- and RNA-binding proteins *pur alpha* and *pur beta* link BCI RNA to microtubules through binding to the dendrite-targeting RNA motifs*. J Neurochem, 2000. **75**(5): p. 1781-90.
27. Muramatsu, T., A. Ohmae, and K. Anzai, *BCI RNA protein particles in mouse brain contain two *y,h*-element-binding proteins, *translin* and a 37 kDa protein*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **247**(1): p. 7-11.
28. Cao, X., et al., *Noncoding RNAs in the Mammalian Central Nervous System*. Annu Rev Neurosci, 2006.
29. Majdalani, N., et al., *DsrA RNA regulates translation of RpoS message by an anti-antisense mechanism, independent of its action as an antisilencer of transcription*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(21): p. 12462-7.
30. Rolle, K., et al., *Evaluation of the dynamic structure of DsrA RNA from E. coli and its functional consequences*. J Biochem (Tokyo), 2006. **139**(3): p. 431-8.
31. Sledjeski, D.D., C. Whitman, and A. Zhang, *Hfq is necessary for regulation by the untranslated RNA DsrA*. J Bacteriol, 2001. **183**(6): p. 1997-2005.
32. Delihias, N. and S. Forst, *MicF: an antisense RNA gene involved in response of Escherichia coli to global stress factors*. J Mol Biol, 2001. **313**(1): p. 1-12.
33. Lanz, R.B., et al., *A steroid receptor coactivator, SRA, functions as an RNA and is present in an SRC-1 complex*. Cell, 1999. **97**(1): p. 17-27.
34. Lanz, R.B., et al., *Distinct RNA motifs are important for coactivation of steroid hormone receptors by steroid receptor RNA activator (SRA)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(25): p. 16081-6.
35. Watanabe, M., et al., *A subfamily of RNA-binding DEAD-box proteins acts as an estrogen receptor alpha coactivator through the N-terminal activation domain (AF-1) with an RNA coactivator, SRA*. EMBO J, 2001. **20**(6): p. 1341-52.
36. Shi, Y., et al., *Sharp, an inducible cofactor that integrates nuclear receptor repression and activation*. Genes Dev, 2001. **15**(9): p. 1140-51.
37. Barrick, J.E., et al., *6S RNA is a widespread regulator of eubacterial RNA polymerase that resembles an open promoter*. RNA, 2005. **11**(5): p. 774-84.
38. Trotochaud, A.E. and K.M. Wassarman, *A highly conserved 6S RNA structure is required for regulation of transcription*. Nat Struct Mol Biol, 2005. **12**(4): p. 313-9.
39. Fire, A., et al., *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans*. Nature, 1998. **391**(6669): p. 806-11.
40. Napoli, C., C. Lemieux, and R. Jorgensen, *Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans*. Plant Cell, 1990. **2**(4): p. 279-289.
41. Dernburg, A.F., et al., *Transgene-mediated cosuppression in the C. elegans germ line*. Genes Dev, 2000. **14**(13): p. 1578-83.
42. Pal-Bhadra, M., U. Bhadra, and J.A. Birchler, *Cosuppression in Drosophila: gene silencing of Alcohol dehydrogenase by white-Adh transgenes is Polycomb dependent*. Cell, 1997. **90**(3): p. 479-90.
43. Dougherty, W.G., et al., *RNA-mediated virus resistance in transgenic plants: exploitation of a cellular pathway possibly involved in RNA degradation*. Mol Plant Microbe Interact, 1994. **7**(5): p. 544-52.

44. Kumagai, M.H., et al., *Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(5): p. 1679-83.
45. Angell, S.M. and D.C. Baulcombe, *Consistent gene silencing in transgenic plants expressing a replicating potato virus X RNA*. EMBO J, 1997. **16**(12): p. 3675-84.
46. Hamilton, A.J. and D.C. Baulcombe, *A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants*. Science, 1999. **286**(5441): p. 950-2.
47. Hammond, S.M., et al., *An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells*. Nature, 2000. **404**(6775): p. 293-6.
48. Nykanen, A., B. Haley, and P.D. Zamore, *ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway*. Cell, 2001. **107**(3): p. 309-21.
49. Martinez, J., et al., *Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi*. Cell, 2002. **110**(5): p. 563-74.
50. Schwarz, D.S., et al., *Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex*. Cell, 2003. **115**(2): p. 199-208.
51. Elbashir, S.M., W. Lendeckel, and T. Tuschl, *RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs*. Genes Dev, 2001. **15**(2): p. 188-200.
52. Haley, B. and P.D. Zamore, *Kinetic analysis of the RNAi enzyme complex*. Nat Struct Mol Biol, 2004. **11**(7): p. 599-606.
53. Martinez, J. and T. Tuschl, *RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease*. Genes Dev, 2004. **18**(9): p. 975-80.
54. Zamore, P.D., et al., *RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals*. Cell, 2000. **101**(1): p. 25-33.
55. Rivas, F.V., et al., *Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC*. Nat Struct Mol Biol, 2005. **12**(4): p. 340-9.
56. Orban, T.I. and E. Izaurralde, *Decay of mRNAs targeted by RISC requires XRN1, the Ski complex, and the exosome*. RNA, 2005. **11**(4): p. 459-69.
57. Shen, B. and H.M. Goodman, *Uridine addition after microRNA-directed cleavage*. Science, 2004. **306**(5698): p. 997.
58. Olsen, P.H. and V. Ambros, *The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in Caenorhabditis elegans by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation*. Dev Biol, 1999. **216**(2): p. 671-80.
59. Doench, J.G., C.P. Petersen, and P.A. Sharp, *siRNAs can function as miRNAs*. Genes Dev, 2003. **17**(4): p. 438-42.
60. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. Cell, 2004. **116**(2): p. 281-97.
61. Liu, J., et al., *MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(7): p. 719-23.
62. Sen, G.L. and H.M. Blau, *Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(6): p. 633-6.
63. Aravin, A. and T. Tuschl, *Identification and characterization of small RNAs involved in RNA silencing*. FEBS Lett, 2005. **579**(26): p. 5830-40.
64. Nakahara, K. and R.W. Carthew, *Expanding roles for miRNAs and siRNAs in cell regulation*. Curr Opin Cell Biol, 2004. **16**(2): p. 127-33.
65. Nishikura, K., *A short primer on RNAi: RNA-directed RNA polymerase acts as a key catalyst*. Cell, 2001. **107**(4): p. 415-8.
66. McManus, M.T., *Small RNAs and immunity*. Immunity, 2004. **21**(6): p. 747-56.
67. Chan, S.W., et al., *Two-step recruitment of RNA-directed DNA methylation to tandem repeats*. PLoS Biol, 2006. **4**(11): p. e363.

44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67

68. Sugiyama, T., et al., *RNA-dependent RNA polymerase is an essential component of a self-enforcing loop coupling heterochromatin assembly to siRNA production*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(1): p. 152-7.
69. Allen, E., et al., *microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants*. Cell, 2005. **121**(2): p. 207-21.
70. Yoshikawa, M., et al., *A pathway for the biogenesis of trans-acting siRNAs in Arabidopsis*. Genes Dev, 2005. **19**(18): p. 2164-75.
71. Vagin, V.V., et al., *A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline*. Science, 2006. **313**(5785): p. 320-4.
72. Zilberman, D., X. Cao, and S.E. Jacobsen, *ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation*. Science, 2003. **299**(5607): p. 716-9.
73. Ambros, V., et al., *MicroRNAs and other tiny endogenous RNAs in C. elegans*. Curr Biol, 2003. **13**(10): p. 807-18.
74. Lee, Y., et al., *MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II*. EMBO J, 2004. **23**(20): p. 4051-60.
75. Murchison, E.P. and G.J. Hannon, *miRNAs on the move: miRNA biogenesis and the RNAi machinery*. Curr Opin Cell Biol, 2004. **16**(3): p. 223-9.
76. Rodriguez, A., et al., *Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units*. Genome Res, 2004. **14**(10A): p. 1902-10.
77. Cai, X., C.H. Hagedorn, and B.R. Cullen, *Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs*. RNA, 2004. **10**(12): p. 1957-66.
78. Baskerville, S. and D.P. Bartel, *Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes*. Rna, 2005. **11**(3): p. 241-7.
79. Ying, S.Y. and S.L. Lin, *Intronic microRNAs*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **326**(3): p. 515-20.
80. Wienholds, E., et al., *MicroRNA expression in zebrafish embryonic development*. Science, 2005. **309**(5732): p. 310-1.
81. Smalheiser, N.R. and V.I. Torvik, *Mammalian microRNAs derived from genomic repeats*. Trends Genet, 2005. **21**(6): p. 322-6.
82. Devor, E.J., *Primate microRNAs miR-220 and miR-492 lie within processed pseudogenes*. J Hered, 2006. **97**(2): p. 186-90.
83. Croce, C.M. and G.A. Calin, *miRNAs, cancer, and stem cell division*. Cell, 2005. **122**(1): p. 6-7.
84. Giraldez, A.J., et al., *MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish*. Science, 2005. **308**(5723): p. 833-8.
85. Meltzer, P.S., *Cancer genomics: small RNAs with big impacts*. Nature, 2005. **435**(7043): p. 745-6.
86. O'Donnell, K.A., et al., *c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression*. Nature, 2005. **435**(7043): p. 839-43.
87. He, L., et al., *A microRNA polycistron as a potential human oncogene*. Nature, 2005. **435**(7043): p. 828-33.
88. Girard, A., et al., *A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins*. Nature, 2006. **442**(7099): p. 199-202.
89. Lau, N.C., et al., *Characterization of the piRNA complex from rat testes*. Science, 2006. **313**(5785): p. 363-7.
90. Deutscher, M.P., *Degradation of RNA in bacteria: comparison of mRNA and stable RNA*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(2): p. 659-66.

68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90

91. Doublet, S., M.R. Sawaya, and T. Ellenberger, *An open and closed case for all polymerases*. *Structure*, 1999. **7**(2): p. R31-5.
92. Hostomsky, Z., et al., *Reconstitution in vitro of RNase H activity by using purified N-terminal and C-terminal domains of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(4): p. 1148-52.
93. Le Grice, S.F., et al., *Subunit-selective mutagenesis indicates minimal polymerase activity in heterodimer-associated p51 HIV-1 reverse transcriptase*. *Embo J*, 1991. **10**(12): p. 3905-11.
94. Kohlstaedt, L.A., et al., *Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor*. *Science*, 1992. **256**(5065): p. 1783-90.
95. Jacobo-Molina, A., et al., *Crystal structure of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase complexed with double-stranded DNA at 3.0 Å resolution shows bent DNA*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(13): p. 6320-4.
96. Ollis, D.L., et al., *Structure of large fragment of Escherichia coli DNA polymerase I complexed with dTMP*. *Nature*, 1985. **313**(6005): p. 762-6.
97. Joyce, C.M., *Choosing the right sugar: how polymerases select a nucleotide substrate*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(5): p. 1619-22.
98. Rodgers, D.W., et al., *The structure of unliganded reverse transcriptase from the human immunodeficiency virus type 1*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(4): p. 1222-6.
99. Davies, J.F., 2nd, et al., *Crystal structure of the ribonuclease H domain of HIV-1 reverse transcriptase*. *Science*, 1991. **252**(5002): p. 88-95.
100. Klumpp, K., et al., *Two-metal ion mechanism of RNA cleavage by HIV RNase H and mechanism-based design of selective HIV RNase H inhibitors*. *Nucleic Acids Res*, 2003. **31**(23): p. 6852-9.
101. Rausch, J.W., et al., *Altering the RNase H primer grip of human immunodeficiency virus reverse transcriptase modifies cleavage specificity*. *Biochemistry*, 2002. **41**(15): p. 4856-65.
102. Zhang, K. and A.W. Nicholson, *Regulation of ribonuclease III processing by double-helical sequence antideterminants*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(25): p. 13437-41.
103. Lee, Y., et al., *The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing*. *Nature*, 2003. **425**(6956): p. 415-9.
104. Han, J., et al., *The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing*. *Genes Dev*, 2004. **18**(24): p. 3016-27.
105. Macrae, I.J., et al., *Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer*. *Science*, 2006. **311**(5758): p. 195-8.
106. Ma, J.B., K. Ye, and D.J. Patel, *Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain*. *Nature*, 2004. **429**(6989): p. 318-22.
107. Tahbaz, N., et al., *Characterization of the interactions between mammalian PAZ PIWI domain proteins and Dicer*. *EMBO Rep*, 2004. **5**(2): p. 189-94.
108. Bernstein, E., et al., *Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference*. *Nature*, 2001. **409**(6818): p. 363-6.
109. Hammond, S.M., et al., *Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi*. *Science*, 2001. **293**(5532): p. 1146-50.
110. Baulcombe, D., *RNA silencing. Diced defence*. *Nature*, 2001. **409**(6818): p. 295-6.
111. Filippov, V., et al., *A novel type of RNase III family proteins in eukaryotes*. *Gene*, 2000. **245**(1): p. 213-21.

112. Nicholson, R.H. and A.W. Nicholson, *Molecular characterization of a mouse cDNA encoding Dicer, a ribonuclease III ortholog involved in RNA interference*. Mamm Genome, 2002. **13**(2): p. 67-73.
113. Pause, A. and N. Sonenberg, *Mutational analysis of a DEAD box RNA helicase: the mammalian translation initiation factor eIF-4A*. EMBO J, 1992. **11**(7): p. 2643-54.
114. Macrae, I.J., et al., *Structure of Dicer and Mechanistic Implications for RNAi*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2006. **71**: p. 73-80.
115. Zhang, H., et al., *Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP*. EMBO J, 2002. **21**(21): p. 5875-85.
116. Pellino, J.L., et al., *ATP modulates siRNA interactions with an endogenous human Dicer complex*. RNA, 2005. **11**(11): p. 1719-24.
117. Billy, E., et al., *Specific interference with gene expression induced by long, double-stranded RNA in mouse embryonal teratocarcinoma cell lines*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(25): p. 14428-33.
118. Liu, Q., et al., *R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the Drosophila RNAi pathway*. Science, 2003. **301**(5641): p. 1921-5.
119. Carmell, M.A. and G.J. Hannon, *RNase III enzymes and the initiation of gene silencing*. Nat Struct Mol Biol, 2004. **11**(3): p. 214-8.
120. Zamore, P.D., *Thirty-three years later, a glimpse at the ribonuclease III active site*. Mol Cell, 2001. **8**(6): p. 1158-60.
121. Zhang, H., et al., *Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III*. Cell, 2004. **118**(1): p. 57-68.
122. MacRae, I.J., K. Zhou, and J.A. Doudna, *Structural determinants of RNA recognition and cleavage by Dicer*. Nat Struct Mol Biol, 2007. **14**(10): p. 934-40.
123. Gregory, R.I., et al., *Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing*. Cell, 2005. **123**(4): p. 631-40.
124. Chendrimada, T.P., et al., *TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing*. Nature, 2005. **436**(7051): p. 740-4.
125. Kok, K.H., et al., *Human TRBP and PACT directly interact with each other and associate with dicer to facilitate the production of small interfering RNA*. J Biol Chem, 2007. **282**(24): p. 17649-57.
126. Khvorova, A., A. Reynolds, and S.D. Jayasena, *Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias*. Cell, 2003. **115**(2): p. 209-16.
127. Meister, G., et al., *Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs*. Mol Cell, 2004. **15**(2): p. 185-97.
128. White, R.R., B.A. Sullenger, and C.P. Rusconi, *Developing aptamers into therapeutics*. J Clin Invest, 2000. **106**(8): p. 929-34.
129. Tuerk, C. and L. Gold, *Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase*. Science, 1990. **249**(4968): p. 505-10.
130. Ellington, A.D. and J.W. Szostak, *In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands*. Nature, 1990. **346**(6287): p. 818-22.
131. Ruckman, J., et al., *2'-Fluoropyrimidine RNA-based aptamers to the 165-amino acid form of vascular endothelial growth factor (VEGF165). Inhibition of receptor binding and VEGF-induced vascular permeability through interactions requiring the exon 7-encoded domain*. J Biol Chem, 1998. **273**(32): p. 20556-67.
132. Siddiqui, M.A. and G.M. Keating, *Pegaptanib: in exudative age-related macular degeneration*. Drugs, 2005. **65**(11): p. 1571-7; discussion 1578-9.
133. Cunningham, E.T., Jr., et al., *A phase II randomized double-masked trial of pegaptanib, an anti-vascular endothelial growth factor aptamer, for diabetic macular edema*. Ophthalmology, 2005. **112**(10): p. 1747-57.

134. Rusconi, C.P., et al., *RNA aptamers as reversible antagonists of coagulation factor IXa*. Nature, 2002. **419**(6902): p. 90-4.
135. Rusconi, C.P., et al., *Antidote-mediated control of an anticoagulant aptamer in vivo*. Nat Biotechnol, 2004. **22**(11): p. 1423-8.
136. Nimjee, S.M., et al., *A novel antidote-controlled anticoagulant reduces thrombin generation and inflammation and improves cardiac function in cardiopulmonary bypass surgery*. Mol Ther, 2006. **14**(3): p. 408-15.
137. Tuerk, C., S. MacDougal, and L. Gold, *RNA pseudoknots that inhibit human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(15): p. 6988-92.
138. Joshi, P. and V.R. Prasad, *Potent inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by template analog reverse transcriptase inhibitors derived by SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment)*. J Virol, 2002. **76**(13): p. 6545-57.
139. Szepeta-Wisniewska, J., E. Wyszko, and M. Barciszewska, *[The role of protein-RNA reactions during the HIV virus life cycle]*. Postepy Biochem, 2001. **47**(4): p. 272-81.
140. Khati, M., et al., *Neutralization of infectivity of diverse R5 clinical isolates of human immunodeficiency virus type 1 by gp120-binding 2'F-RNA aptamers*. J Virol, 2003. **77**(23): p. 12692-8.
141. Nishikawa, S., F. Nishikawa, and K. Fukuda, *In vitro selection of RNA aptamers against HCV-NS3 helicase and their structural similarity with 3'(+)-UTR of HCV*. Nucleic Acids Res Suppl, 2003(3): p. 241-2.
142. Hwang, B., et al., *Isolation of specific and high-affinity RNA aptamers against NS3 helicase domain of hepatitis C virus*. RNA, 2004. **10**(8): p. 1277-90.
143. Hicke, B.J., et al., *Tenascin-C aptamers are generated using tumor cells and purified protein*. J Biol Chem, 2001. **276**(52): p. 48644-54.
144. Erickson, H.P. and M.A. Bourdon, *Tenascin: an extracellular matrix protein prominent in specialized embryonic tissues and tumors*. Annu Rev Cell Biol, 1989. **5**: p. 71-92.
145. Dętkiewicz K, W.E., Rolle K, Nowak S, Żukiel L, Barciszewski J, *Rola tenascyny-C w patogenezie*. Neuroskop, 2005. **7**: p. 19-26.
146. Hicke, B.J., et al., *Tumor targeting by an aptamer*. J Nucl Med, 2006. **47**(4): p. 668-78.
147. Zuker, M., *Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(13): p. 3406-15.
148. Hannoush, R.N., et al., *Selective inhibition of HIV-1 reverse transcriptase (HIV-1 RT) RNase H by small RNA hairpins and dumbbells*. Chembiochem, 2004. **5**(4): p. 527-33.
149. Tramontano, E., *HIV-1 RNase H: recent progress in an exciting, yet little explored, drug target*. Mini Rev Med Chem, 2006. **6**(6): p. 727-37.
150. Klumpp, K. and T. Mirzadegan, *Recent progress in the design of small molecule inhibitors of HIV RNase H*. Curr Pharm Des, 2006. **12**(15): p. 1909-22.
151. Loewen, P.C. and J. Switala, *Template secondary structure can increase the error frequency of the DNA polymerase from Thermus aquaticus*. Gene, 1995. **164**(1): p. 59-63.
152. Andreola, M.L., et al., *DNA aptamers selected against the HIV-1 RNase H display in vitro antiviral activity*. Biochemistry, 2001. **40**(34): p. 10087-94.
153. Livnah, O., et al., *Three-dimensional structures of avidin and the avidin-biotin complex*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(11): p. 5076-80.
154. Johnson, R.J., et al., *Inhibition of human pancreatic ribonuclease by the human ribonuclease inhibitor protein*. J Mol Biol, 2007. **368**(2): p. 434-49.
155. Hahn, B.H., et al., *AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications*. Science, 2000. **287**(5453): p. 607-14.

134	...
135	...
136	...
137	...
138	...
139	...
140	...
141	...
142	...
143	...
144	...
145	...
146	...
147	...
148	...
149	...
150	...
151	...
152	...
153	...
154	...
155	...

156. Lecellier, C.H., et al., *A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells.* Science, 2005. **308**(5721): p. 557-60.
157. Mathews, D.H., et al., *Incorporating chemical modification constraints into a dynamic programming algorithm for prediction of RNA secondary structure.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(19): p. 7287-92.
158. Elbashir, S.M., et al., *Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells.* Nature, 2001. **411**(6836): p. 494-8.
159. Ketting, R.F., et al., *Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in C. elegans.* Genes Dev, 2001. **15**(20): p. 2654-9.
160. Doench, J.G. and P.A. Sharp, *Specificity of microRNA target selection in translational repression.* Genes Dev, 2004. **18**(5): p. 504-11.
161. Mattick, J.S. and M.J. Gagen, *The evolution of controlled multitasked gene networks: the role of introns and other noncoding RNAs in the development of complex organisms.* Mol Biol Evol, 2001. **18**(9): p. 1611-30.
162. Mattick, J.S., *Introns: evolution and function.* Curr Opin Genet Dev, 1994. **4**(6): p. 823-31.
163. Clement, J.Q., et al., *The stability and fate of a spliced intron from vertebrate cells.* RNA, 1999. **5**(2): p. 206-20.
164. Clement, J.Q., S. Maiti, and M.F. Wilkinson, *Localization and stability of introns spliced from the Pem homeobox gene.* J Biol Chem, 2001. **276**(20): p. 16919-30.
165. Bejerano, G., et al., *Ultraconserved elements in the human genome.* Science, 2004. **304**(5675): p. 1321-5.

126	Introduction
127	Chapter I
128	Chapter II
129	Chapter III
130	Chapter IV
131	Chapter V
132	Chapter VI
133	Chapter VII
134	Chapter VIII
135	Chapter IX
136	Chapter X
137	Chapter XI
138	Chapter XII
139	Chapter XIII
140	Chapter XIV
141	Chapter XV
142	Chapter XVI
143	Chapter XVII
144	Chapter XVIII
145	Chapter XIX
146	Chapter XX
147	Chapter XXI
148	Chapter XXII
149	Chapter XXIII
150	Chapter XXIV
151	Chapter XXV
152	Chapter XXVI
153	Chapter XXVII
154	Chapter XXVIII
155	Chapter XXIX
156	Chapter XXX
157	Chapter XXXI
158	Chapter XXXII
159	Chapter XXXIII
160	Chapter XXXIV
161	Chapter XXXV
162	Chapter XXXVI
163	Chapter XXXVII
164	Chapter XXXVIII
165	Chapter XXXIX
166	Chapter XL
167	Chapter XLI
168	Chapter XLII
169	Chapter XLIII
170	Chapter XLIV
171	Chapter XLV
172	Chapter XLVI
173	Chapter XLVII
174	Chapter XLVIII
175	Chapter XLIX
176	Chapter L

12. ANEKS 1

Tabela 21. Sekwencje losowe aptamerów wyselekcjonowanych wobec ludzkiej rybonukleazy Dicer z wyróżnionymi konserwatywnymi motywami.
 Sekwencje zgrupowano według występującego motywu.

ACACA	
15.8	- - - - - U C A C U A C A C A C A C U C C C C G C C C - - -
15.34	- - - - - U U A C A C A C A C A C A C U G U C C G C C G C C C
15.38	- - - - - U G U A C A C A C A C A C A C U C C C G C C C G C C C -
15.47	- U U G C A G C U C A C A C A C A C A C U G G C C C - - - - -
15.55	- - - - - C C A U U G A C A C A C A C C C U G U U G C C C - - -
10.65, 10.68, 10.69, 10.70	C G G C A A G C A C G A C A C A C A C G G C - - - - -
AGUCC	
15.17	- - - - - A G U C C A A U G U C A U G U C A U U C C G U C C
15.28	- U G C C G A C A C C A U A C C A G U C C C - - - - -
15.80	- U G C C G A C A C C A U A C C A G U C C C - - - - -
13.2	- - - - - U C U A G U C C C C G C U C C U C C U G C C C C - - -
13.9	- - - - - U G C A C A G U C C C A C C U C C U G C C U C C - - -
10.29	- - - - - C C A U A G U C C A U A C C A C C G A C C U U C - - -
10.53	- U C G A C A C C C G C U U A C A G U C C C - - - - -
10.54, 10.57	- U C G A C A C C C C C U U C C A G U C C C - - - - -
CCAAU	
15.17	- - - - - A G U C C A A U G U C A U U C C G U C C C - - - - -
15.37	- - - - - C C A A U G U C C C A U C C C G U C C C - - - - -
15.60	- - - - - C C A A U G C C A C C A C U U C C G C C U G C C C
13.11	- U A C A C U C A C C C A A U C C C C G C C C - - - - -
10.22	- - - - - G C A C C A A U C C C C A C U C G - - - - -
GCCGC	
15.3	- - - - - C C C G U U C U C C G C C C G U C C C
15.22	- C A U G C C A U C C G U C G C C C C C C - - - - -
15.24	- - U C G G A C C A U C G U C G C C C C C - - - - -
15.27	- U C C A U A G U G U G U G C C C C C C - - - - -
15.34	- - U U A C A C A U G U U G C C C G C C C - - - - -
15.36	- G A C A C G U U G A U A C C G C C C C C - - - - -
15.59	- C C C A A C C G C A C U G G C C C C C - - - - -
15.85	- U C C C A U A G U G U G C U G C C C C C - - - - -
GUCGU	
15.30, 15.52	- - - - - G C A G U G A G U C G U U G U G C C U G C C - - -
15.32	- - - - - G C G U G A G U C G U U G U U C C G U G U - - -





15.34	- - - U U A C A C A U G U U G G C C G C U G C C - - - - -
15.53	- - - - - A C C A U U G C C C G U C C U C C - - - - -
15.57	- - - - - G U - - - U G C C C G A C C U A C C A G U C C
15.80	- - - - - G U G U G C U G C C C G C C - - - - - C A G U C C
15.85	U C C C A U A G U G U G C U G C C C G C C - - - - -
13.10	- - - - - G C A A C U U G C C C G C C - - - - -
10.34	- - - - - C G C U G U G C C C G U A U C C A U G C - - - - -
ACACCC	
15.41	- - - C A U U A C U G C C A C C C C U G C C - - - - -
10.8	- - - C A A C A G C C A C C C C G C C - - - - -
10.25	U A U A C G U A C - - C A U A C C C C G - - - - - U C C
10.40	- - - - - - - U C G A C C C C G U C U A C A G U C C C
10.53	- - - - - - - U C G A C C C C G C C U U C C A G U C C C
10.54	- - - - - - - U C G A C C C C G C C U U C C A G U C C C
ACACUC	
15.7	G G G G C U A U C U C C A C A C U C C - - - - -
15.8	- - - - - U C A C U A C C A C C U C C C C C - - - - -
15.12	- - - - - C C A G C C A C C U C C C C C U C C - - - - -
15.43	- - - - - C C A U C A C C A C C C C C G C C C - - - - -
13.1	- - - - - G G A C C - - U A C C A A U G C C C - - - - -
13.11	- - - - - - - - - U A C C A C C A C C A U C C C G C C - - - - -
CGGUCC	
15.2	G C A G C C G A C U G U A C C C G U C C - - - - -
15.3	- C C G U U C U G C C A U C C C G U C C - - - - -
15.17	A G U C C A A U G U C U C C C G U C C - - - - -
15.19	C U C C U C C G U C U G U C C C G U C C - - - - -
15.25	- C C A U G U C C C U A U C C C G U C C - - - - -
15.37	U G G U C A C U C C C A C C C G U C C - - - - -
15.45	- - - - - A C C A U G C C C C U C C - - - - -
15.53	A C C A C G U C C A U C C C G U C C - - - - -
15.66	C A G C U C U C C A U C C C G U C C - - - - -
15.84	G A U U G U G C C C G A C C C G U C C - - - - -
13.8	A A U G U A C U G C C C A C C C G U C C - - - - -
10.4	- - - - - - - - - C G A C C U U A C C C C G C C - - - - -
10.6	- - - - - - - - - C G A C C U U A C C C C G C C - - - - -
GCACAC	
15.12	- - - C C A G C A C A U C C G C C U C C
15.41	C A U U A C U G C A C A C C U C C - - - - -
15.60	- - - C C A A U G C A C A C U C G C C U G C C



10.8
GCCGCC
 - - C A A C A G C A C A C C C G C C C G C C -
 - - C C C G U U C U C G C C G C C G U C C
 C A U G C C A U C G U C G C C G C C C - -
 - - U C C G G A C A U G U U G C C C C - -
 U C C C A U A G U G A U A C C G C C C - -
 - C C C A A C C G C A C U G G C C C - -
 U C C C A U A G U G U G C U G C C C - -

CCCCGCC
 15.8 U C A C U A C A C A C U C C C G C C C
 15.9 U G U G U A C G U C C C C C C G C C -
 15.10 A C C A C G U C C U C C C C C G C C -
 15.38 U G U A C A C A U C C C G C C C G C C -
 15.49 C G U G A U G U C U A U C C C C G C C -
 15.65 A G G C C A C C U C C C C C C G C C -
 15.69 - C C C A U G G U C C A C U C C C G C C
 13.10 G C A A C U U G C C C G U A C C C G C C -
 10.35 U G C C C A U U C A U U G C C C G C C -

CCUGGCC
 15.14 C G G C C U C C C C A U C C C U G C C -
 15.41 - C A U U A C U G C A C A C C C U G C C -
 13.2 - U C U A G U C C C G C U C C U G C C C

CCUUUC
 15.26, 15.68, 15.79 A C A U U G A G U G U U G C C C U U C C - - - -
 10.54, 10.57 - - - - U C G A C A C C C C C U U C C A G U C C
GUGCUGC
 15.16 - - - - U A U G G A C G U G C U G C G U A U C C
 15.27 - - - - U C C C A U A G U G U G C C U G C C - -
 15.30, 15.52 G C A G U G A G U C G U U G U G C C U G C - - - -
 15.85 - - - - U C C C A U A G U G U G C C U G C C - - - -
ACCGUCC
 13.8 G A U U G U G G C C C G A C C C G U C C
 10.4 A A U G U A C U G C C C A C C C G U C C

CACUCCCCGCC
 15.8 U C A C U A C A C A C U C C C C G
 15.69 C C C A U G G U C A C U C C C C G

12. ANEKS 2

Tabela 22 Wyniki analizy transkryptomu człowieka pod kątem wyselekcjonowanych wobec Dicer cząsteczek.

W tabeli przedstawiono fragment sekwencji losowej aptameru zidentyfikowanej w ludzkim genomie, gen, w którym dana sekwencja występuje i lokalizację na chromosomie.

¹ w nawiasie podano długość sekwencji losowej aptameru

² w nawiasie podano długość sekwencji identycznej lub prawie identycznej (zidentyfikowanej w genomie człowieka) z sekwencją losową aptameru

³ wyfuszczono jedno-, dwu- lub trzynukleotydowe różnice między sekwencją zidentyfikowaną w genomie a sekwencją losową aptameru

Nazwa aptameru	Nazwa genu, w którym zidentyfikowano fragment sekwencji losowej aptameru	Lokalizacja genu w chromosomie	Zidentyfikowany w ludzkim genomie fragment sekwencji losowej aptameru (długość, nt)
10.5 (19 nt) ¹	GRAMD1B , GRAM domain containing 1B	11q24.1 , intron	gctgctgcatacctag (16) ²
10.8 (20 nt)	KRT75 , keratine 75	12q13 , intron	caacagcacacccc-cccgc (19)
10.11 10.13 (20 nt)	NEK11 , NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 11	3q22.1 , intron 13	aataagtaaaccgctg (17)
	NEK11 , NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 11	3q22.1 , intron 14	aataagtaaaccgctg (17)
10.19 (20 nt)	SSX2 , synovial sarcoma, X breakpoint 2	Xp11.23-p11.22 , intron	ctcactgccttcttct (16)
	SIM2 , single-minded homolog 2 (Drosophila)	21q22.2; 21q22.13 , intron	gcactcactgccttct (16)
	AQR , aquarius homolog (mouse)	15q14 , intron	cactcactgccttctt (16)
	KIIAA1333	14q12 , intron	cactcactgccttctt (16)
	rejon międzygenowy	chromosom X	ctcactgccttcttct (16)
	FAM120C , family with sequence similarity 120C	Xp11.22 , intron	agcattcactgccttctt (16)
	XAGE1C , X antigen family, member 1C	Xp11.22 , intron	gcactcactgccttc (16)
	SOHLH2 , spermatogenesis and oogenesis specific basic helix-loop-helix 2	13q13.3 , intron	agcactcactgccttct (17)
	SOHLH2 , spermatogenesis and oogenesis specific basic helix-loop-helix 2	13q13.3 , intron 9	agcactcactgccttct (17)
	TNS1 , tensine 1	2q35-q36 , ekson1	cactcgctgccttcttct ³ (18)
	PLB1 , phospholipase B1	2p23.2 , intron	cactcactgccgttcttct (18)
	ASXL2 , additional sex combs like 2 (Drosophila)	2p24.1 , intron	agcactcctgccttctt (18)



	CSMD1 , CUB and Sushi multiple domains 1	8p23.2 , intron	agcattcactgccttct (18)
	MAP3K1 , mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1	5q11.2 , intron	cactcactgccttctct (18)
	ZMYM4 , zinc finger, MYM-tyr 4	1p32-p34 , intron	gcactcaggctgccttctct (21)
10.22 (20 nt)	CNTNAP2 , contactin associated protein-like 2	7q35-q36 , intron	cccaatccctccactc (16)
	SLC8A2 , solute carrier family 8 (sodium-calcium exchanger), member 2	19q13.3 , intron	ccaatccctccactcg (16)
10.24 (20 nt)	RFX3 , regulatory factor X, 3 (influences HLA class II expression)	9p24.2 , 5ss_int	tgacctcaaccgtgc (16)
	RFX3 , regulatory factor X, 3 (influences HLA class II expression)	9p24.2 , ekson	tgacctcaaccgtgc (16)
10.27 (20 nt)	FAM43B , family with sequence similarity 43, member B	1p36.12 , ekson	cagcctccaaccccg (16)
	RAP1GAP , RAP1 GTPase activating protein	1p36.1-p35 , intron	cagcctccagccccggtc (18)
	ACY1 , aminoacylase 1	3p21.1 , intron	cagcctccaaccctgctc (18)
10.29 (20 nt)	KCNMB2 , potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, β member 2	3q26.2-q27.1 , intron	catattccaccgacttcc (19)
	EAF2 , ELL associated factor 2	3q13.33 , intron	catattccaccgacttcc (19)
	AIG1 , androgen-induced 1	6q24.2 , intron	catagtccaccctgacttt (19)
10.32 (20 nt)	TTC12 , tetratricopeptide repeat domain 12	11q , intron	gccacctgcagcgagtgt (18)
	WHSC1 , Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1	4p16.3 , ekson	cacctgcagcgagtgtgc (18)
10.34 (20 nt)	ZNF533 , zinc finger protein 533	2q31.2-q31.3 , intron 5	tggtgccgatccatg (16)
	ZNF533 , zinc finger protein 533	2q31.2-q31.3 , intron 4	tggtgccgatccatg (16)
10.35 (20 nt)	HD , huntingtin (Huntington disease)	4p16.3 , ekson	cccattcattgccccg (16)
	ST18 , suppression of tumorigenicity 18 (breast carcinoma) (zinc finger protein)	8q11.23 , intron	tgccattcattgccc (16)
10.37 (20 nt)	KHDRBS2 , KH domain containing, RNA binding, signal transduction associated 2	6q11.1 , intron	tatccctcgagcccatgc (18)
10.40	LGII , leucine-rich, glioma inactivated 1	10q24 , intron	tacacactgtccgtgcc (18)



<i>(20 nt)</i>			
10.42 <i>(20 nt)</i>	BPI , bactericidal/permeability-increasing protein	20q11.23-q12 , ekson	gcagtaaccccacgtc (16)
10.54 10.57 <i>(20 nt)</i>	hypothetical LOC401180	5p13.2 , intron	gacacctcctccagtc (18)
10.63 10.66 <i>(20 nt)</i>	RERE , arginine-glutamic acid dipeptide (RE) repeats	1p36.2-p36.1 , intron	taccaactgccttgccc (18)
13.2 <i>(20 nt)</i>	TNFSF9 , tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 9	19p13.3 , intron	gtcccgtccctgccc (16)
	ARFGAP1 , ADP-ribosylation factor GTPase activating protein 1	20q13.33 , intron 1	agtcccgtccctgccc (17)
13.3 <i>(20 nt)</i>	RELN , reelin	7q22 , intron	tagtgcattccctct (16)
	SLC26A10 , solute carrier family 26, member 10	12q13 , intron	agtgcattccctctc (16)
	CUL1 , cullin 1	7q36.1 , intron	gcatctccctctgccc (16)
	KLC4 , kinesin light chain 4	6p21.1 , intron	agttcatctccctctgc (18)
13.9 <i>(20 nt)</i>	CHST6 , carbohydrate (N-acetylglucosamine 6-O) sulfotransferase 6	16q22 , intron 1	acagtcctctgctctc (16)
	CHST6 , carbohydrate (N-acetylglucosamine 6-O) sulfotransferase 6	16q22 , 5ss_int_1	acagtcctctgctctc (16)
	CHRM3 , cholinergic receptor, muscarinic 3	1q43 , intron	cagtcctctgctctcc (16)
	viral DNA polymerase-transactivated protein 6	2q33.1 , intron	cacagtcctctgctct (16)
	GAA , glukosidase alfa, acidic (Pompe disease, glycogen storage disease type II)	17q25.2-q25.3 , intron	tgcacagtcctctgctc (17)
	PIAS-like protein hZimp10	10q , intron	acagtcctctgctctcc (17)
	hypothetical protein LOC146713	17q25.3 , intron	acagtcctctgctctcc (17)
	ZMIZ1 , zinc finger, MIZ-type containing 1	10q22.3 , intron	acagtcctctgctctcc (17)
	ALPPL2 , alkaline phosphatase, placental-like 2	2q37 , intron	cacagtcctctgctgtcc (18)
	DIS3L2 , DIS3 mitotic control homolog (S. cerevisiae)-like 2	2q37.1 , intron	tgcacagccctctgctct (18)



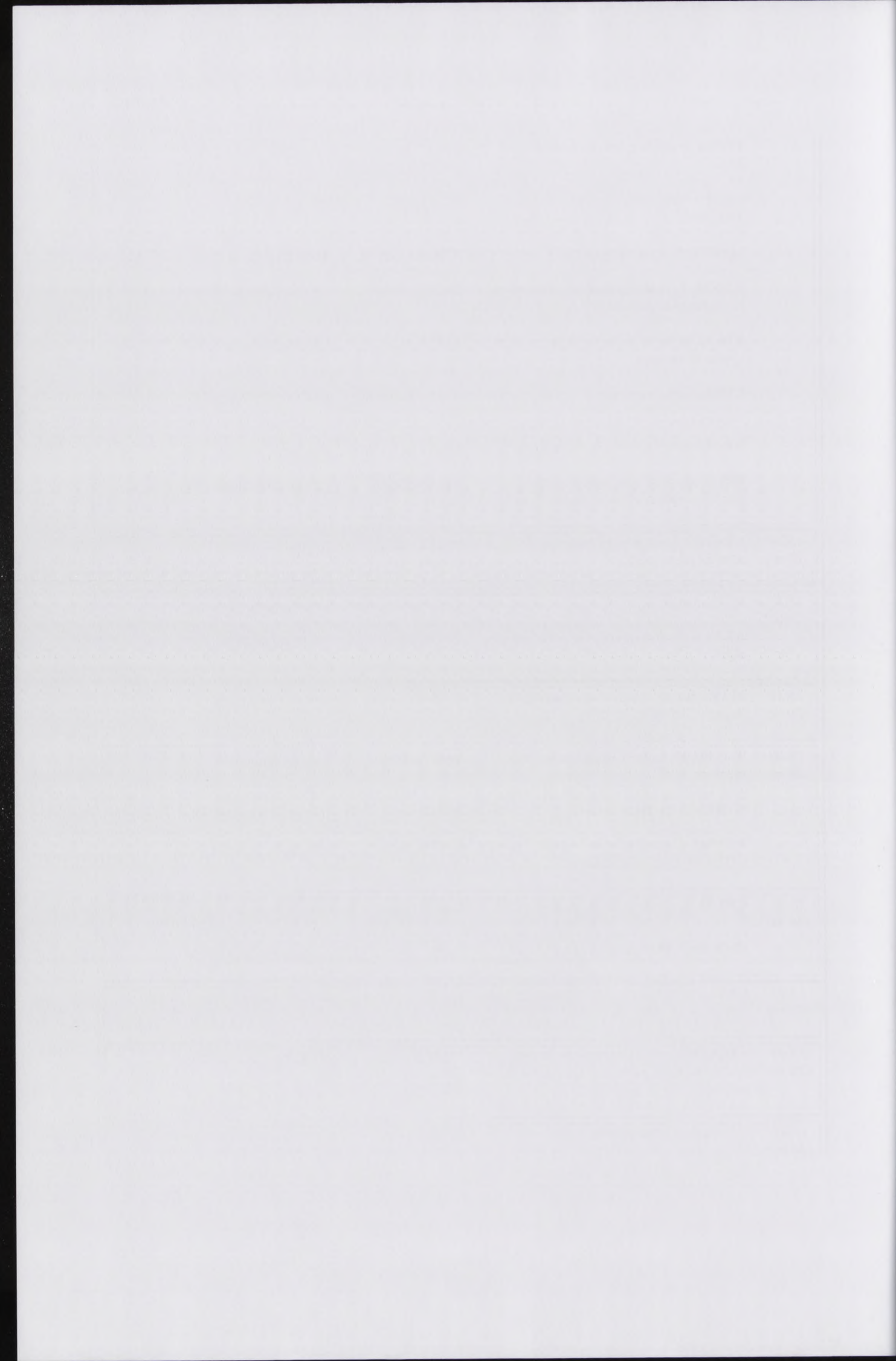
	PTPN23 , protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 23	3p21.3 , intron	tgcccagtcctctgctct (18)
	RGNEF , Rho-guanine nucleotide exchange factor	5q13.2 , intron	gcacactcctctgctctc (18)
	ARHGAP21 , Rho GTPase activating protein 21	10p12.3 , ekson 1	tgcacagecctctgctct (18)
	RANBP10 , RAN binding protein 10	16q22.1 , intron	cacaggcctctgctctcc (18)
	NLRP1 , NLR family, pyrin domain containing 1	17p13.2 , intron	cacagacctctgctctcc (18)
	CD226 , CD226 molecule	18q22.3 , intron	cacagtcctctgcttcc (18)
	CBLC , Cas-Br-M (murine) ecotropic retroviral transforming sequence c	19q13.2 , intron	cacattcctctgctctcc (18)
	ZGPAT , zinc finger, CCCH-type with G patch domain	20q13.3 , intron 4	tgccacagtcctctgcectc (19)
	ZGPAT , zinc finger, CCCH-type with G patch domain	20q13.3 , 3ss_int_4	tgccacagtcctctgcectc (19)
	ZGPAT , zinc finger, CCCH-type with G patch domain	20q13.3 , ekson	tgccacagtcctctgcectc (19)
	ZGPAT , zinc finger, CCCH-type with G patch domain	20q13.3 , intron 4	tgccacagtcctctgcectc (19)
	ZGPAT , zinc finger, CCCH-type with G patch domain	20q13.3 , ekson	tgccacagtcctctgcectc (19)
	ZGPAT , zinc finger, CCCH-type with G patch domain	20q13.3 , ekson	tgccacagtcctctgcectc (19)
	ARHGAP22 , Rho GTPase activating protein 22	10q11.22 , intron	tgccacagtcctctgctctcc (21)
15.3 (19 nt)	HTRA2 , HtrA serine peptidase 2	2p12 , ekson	ccgtctcggccgctcc (18)
15.7 15.71 (20 nt)	SLC1A7 , solute carrier family 1 (glutamate transporter), member 7	1p32.3 , intron 2	gggtctatctccacactcc (19)
	OTUD7A , OTU domain containing 7A	15q13.3 , intron 3	gggtctatctccacactcc (19)
15.8 15.73 (20 nt)	ASTN2 , astrotactin 2	9q33.1 , intron	tcactacactcctcc (16)
	MUC6 , mucin 6, oligomeric mucus/gel-forming	11p15.5-p15.4 , intron, 2 nt eksonu	caccacacactcctcc (18)
15.10 (20 nt)	ACCN4 , amiloride-sensitive cation channel 4, pituitary	2q35 , intron	ccagtcctctgctcc (16)



	SLC7A14 , carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 14	3q26.2 , intron	cgctctgtccccgcc (16)
	COLEC12 , collectin sub-family member 12	18pter-p11.3 , intron 6	accacgtctgtccccgcc (19)
	IGF2 , insulin-like growth factor 2 (somatomedin A)	11p15.5 , ekson	accacgtctgtccccgcc (20)
15.13 (22 nt)	USP13 , ubiquitin specific peptidase 13 (isopeptidase T-3)	3q26.2-q26.3 , intron	gtgtgtagtgtgtgcc (16)
	DNM1L , dynamin 1-like	12p11.21 , intron 1	gtgtgtagtgtgtgccg (17)
	PTPRN2 , protein tyrosine phosphatase, receptor type, N polypeptide 2	7q36 , intron	gtgtgtagtgtgtggcgt (18)
	GPX7 , glutathione peroxidase 7	1p32 , intron	tgtgtagtgtgtgcctttc (19)
15.15 (20 nt)	rejon międzygenowy	chromosom 1	gcgtgacatcttccctcc (18)
	similar to suppressor of initiator codon mutations, related sequence 1	1q25.3	tggcgtgacaacttccct (18)
15.16 (20 nt)	LINGO1 , leucine rich repeat and Ig domain containing 1	15q24.3 , intron	tggacgtgctgtgtatcc (18)
15.18 (20 nt)	hypothetical protein LOC283871	16p13.3 , ekson 1	gcaccgctctctacctgc (18)
15.19 (20 nt)	CYP3A7 , cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 7	7q21-q22.1 , intron	ctctccgtctctacc (16)
15.21 (21 nt)	ADD2 , adducin 2 (beta)	2p14-p13 , intron	ctgtggctcccgtaacct (18)
	hypothetical protein LOC283755	15q11.2 , intron	ctgtggccccgtcacct (18)
	similar to hect domain and RLD 2	15q13.1 , intron	ctgtggccccgtcacct (18)
	HERC2P2 , hect domain and RLD 2 pseudogene 2	15q11.2 , intron 24	ctgtggccccgtcacct (18)
15.27 (20 nt)	TGFBR2 , transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa)	3p22 , intron	catagtgtctgcccgc (17)
15.31 (18 nt)	ATP1B1 , ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, beta 1 polypeptide	1q24 , intron	ctccctgccccctcc (16)
	LAMA1 , laminin, alpha 1	18p11.31 , intron	ctccctgccccctcc (16)
	EPN3 , epsin 3	17q21.33 , 5ss_int- _1	ctccctgccccctcc (16)
	EPN3 , epsin 3	17q21.33 , intron 1	ctccctgccccctcc (16)



	ITPK1 , inositol 1,3,4-triphosphate 5/6 kinase	14q31 , intron ADDIN EN.CITE	ctccctggccccctcc (16)
	putative serine/threonine protein kinase variant C	11p , intron 1	gtctccctggccccct (16)
	GAS7 , growth arrest-specific 7	17p13.1 , intron	gtctccctggccccct (16)
	NDST1 , N-deacetylase/N-sulfotransferase (heparan glucosaminyl) 1	5q33.1 , ekson	tctccctggccccctcc (17)
	PDSS2 , prenyl (decaprenyl) diphosphate synthase, subunit 2	6q21 , intron	tctccctggccccctcc (17)
	CD82 , CD82 molecule	11p11.2 , ostatni ekson	gtctccctggctccctcc (18)
	NPAS3 , neuronal PAS domain protein 3	14q12-q13 , intron	gtctccatggccccctcc (18)
	SPTB , spectrin, beta, erythrocytic (includes spherocytosis, clinical type I)	14q23-q24.2 , intron	gtctccctggctccctcc (19)
15.34 (20 nt)	LINGO2 , leucine rich repeat and Ig domain containing 2	9p21.2-p21.1 , intron	ttacacatgttggc-ctgc (19)
15.35 (20 nt)	NTN1 , netrin 1	17p13-p12 , intron	aacgctgggtcctctgt (16)
	ACACA , acetyl-Coenzyme A carboxylase alpha	17q21 , ekson	ccaatgctgggtcctctgt (18)
15.39 (20 nt)	MARCH4 , membrane-associated ring finger (C3HC4) 4	2q35 , intron	ccacc-tcatcccatgctg (19)
15.40 (20 nt)	SLC30A10 , solute carrier family 30, member 10	1q41 , intron	acatggactgtgtgt (16)
	SNRK , SNF related kinase	3p22.1 , intron	gacagggactgtgtgtg (18)
	KCNQ5 , potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 5	6q14 , intron	acatgggctgtgtgtgc (18)
15.41 (19 nt)	CRTAC1 , cartilage acidic protein 1	10q22 , intron	tactgcacaccctgcc (16)
	SPOCD1 , SPOC domain containing 1	1p35.2 , intron	attactgcagaccctgcc (18)
15.43 (20 nt)	CPVL , carboxypeptidase, vitellogenic-like	7p15-p14 , intron	atcacactcaaccgc (16)
15.44 (20 nt)	KIAA1303 , p150 target of rapamycin (TOR)-scaffold protein containing WD-repeats	17q25.3 , intron	ccattgccgtgccctctc (18)
15.45 (20 nt)	hypothetical protein MGC31957	8p21.2 , intron	tggtcactccccaccgtc (19)



	ARHGEF10 , Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 10	8p23 , intron	ggtctcatccccaccgtcc (19)
15.48 (20 nt)	EIF3S7 , eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 7 zeta, 66/67kDa	22q13.1 , ekson 1	caatcacacctctcgcgt (18)
	TMEM16B , transmembrane protein 16B	12p13.3 , intron	aatcacacctcagagtt (18)
15.49 (20 nt)	WBP2 , WW domain binding protein 2	17q25 , ekson	atgtctatccccgcc (16)
15.53 (20 nt)	ACTL8 , actin-like 8	1p36.2-p35 , intron	ccattgccgtgccctctc (18)
15.54 (20 nt)	UBAP2 , ubiquitin associated protein 2	9p13.3 , intron	tacgatcttgcaccac (16)
15.55 (20 nt)	SLC24A3 , solute carrier family 24 (sodium/potassium/calcium exchanger), member 3	20p13 , intron	ccatagacacacctgttg (18)
15.58 (20 nt)	FAM19A1 , family with sequence similarity 19 (chemokine (C-C motif)-like), member A1	3p14.1 , intron	gtgttctgttcctgc (16)
	LOXL2 , lysyl oxidase-like 2	8p21.3-p21.2 , intron	gtgttctgttcctgc (16)
	ALKBH8 , alkB, alkylation repair homolog 8 (<i>E. coli</i>)	11q22.3 , intron	atcgt-ttctgttcctgc (19)
15.59 (19 nt)	MCCC1 , methylcrotonoyl-Coenzyme A carboxylase 1 (alpha)	3q27 , intron	ccaaccactggccgcc (18)
15.60 (21 nt)	WDR40A , WD repeat domain 40A	9p13.3 , intron	atgcacacttgctg (16)
15.65 (20 nt)	C16orf30 , chromosome 16 open reading frame 30	16p13.3 , intron	aggccacctctcccc (16)
	hypothetical LOC645733	2q14.2 , intron	ccacctctccccgcc (17)
	DYNC1H1 , dynein, cytoplasmic 1, intermediate chain 1	7q21.3-q22.1 , intron	aggcccctctcccccg (18)
	YY1 , YY1 transcription factor	14q , ekson 1	gcccctctccccgcc (18)
	MAP2K3 , mitogen-activated protein kinase, kinase 3	17q11.2 , intron	ggccacctctcctccgc (19)
	SIPA1L3 , signal-induced proliferation-associated 1 like 3	19q13.13 , intron 6	aggccacctctccccctgcc (20)
	SIPA1L3 , signal-induced proliferation-associated 1 like 3	19q13.13 , intron 8	aggccacctctccccctgcc (20)



	REN , Renin	1q32 , intron	aggccacctc-ccccccgcc (20)
	PLEKHA6 , pleckstrin homology domain containing, family A member 6	1q32.1 , intron	aggccacctc-ccccccgcc (20)
15.67 (20 nt)	UBE2H , ubiquitin-conjugating enzyme E2H (UBC8 homolog, yeast)	7q32 , intron 4	tccattgtcgtgactg (16)
	UBE2H , ubiquitin-conjugating enzyme E2H (UBC8 homolog, yeast)	7q32 , intron 3	tccattgtcgtgactg (16)
	SPOCD1 , SPOC domain containing 1	1p35.2 , intron	cattgccgtgactgtgcc (18)
15.68 (20 nt)	TRIM13 , tripartite motif-containing 13	13q14 , intron 3	attgagtgtgccctt (16)
	TRIM13 , tripartite motif-containing 13	13q14 , intron 1	attgagtgtgccctt (16)
15.69 (20 nt)	CACNA1HB , calcium channel, voltage-dependent, T type, alpha 1Hb subunit	chromosom 16 , intron	cccatggtcactcccc (16)
	VPS13A , vacuolar protein sorting 13 homolog A (<i>S. cerevisiae</i>)	9q21 , intron	tggtcactccccgcc (16)
	LRRFIP1 , leucine rich repeat (in FLII) interacting protein 1	2q37.3 , intron	catggtctctccccgcc (18)
	SLC9A3 , solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 3	5p15.3 , ekson 16	ccatggtcactccccacc (19)
	SLC9A3 , solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 3	5p15.3 , intron 17	ccatggtcactccccacc (19)
	SLC9A3 , solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 3	5p15.3 , intron 17	ccatggtcactccccacc (19)
	SLC9A3 , solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 3	5p15.3 , ekson 5	ccatggtcactccccacc (19)
	SLC9A3 , solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 3	5p15.3 , intron 1	ccatggtcactccccacc (19)
	SLC9A3 , solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 3	5p15.3 , intron 1	ccatggtcactccccacc (19)
	SLC9A3 , solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 3	5p15.3 , intron 1	ccatggtcactccccacc (19)
	FBXL7 , F-box and leucine-rich repeat protein 7	5p15.1 , ekson 2	ccatggtgactccccgcc (20)
	rejon międzygenowy	19p13.3	ccccatggtcacccccgcc (20)
	PTPRS , protein tyrosine phosphatase, receptor type, S	19p13.3 , intron 1	ccccatggtcacccccgcc (20)
15.75 (20 nt)	CDH23 protein, cadherin-like 23	10q21-q22 , intron 1	ggggggtgagt-gtgtgtcc (20)



	CDH23 protein, cadherin-like 23	10q21-q22 , intron 27	ggggggtgagt-gtgtgtcc (20)
15.76 (20 nt)	ZNF764 , zinc finger protein 764	16p11.2 , ekson	gctgtgtggagtgtgg (16)
	ZNF498 , zinc finger protein 498	7q22.1 , ekson	gctgtgtggagtgtgg (16)
	ZNF498 , zinc finger protein 498	7q22.1 , intron 7	gctgtgtggagtgtgg (16)
	CNOT6 , CCR4-NOT transcription complex, subunit 6	5q35.3 , intron	cgctgtgtggagtgtgg (17)
	ZNF764 , zinc finger protein 764	16p11.2 , ekson	cgctgtctggagtgtggcc (19)
15.77 (20 nt)	AVIL , Advillin (p92), Ca(2+)-regulated actin-binding protein	12q14.1 , 3ss_int_14	catc-tgtgctctcctgcc (20)
	AVIL , Advillin (p92), Ca(2+)-regulated actin-binding protein	12q14.1 , intron 14	catc-tgtgctctcctgcc (20)
15.79 (20 nt)	TRIM13 , tripartite motif-containing 13	13q14 , intron 3	attgagtgtgccctt (16)
	TRIM13 , tripartite motif-containing 13	13q14 , intron 1	attgagtgtgccctt (16)
15.83 (20 nt)	ARTS-1 , type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator	5q15 , intron	agtgggtcgtgcgtgt (16)
	ELOF1 , elongation factor 1 homolog	19p13.2 , intron	tgtagtgggt-gtgcgtgtg (20)
15.84 (20 nt)	TGFR-2 , TGF-beta receptor type-2 precursor	3p22 , intron	catagtgtgctgccgcc (17)
15.86 (20 nt)	SH2D2A , SH2 domain containing adapter protein 2 transcript variant 4	1q21-q23 , intron	ctgccaacgtctgtgtcc (19)



13. ANEKS 3 – DOROBEK NAUKOWY

Zgłoszenia patentowe

Zgłoszenie patentowe nr P 384 455 w Urzędzie Patentowym RP „Sposób inhibowania rybonukleazy Dicer, inhibitor rybonukleazy Dicer oraz zastosowanie aptamerów RNA jako inhibitorów rybonukleazy Dicer”, 14.02.2008

Komunikaty konferencyjne ustne

1. Inhibition of HIV-RT and HCV RdRp by oligonucleotides.

Seminarium polsko-niemieckie: Perspectives of structural and computational biology and their practical applications, 25.11.2002, Poznań

2. Selekcja aptamerów RNA wobec odwrotnej transkryptazy wirusa HIV-1

Sesja sprawozdawcza Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN, 1.04.2004, Poznań

3. In search of short RNAs that influence activity of human ribnuclease Dicer

EMBO Practical Course on Advanced Analysis and Informatics of Microarray Data, 25.06-1.07.2006, Hinxton, UK

Komunikaty konferencyjne pisemne (plakaty)

1. M. Alejska, M. Figlerowicz, **A. Tyczewska**, A. Kurzyńska-Kokorniak, T. Twardowski, M. Figlerowicz

Selekcja oligonukleotydowych inhibitorów polimeraz wirusowych – otrzymywanie odwrotnej transkryptazy HIV oraz polimerazy HCV

XXXVIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, 18-22.09.2002, Wrocław

2. **A. Tyczewska**, M. Figlerowicz, T. Twardowski

In vitro selection of oligoribonucleotides as potential inhibitors of HIV-1 RT

Sesja sprawozdawcza Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN, 28-29.04.2003, Poznań

3. **A. Tyczewska**, M. Figlerowicz, T. Twardowski

RNA aptamers as potential inhibitors of HIV-1 RT

XXXIX Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, 16-20.09.2003, Gdańsk



4. **A. Tyczewska**, M. Figlerowicz, T. Twardowski

Selekcja aptamerów RNA jako potencjalnych inhibitorów HIV-1 RT

Sesja sprawozdawcza Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN, Poznań, 1.04.2004

5. **A. Tyczewska**, M. Figlerowicz, T. Twardowski

Selection of RNA aptamers and their application in studies of biological functions of HIV-1 RT and human Dicer - proteins involved in specific RNA degradation

Sesja sprawozdawcza Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN, Poznań, 2005

6. **A. Tyczewska**, Z. Pietrusiewicz

Poszukiwanie krótkich RNA wpływających na funkcjonowanie rybonukleaz

Sesja sprawozdawcza Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN, Poznań, 2-3.03.2006

7. **A. Tyczewska**

Searching for short RNAs that influence activities of chosen ribonucleases: HIV-1 RT and human Dicer

Kurs praktyczny organizowany przez FEBS „Human and microbial genomics: DNA arrays applied to human pathogens and diseases”, 30.03-7.04.2006, Hellenic Pasteur Institute, Ateny, Grecja

8. **A. Tyczewska**, Z. Pietrusiewicz, T. Twardowski, M. Figlerowicz

Selekcja krótkich RNA wpływających na aktywności wybranych enzymów: HIV-1 RT i ludzkiej Dicer

XLI Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, 12-15.09.2006, Białystok

9. **A. Tyczewska**, T. Twardowski, M. Figlerowicz

Identyfikacja motywów RNA specyficznie wiążących ludzką rybonukleazę Dicer

XLII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, 18-21.09.2007, Szczecin

10. M. Figlerowicz, **A. Tyczewska**, T. Twardowski

Selection of RNA aptamers inhibiting human Dicer

Konferencja “MicroRNA in Human Disease and Development conference”, 10-11.03.2008, Cambridge, USA

Artykuły przeglądowe

1. **A. Tyczewska**, M. Figlerowicz, T. Twardowski

Aptamery RNA jako potencjalne leki przeciwwirusowe, *Biotechnologia*, 2003, vol. 2(61), 15-164



2. **A. Tyczewska**, M. Sikora

Lista filadelfijska, *Biotechnologia*, 2005, vol. 4(71), 232-235

3. K. Bąkowska-Żywicka, **A. Tyczewska**, T. Twardowski

Kontrowersje wokół mechanizmu syntezy wiązania peptydowego w rybosomie, *Postępy Biochemii*, 2006, vol. 52(2), 166-172

4. **A. Tyczewska**, K. Bąkowska-Żywicka, T. Twardowski

Terapeutyczne zastosowania aptamerów, w: *Na pograniczu chemii i biologii*, 2006, vol. XIV, 175-203

5. M. Figlerowicz, **A. Tyczewska**, M. Figlerowicz

Wpływ małych regulatorowych RNA na przebieg infekcji wirusowych – nowe strategie leczenia zakażeń HCV, *Przegląd Epidemiologiczny*, 2006, vol. 60 (4), 693-700

6. K. Bąkowska-Żywicka, **A. Tyczewska**, T. Twardowski

Poszukiwanie postępu w leczeniu chorób cywilizacyjnych - Terapeutyczne zastosowania strategii antysensu, w: *Nauka*, 2008, w druku

Nagrody

1.02.2006-31.01.2007

Stypendium w ramach projektu „Stypendia dla najlepszych uczestników studiów doktoranckich w Wielkopolsce z zakresu nauk przyczyniających się do rozwoju strategicznych obszarów regionu”. Projekt finansowany w 75 % ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego oraz w 25 % z budżetu państwa.



