

Globalny problem świata to choroby cywilizacyjne, głównie nowotwory oraz choroby sercowo-naczyniowe, które powodują największą śmiertelność. Szacuje się, że w ciągu najbliższych 3 lat liczba wykrytych przypadków pacjentów z chorobą nowotworową przekroczy 17 mln. Rozwój nowoczesnych terapii może poprawić komfort życia tych pacjentów oraz obniżyć śmiertelność. U ludzi, informacja genetyczna zakodowana jest w około 30 000 genach oraz około 85 000 różnych cząsteczek mRNA, które są matrycą dla syntezy białek. Zsekwencjonowanie ludzkiego genomu w Projekcie HUGO (Projekt poznania ludzkiego genomu, ang. *Human Genome Project*) było krokiem milowym dla potrzeb rozwoju nowoczesnej farmakoterapii. Znajomość sekwencji genu odpowiedzialnego za chorobę jest podstawą dla projektowania leków skierowanych na konkretną chorobę uwarunkowaną genetycznie na poziomie mRNA lub genu. Przykładem takiego podejścia jest terapia antysensowa polegająca na zastosowaniu jednoniciowego DNA lub RNA, które wiążą się specyficznie do nici mRNA za pomocą wiązań Watsona-Cricka tworząc regularny dupleks. Po utworzeniu kompleksu nici antysensowej z mRNA dostęp rybosomu do informacji zakodowanej w mRNA jest zablokowany, dochodzi do przecięcia mRNA co prowadzi do zahamowania ekspresji niepożądanego genu. Pierwsze dane świadczące o możliwości zahamowania syntezy białek za pomocą 13-nukleotydowego fragmentu DNA komplementarnego do RNA wirusa opublikował Zamecnik i Stephenson w roku 1978. Kilkanaście lat później w roku 2013 amerykańska FDA zatwierdziła Mipomersen, jako pierwszy ASO leczący homozygotyczną hipercholesterolemię rodzinną spowodowaną mutacją genu receptora APOB-100. Obecnie już 6 oligonukleotydów antysensownych jest zatwierdzonych, jako leki a kilka innych jest na etapie badań klinicznych.

Translacja, obok transkrypcji, jest podstawowym procesem regulującym przepływ informacji genetycznej. Antysensowe oligonukleotydy, bogate w reszty guanozyny (Q-ASO) ze względu na możliwość zmiany struktury mRNA poprzez utworzenie G-kwadrupeksu mogą stanowić efektywne narzędzie do kontrolowania ekspresji genów. G-kwadrupeksy to czteroniciowe, niekanoniczne struktury zbudowane z oddziałujących warstwowo tetrad guanozynowych. Struktury te występują *in vivo* w obrębie sekwencji bogatych w reszty guanozyny i są wykorzystywane, jako cele molekularne w terapii nowotworowej oraz w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych u człowieka. Ponadto zidentyfikowano liczne ligandy wiążące się do struktur G-kwadrupeksów, które jednocześnie wykazują minimalne powinowactwo do dupleksów bądź pojedynczych nici. Mając na uwadze te dane, chcemy otrzymać dwufunkcyjne Q-ASO oraz dwufunkcyjne i trójfunkcyjne antysensowe oligonukleotydy z przyłączonym kowalencyjnie ligandem selektywnym względem G-kwadrupeksów (L-Q-D, L-D). Zaprojektowane modelowe oligonukleotydy antysensowe będą służyć do kontrolowanego tworzenia struktur hybrydowych typu ligand-kwadrupeks-dupleks z wytypowanym fragmentem mRNA. Struktury hybrydowe mają działać, jako sztuczne systemy regulacji ekspresji genów i zapewniać bardzo wysoką efektywność i selektywność wyciszenia chorobotwórczych genów. Koncepcja dwu- i trójfunkcyjnych układów antysensownych oparta jest na kooperatywnym współdziałaniu domen, w celu otrzymania stabilnych kompleksów modelowych Q-ASO z mRNA. Domena dupleksowa (ASO) będzie rozpoznawać docelowy mRNA i tworzyć z nim dupleks. Ważną rolą tego fragmentu jest sekwencyjne nakierowanie pozostałych domen na właściwy fragment mRNA. Z kolei domena kwadrupeksu (Q) zawierająca dwa sąsiadujące bloki guanozynowe ma rozpoznawać analogiczny fragment bogaty w reszty guanozyny w mRNA i utworzyć z nim strukturę G-kwadrupeksu. Domena liganda (L) ma dodatkowo stabilizować strukturę G-kwadrupeksu. Uważamy, że stężenie modelowych L-Q-ASO wymagane do wyciszenia ekspresji genu będzie znacząco niższe niż w przypadku tradycyjnego oligonukleotydu antysensownego (ASO). Spodziewamy się, że poziom wyciszenia genu będzie proporcjonalny do stabilności kompleksu modelowych L-Q-ASO z mRNA. Utworzenie układu hybrydowego typu kwadrupeks-dupleks z mRNA powinno hamować proces syntezy białka poprzez steryczną zawadę dla rybosomów.

Tworzenie struktur hybrydowych typu kwadrupeks-dupleks monitorowane będzie za pomocą spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR). Charakterystyka fizyko-chemiczna właściwości układów hybrydowych oraz określenie ich oddziaływania z ligandami badane będzie za pomocą takich metod jak spektroskopia UV, dichroizm kołowy, fluorescencja czy elektroforeza w żelu natywnym. Dla wybranych modelowych układów antysensownych efekt wyciszenia ekspresji genu w ekstrakcie z komórek królika będzie badany w układzie opartym na ekspresji białka lucyferazy (RL) oraz na wybranych sekwencjach ludzkiego mRNA, takich jak EGFR, EGFR-L858R lub c-MYC.

Nowe trójfunkcyjne układy antysensowe, L-Q-ASO, mogą stanowić szansę na selektywną i efektywną regulację genów a tym samym mogą stanowić obiecującą szansę w nowoczesnej terapii antynowotworowej.