



Univerzita Komenského v Bratislave
Fakulta matematiky, fyziky a informatiky



RNDr. Slavomíra Poniková

Autoreferát dizertačnej práce

Štúdium konformačných a termodynamických vlastností DNA aptamérov

na získanie akademického titulu philosophiae doctor

v odbore doktorandského štúdia: 4.1.12 Biofyzika

Bratislava, 2011

Dizertačná práca bola vypracovaná v dennej forme doktorandského štúdia na Katedre jadrovej fyziky a biofyziky

Predkladateľ: RNDr. Slavomíra Poniková
Katedra jadrovej fyziky a biofyziky
Mlynská dolina – pavilón F1
842 48 Bratislava 4

Školiteľ: prof. RNDr. Tibor Hianik, DrSc
Katedra jadrovej fyziky a biofyziky
Mlynská dolina – pavilón F1
842 48 Bratislava 4

Oponenti: prof. Ing. Ján Labuda, DrSc.
Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, STU
Radlinského 9
812 37 Bratislava.

doc. Alžbeta Chorvátová, PhD.
Medzinárodné laserové centrum
Ilkovičova 3
812 19 Bratislava

RNDr. Pavol Koiš, CSc.
Prírodovedecká fakulta UK
Mlynská dolina – Pavilón CH-1
842 15 Bratislava

**Obhajoba dizertačnej práce sa koná o h
pred komisiou pre obhajobu dizertačnej práce v odbore doktorandského štúdia vymenovanou predsedom
odborovej komisie4.1.12 Biofyzika na FMFI UK, Mlynská dolina F1,
842 48 Bratislava, miestnosť F1-326**

Predseda odborovej komisie:

prof. RNDr. Tibor Hianik, DrSc
Katedra jadrovej fyziky a biofyziky
Mlynská dolina – pavilón F1
842 48 Bratislava 4

1 Úvod

Medzi najčastejšie príčiny úmrtia obyvateľov v industrializovanom svete patria trombózy. Príkladom je venózna tromboembólia, infarkt myokardu, alebo mozgová mŕtvica. Kľúčovú úlohu pri tvorbe krvných zrazenín, spôsobujúcich trombózy, zohráva trombín – vysoko špecifická serínová proteáza generovaná proteolytickou aktiváciou zymogénového protrombínu. V organizme zabezpečuje rovnováhu medzi krvácaním a trombózou tým, že okrem prokoagulačnej má aj antikoagulačnú funkciu. Jednou z možností regulácie trombínovej aktivity je identifikácia a izolácia aptamérov, krátkych sekvencií nukleových kyselín, schopných sa s vysokou afinitou a špecificitou viazať na väzobné miesta proteázy. Vývoj terapeutík na základe netoxických DNA aptamérov, je perspektívna cesta ako dosiahnuť výrazný antikoagulačný efekt bez vedľajších účinkov.

V poslednom desaťročí vzrástol záujem vedeckých skupín o vylepšovanie vlastností aptamérov pre aplikácie v medicínskej terapii, biotechnológiách či pri vývoji biosenzorov. Nový prístup často spočíva v dimerizácii a multimerizácii, čím sa zvyšuje počet väzobných miest pre cieľový ligand. Za týmto účelom boli v laboratóriu prof. T. Hianika (Hianik a kol. 2008) vyvinuté bivalentné aptaméry, nazvané aptabody. Sú špecifické voči ľudskému α -trombínu a sú schopné interagovať s dvomi molekulami – homodimérne aptabody alebo s dvoma väzbovými miestami jednej molekuly trombínu – heterodimérne aptabody. Tieto dimérne aptaméry boli prvýkrát aplikované ako rozpoznávacie zložky TSM senzorov, pričom vykazovali výrazne lepšiu detekčnú limit v porovnaní s klasickými aptamérmi. Doposiaľ však neboli preštudované ich štruktúrne a termodynamické vlastnosti ako aj schopnosť inhibovať trombínom sprostredkovanú tvorbu fibrínových plakov. V dizertačnej práci sa okrem termodynamických a konformačných vlastností väzobných motívov aptamérov zaoberáme aj spomínanými vlastnosťami u bivalentných aptabody.

2 Súčasný stav riešenej problematiky

2.1 Aptaméry

Aptaméry sú syntetické jednovláknové DNA alebo RNA molekuly, schopné nadobúdať jedinečnú trojdimenzionálnu štruktúru, ktorá im poskytuje výnimočnú vlastnosť selektívne sa viazať na cieľové molekuly. Ich názov je odvodený z latinského slova „aptus“ (hodiť sa, zapadať). Identifikácia aptamérov prebieha v *in vitro* podmienkach metódou SELEX, ktorá bola prvýkrát opísaná v roku 1990 (Ellington a Szostak, 1990; Tuerk a Gold, 1990). Táto experimentálna procedúra umožňuje extrakciu oligomérov s požadovanou väzbovou afinitou

k cieľovej molekule z obrovského množstva náhodných oligonukleotidových sekvencií, ktoré môžu zhrňať jednovláknové oligonukleotidy (RNA, ssDNA, modifikované RNA, modifikované ssDNA) alebo dvojvláknovú DNA. Proces identifikácie aptamérov prebieha v štyroch hlavných bodoch, ktorými sú príprava zásobného roztoku, selekcia, amplifikácia pomocou PCR a izolácia aptamérov. V súčasnosti je SELEX plne automatizovaný a môže prebiehať bez ľudského zásahu. Vďaka tomu sa čas izolácie aptaméra skrátil z 2-3 mesiacov na niekoľko dní (Cox a kol. 2002). Navyše, vďaka možnosti paralelného priebehu viacerých SELEX procesov je možná rýchlejšia izolácia a syntéza nových aptamérov.

Základnou charakteristikou aptamérov je ich vysoká afinita k ligandom, porovnateľná s monoklonálnymi protilátkami, pričom hodnoty disociačnej konštanty sa pohybujú v rozsahu nM - pM. Aptaméry sa vyznačujú niektorými výnimočnými vlastnosťami, ktoré protilátkam chýbajú (Jayasena 1999, Bunka a Stockley 2006).

- Nakoľko sú identifikované *in vitro* procesom, ktorý nie je závislý na laboratórnych zvieratách, bunkových kultúrach, alebo na *in vivo* podmienkach, vlastnosti aptamérov môžu byť podľa požiadaviek menené.
- Podmienky selekcie môžu byť upravované na získanie aptamérov s vlastnosťami požadovanými pre *in vitro* diagnostiku. Môžu byť izolované napríklad aptaméry, ktoré sa viažu v nefyziologických rozpúšťadlách a pri nefyziologických teplotách.
- Môžu byť izolované voči slabo imunogénnym proteínom.
- Obyčajne sú ich rozmery v porovnaní s protilátkami menšie, čo im umožňuje vytvárať väzby na miestach, ktoré sú pre imunoglobulíny nedostupné.
- Pre identifikáciu nie sú potrebné zvieratá ani bunky, vďaka čomu môžu byť vysoko afinitné aptaméry izolované aj voči toxínom.
- Aptaméry sú produkované chemickou syntézou so značnou presnosťou. Čistené sú pri denaturačných podmienkach a dosahujú vysoký stupeň čistoty. Z toho dôvodu nedochádza pri výrobe aptamérov k rozdielom v jednotlivých šaržach.
- K aptaméru môžu byť pripojené molekuly ako napr. fluoresceín a biotín s presným umiestnením určeným používateľom. Počas chemickej syntézy aptamérov môžu byť pripojené funkčné skupiny, ktoré poskytujú aptaméru nové špecifické vlastnosti.
- Aptaméry podliehajú denaturácii, ale tento proces je reverzibilný, pričom aptaméry môžu byť ľahko regenerované počas niekoľkých minút.

Vďaka týmto vlastnostiam sa aptaméry úspešne využívajú v rozličných odvetviach biotechnológií akými sú purifikačné procesy, vývoj nových liečiv, diagnostika a medicínska

terapia (Bunka a kol. 2010, Thiel a Giangrande 2009, Famulok a kol. 2007, Nimjee a kol. 2005a, b). Zvýšený záujem o aptaméry je spojený s ich vysokým potenciálom aj pri vývoji biosenzorov (Cho a kol. 2009).

Stúpajúci záujem o aplikáciu aptamérov v diagnostike a terapeutike nastolil potrebu vylepšovania ich vlastností, akou je vyššia stabilita vo fyziologických podmienkach, väčšia konformačná stabilita, prípadne zvyšovanie afinity a špecifickosti voči cieľovej molekule. Jednou z alternatív je dimerizácia a multimerizácia aptamérov. Medzi prvé, takto vylepšené aptaméry, patrili kruhové multiméry (Di Giusto a King 2004), pozostávajúce zo štyroch DNA aptamérov – špecifických voči fibrinogénovému (Bock a kol. 1992) a heparínovému (Tasset a kol. 1997) väzobnému miestu na ľudskom α -trombíne, voči L-selektínu (Hicke a kol. 1996) a proteínu z membrány ľudských erytrocytov (Morris a kol. 1998). Vďaka kombinácii viacerých štrukturálnych motívov (di-, tri- a tetra- cirkulárne aptaméry) bola dosiahnutá vyššia afinita k molekulovým cieľom a zlepšila sa stabilita v biologických tekutinách. V ďalšej práci boli na vytvorenie bivalentných aptamérov opäť použité cirkulárne aptaméry špecifické voči obom väzobným miestam na ľudskom trombíne (Di Giusto a kol. 2005). Heterodimér tvorili pomocou poly(dT) chvosta, ktorý na 3' konci niesol sekvenciu komplementárnu so sekvenciou na slučke pripojenej k druhému aptaméru.

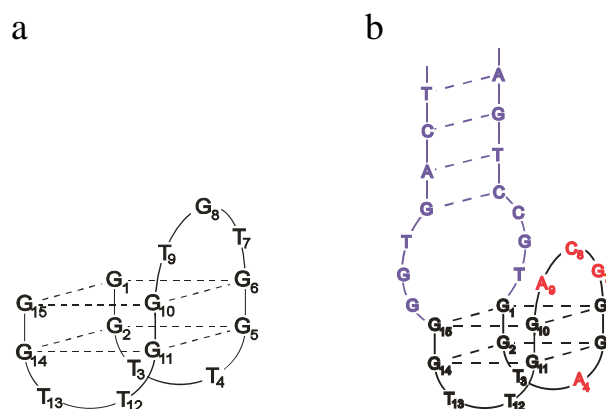
Štúdie zaoberajúce sa dimerizáciou anti-trombínových aptamérov, či už spájaním pomocou určitého počtu tymínových nukleotidov (Hasegava a kol. 2008) alebo pomocou fosforamiditových medzerníkov (Kim a kol. 2008) ukázali, že dimerizácia je pre výsledné vlastnosti aptamérov – dimérov prospešná a zvyšuje ich schopnosť inhibovať koagulačnú funkciu trombínu. Anti-trombínové diméry boli študované aj na povrchoch (Hianik a kol. 2008, 2009), ako potenciálne biosenzory na detekciu ľudského α -trombínu. Pozostávajú z dvoch monomérov, každý obsahuje hlavičku - aptamér špecifický voči fibrinogénovému väzobnému miestu a chvost – oligonukleotidový reťazec komplementárny k druhej časti homodiméru. Tento nový typ diméru, nazvaný aptabody, vykazuje trojnásobne lepší detekčný limit v porovnaní s klasickým jednoreťazcovým aptamérom. Neskôr boli aptabody vylepšené a predstavovali heterodimér, obsahujúci monoméry s rozdielnymi hlavičkami –jednou špecifickou voči fibrinogénovému a druhou voči heparínovému väzobnému miestu na trombíne (Hianik a kol. 2009).

Pre detekciu trombínu v reálnom čase na princípe fluorescenčného rezonančného prenosu energie boli vyvinuté bivalentné aptaméry špecifické voči fibrinogénovému aj heparínovému miestu na trombíne (Lee a kol. 2010). Na každom z aptamérov bol naviazaný 18-atómový polyetylén glykol a komplementárna sekvencia siedmych nukleotidov vytvárajúca

duplexový motív. Na oboch reťazcoch duplexu bola naviazaná fluorescenčná značka zabezpečujúca rezonančný energetický prenos. Detekciu fluorescence bolo priamo zisťované množstvo trombínu v tlmivom roztoku. Detekčný limit aptamérového komplexu bol určený na 48 nM. Jeho hodnota však značne závisí od stability duplexovej časti, ktorá v meraných podmienkach bola dosť nízka. Bivalentný aptamér bol schopný indikovať aj prítomnosť protrombínu, avšak s oveľa nižším (>20-násobne) detekčným limitom.

2.2 DNA aptaméry špecificky sa viažuce na ľudský α -trombín

Intenzívny výskum v oblasti nukleotidových antikoagulantov je zameraný prevažne na hemostatické proteázy. Najčastejším cieľom býva trombín – finálny enzým v koagulačnej kaskáde u stavovcov. Aptaméry s anti-trombínovou aktivitou boli izolované SELEX metódou s ľudským α -trombínom ako cieľovou molekulou. Doposiaľ boli identifikované tri DNA aptaméry špecificky sa viažuce na trombín. Prvý trombínový DNA aptamér bol izolovaný v roku 1992 (Bock a kol., 1992). Skladá sa z 15 nukleotidov zoradených v poradí 5'-GGT TGG TGT GGT TGG-3' (Fibri, obrázok 2.1a) a je špecifický voči fibrinogénovému väzobnému miestu na trombíne (Wu a kol., 1992). Následne bol izolovaný druhý trombínový DNA aptamér so sekvenciou 5'-AGTC CGT GGT AGG GCA GGT TGG GGT GACT-3' (Tasset a kol. 1997), ktorý sa viaže na heparínové väzobné miesto na trombíne (Hepa29, obrázok 2.1b). Nedávno bol identifikovaný tretí DNA aptamér s názvom NU172 (Wagner-Whyte a kol., 2007) a sekvenciou 5'-AATA CTC CGG GAT GGA AGA GAG GAC CGGT-3'. Tento aptamér sa, podobne ako Fibri, viaže na fibrinogénové väzobné miesto.



Obrázok 2.1 Quadruplexová štruktúra Fibri aptaméra (a) a Hepa29 aptamér (b) s quadruplexovým jadrom Hepa (čierna farba s červene vyznačenými nukleotidmi, odlišujúcimi Hepa od Fibri) a prídavnými sekvenciami (modrá farba)

Pre dosiahnutie vysoko špecifickej väzby s ligandom dochádza u aptaméra k vytváraniu jedinečnej 3D štruktúry. Skladanie nukleovej kyseliny prebieha tak, aby sa dosiahlo čo najviac intermolekulárnych kontaktov. Podobne ako u iných DNA-proteínových interakcií ide o vytváranie špecifických vodíkových väzieb a elektrostatické interakcie. Svoju úlohu tu zohrávajú aj tvarová komplementarita, rozloženie polárnych a nepolárnych skupín (hydrofóbne interakcie) a stohové interakcie. Na vytvorenie väzby s trombínom a inhibíciu koagulačnej aktivity musia aptaméry vytvoriť charakteristický väzobný motív, ktorým je u prvých dvoch aptamérov guanínový quadruplex.

Quadruplexová štruktúra 15-méru Fibri bola študovaná v roztoku pomocou nukleárnej magnetickej rezonancie (Macaya a kol. 1993, Wang a kol. 1993, Schulze a kol. 1994, Marathias a Bolton 1999, Marathias a Bolton 2000, Trajkovski a kol. 2009). Aptamér je tvorený dvoma koplanárnymi kvartetmi, ktoré sú pospájané špecifickými slučkami, ktorých zloženie a poradie nukleotidov je zodpovedné za smerovanie aptaméra k jeho väzobnému miestu. V koplanárnych kvartetoch sú bázy asociované pomocou vodíkových väzieb medzi N1H imino protónom a C6=O karbonylom a N2H amino protónom a N7 dusíkom. V nich sa guaníny nachádzajú v konformáciách G(*syn*).G(*anti*).G(*syn*).G(*anti*). Usporiadanie troch postranných (laterálnych) slučiek vytvára štruktúru označovanú ako stolička. Každý z guanínových G2 úsekov je v smere 5'-G(*syn*)-G(*anti*)-3' a všetky bázy v postranných slučkách sú v *anti* konformácii. G-quadruplex obsahuje dva široké a dva úzke žliabky. Tymíny T₄ a T₁₃ sú umiestnené pod kvartetom tak, že môžu vytvárať nekanonický T.T báзовý pár, ktorý sa opisuje ako dôležitý stabilizujúci faktor pri formovaní quadruplexu (Tsiang a kol. 1995, Tasset a kol. 1997, Marathias a Bolton 1999). Tymíny T₃ a T₁₂ vykazujú určitý stupeň flexibility. Bázy na hornej laterálnej TGT slučke sú usporiadané tak, že T₇ je otočený smerom do širokého žliabku dve ostatné bázy, G₈ a T₉ sú nadstavené nad horný kvartet. G-quadruplexová štruktúra Fibri aptaméra je termodynamicky stabilná iba pri určitých podmienkach. Najčastejšie sa študuje v prítomnosti rôznych anorganických katiónov, ale vzniká aj pri zníženej aktivite vody po pridaní osmolytov, pri nízkej teplote a počas väzby s trombínom (Nagatoishi a kol. 2007).

Hepa29 aptamér je tvorený 29 nukleotidovou sekvenciou a jeho štruktúra pozostáva z dvoch častí. Prvou je hlavný väzobný motív – quadruplexové jadro, ktoré v ďalšom texte budeme označovať ako Hepa. Jadro je zložené z pätnástich nukleotidov v postupnosti 5'-GGTAGGGCAGGTTGG-3', a od Fibri sa odlišuje substitúciou štyroch báz, ktoré sú umiestnené v slučkách. Quadruplex je zložený z dvoch koplanárných kvartetov, ktoré sú spojené tromi laterálnymi slučkami do konformácie stolička. Adenín na pozícii štyri zohráva

hlavnú úlohu v rozoznávaní väzobného miesta a usmerňuje Hepa29 aptamér k heparínovému väzobnému miestu na trombíne (Tasset a kol. 1997). Okrem toho substitúcia tymínu za adenín na štvrtej pozícii quadruplexového jadra by mala mať nepriaznivý vplyv na formovanie väzobnej štruktúry u Hepa29. Hlavnou príčinou je neschopnosť vytvárať básový pár medzi tymínmi na pozíciách 4 a 13, následkom čoho sú potrebné iné stabilizujúce faktory. Predpokladá sa, že bočné sekvencie v 29-méri, ktoré tvoria druhú, neväzobnú časť aptaméra, sú pripojené ku quadruplexovému jadru práve zo štrukturálnych dôvodov (Tasset a kol. 1997, Tsiang a kol. 1995) a sú nevyhnutné na vytvorenie G-quadruplexu. Prídavné sekvencie pozostávajú zo 14 nukleotidov, z ktorých štyri páry sú spojené do duplexu Watson-Crickovým párovaním báz a zvyšné sú nespárované.

Vplyv katiónov na formovanie Hepa quadruplexu nebol doposiaľ preskúmaný. Štúdium podobných krátkych sekvencií a ich schopnosť vytvárať quadruplexové štruktúry v prítomnosti draslíka (Marathias a Bolton, 1999) však naznačuje, že vyššie opísaná substitúcia v laterálnych slučkách, by mohla komplikovať katiónmi sprostredkovanú tvorbu quadruplexov u Hepa. Potvrdenie, alebo vyvrátenie tohto predpokladu je jedným z cieľov dizertačnej práce.

3 Ciele práce

Dizertačná práca sa venuje štúdiu konformačných a termodynamických vlastností DNA aptamérov. V závislosti od konfigurácie aptamérov sledujeme ich stabilitu v prítomnosti katiónov a stabilitu ich komplexov. K štúdiu použijeme absorpčné a chiroptické spektroskopické metódy a diferenčnú kalorimetriu. Výsledky získané pomocou týchto metód doplníme štruktúrnymi charakteristikami overenými pomocou polyakrylamidovej elektroforézy. Ciele práce môžeme zhrnúť do nasledujúcich bodov:

- vplyv konfigurácie aptamérov na formovanie väzobných motívov a štúdium mechanizmov ich interakcií s anorganickými katiónmi
- sledovanie štruktúrnych a termodynamických parametrov aptaméra špecifického voči heparínovému väzobnému miestu na ľudskom α -trombíne – Hepa29
- zmeny termodynamických a konformačných vlastností bivalentných aptamérov v porovnaní s klasickým jednoreťazcovým anti-trombínovým aptamérom Fibri
- štúdium inhibičných schopností aptamérov a aptabody na trombínom sprostredkovanú tvorbu fibrínových plakov

4 Materiál a metódy

HPLC čistené oligonukleotidy boli získané od Thermo Fisher Scientific GmbH (Ulm, Nemecko). Koncentrácia oligonukleotidov v roztoku bola určovaná UV-VIS absorpčnými meraniami pri vlnovej dĺžke 260 nm, podľa Lambert-Beerovho zákona $A = \varepsilon \cdot c \cdot l$; kde ε je mólový absorpčný koeficient (tabuľka 3.1), l je optická dráha lúča vo vzorke. Anorganické soli (KCl, NaCl, MgCl₂, CaCl₂) a proteíny (ľudský α -trombín a ľudský fibrinogén), boli zakúpené v Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) a v experimentoch boli použité bez ďalšieho čistenia. Homodimér zložený z postupností FiabriAT+FibriTT a heterodimér zložený z postupností FibriAT+HepaTT, boli pripravené dimerizáciou ich prídavných komplementárnych častí. Oligonukleotidy boli študované vo viacerých typoch tlmivých roztokov – 10 mM Tris-HCl, pH 7.4; 10 mM, resp. 20 mM Tris-HCl + 140 mM NaCl, pH 7.4; a vo väzobnom tlmivom roztoku : 10 mM Tris-HCl + 140 mM NaCl + 1 mM MgCl₂ + 1 mM CaCl₂, pH 7.4. Koncentrácie oligomérov v experimentoch záviseli od použitej metódy.

Tabuľka 1. Zloženie a koeficient extinkcie študovaných DNA aptamérov a oligonukleotidov

Aptamér/ Oligonukleotid	Nukleotidové sekvencie v smere in 5' to 3'	ε [M ⁻¹ cm ⁻¹]
Fibri	GGT TGG TGT GGT TGG	143 300
Hepa	GGT AGG GCA GGT TGG	151 200
Hepa29	AGTC CGT GGT AGG GCA GGT TGG GGT GACT	283 600
FibriAT	AAA AAA AAA AAA AAA TTT TT GGT TGG TGT GGT TGG	365 300
FibriTT	GGT TGG TGT GGT TGG TT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	305 700
HepaTT	GGT AGG GCA GGT TGG TT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	313 600
ODN-A	AAA AAA AAA AAA AAA TTT TT	223 200
ODN-T	TT TTT TTT T TT TTT TTT TTT	162 600

CD spektrá boli namerané na JASCO J-810 spektropolarimetri (Japonsko) s elektronickým termostatom na Peltierovom princípe PTC-423L. Merania boli uskutočnené v kyvetách s optickou dĺžkou 1 mm alebo 10 mm, v závislosti od experimentu. CD spektrá boli merané v rozsahu vlnových dĺžok 220 nm – 320 nm. Koncentrácia oligonukleotidov bola 5 μ M alebo 10 μ M, s výnimkou koncentračne závislých CD experimentov. Roztok oligonukleotidov bol

titrovaný postupným pridávaním 2-5 μl KCl s koncentráciou 3 M, pokým neboli spektrá nasýtené. Na analýzu väzby draselných a sodných katiónov s aptamérmí boli zostrojené väzobné izotermly, fitované pomocou softvéru Origin7.5 (Microcal Software Inc., USA) Voľná energia viazania draslíka bola vypočítaná podľa štandardnej Gibbsovej rovnice $\Delta G = -RT \ln K_A$, kde $K_A = 1/K_D$ je asociačná konštanta. Teplotné denaturačné krivky boli merané pre každý komplex pri 292 nm s rýchlosťou ohrevu 0.5 – 2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Z analýzy denaturačných kriviek sme získali teplotu topenia a zmenu van't Hoffovej entalpie použitím dvoj-stavovej aproximácie (Marky a Breslauer 1987).

DSC merania boli vykonané na DASM-4 mikrokolorimetri (Pushchino, Rusko), s objemom meracej cely 0.47 ml, v konštantnom tlaku 152 kPa s rýchlosťou ohrevu 0.5 – 2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Koncentrácia oligonukleotidov bola 250 μM a termodynamické charakteristiky boli študované v dvoch typoch tlmivých roztokov: 10 mM Tris-HCl, pH 7.4 a 10 mM Tris-HCl + 140 mM NaCl, pH 7.4, v prítomnosti zodpovedajúcej koncentrácie KCl (10 mM, 50 mM, 100 mM, 300 mM a 500 mM). Teplotné krivky boli korigované s ohľadom na tlmivý roztok a vyhodnotené v programe OriginPro 7.5 (Microcal Software Inc., USA) podľa práce Antonacci a kol. (2007). Dekonvolúcia kriviek multifázových teplotných prechodov bola urobená použitím funkcie Gaussian multi-peak. Analýzou DSC termogramov sme získali hodnoty teploty topenia T_m , zmeny kalorimetrickej entalpie ΔH_{cal} , zmeny entropie ΔS , zmeny Gibbsovej energie ΔG a hodnotu zmeny van't Hoffovej entalpie ΔH_{vH} .

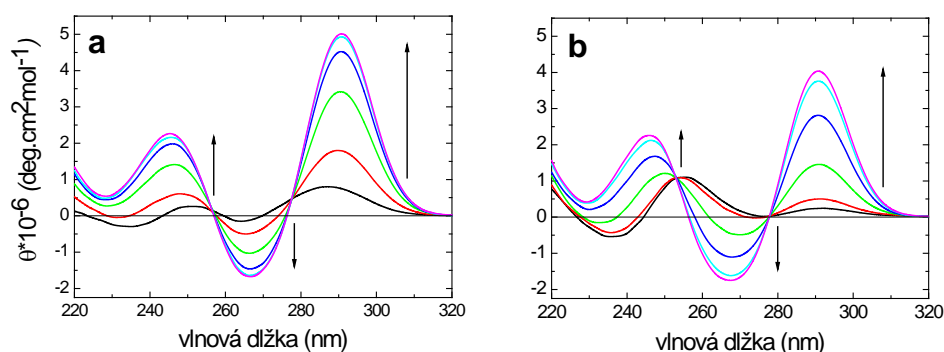
Natívna polyakrylamidová gélová elektroforéza (PAGE) bola urobená na teplotne kontrolovanej vertikálnej elektroforetickej aparátúre (Z375039-1EA, Sigma-Aldrich, San Francisco, CA, USA). Koncentrácia gélu bola 15% (19:1 pomer akrylamid : bisakrylamid, Applichem, Darmstadt). Elektroforéza prebiehala počas štyroch hodín pri teplote 15 $^{\circ}\text{C}$ a napätí 130 V (~ 8 V/cm). Teplotná gradientná gélová elektroforéza (TGGE) bola použitá na priame sledovanie konformačných zmien dimérov. Použitá aparátúra bola rovnaká ako v práci Víglaský a kol. (2000).

5 Výsledky a diskusia

5.1 Štúdium vlastností väzobných motívov anti-trombínových DNA aptamérov

K vytváraniu G-quadruplexov najčastejšie dochádza v prítomnosti vhodných anorganických katiónov. V prvej časti sme pomocou metódy cirkulárneho dichroizmu (CD) študovali konformačné vlastnosti sekundárnej štruktúry väzobných motívov – guanínových

quadruplexov dvoch DNA aptamérov, ktoré sa špecificky viažu na fibrinogénové väzobné miesto (Fibri) a heparínové väzobné miesto (Hepa) na ľudskom α -trombíne. U quadruplexov zvyčajne pozorujeme dva typy; quadruplex s antiparalelným usporiadaním vlákien vykazuje pozitívny Cottonov efekt okolo 295 nm a negatívny okolo 265 nm, pričom paralelný typ má pozitívny efekt pri 265 nm a negatívny pri 240 nm (Lu a kol. 1993). Na základe charakteristického profilu CD spektier sme sledovali vplyv rôznych koncentrácií katiónov draslíka a sodíka na formovanie 3-D štruktúry u DNA aptamérov.



Obrázok 5.1 CD spektrá trombínových aptamérov Fibri (a) a Hepa (b) bez prítomnosti a v prítomnosti rozličných koncentrácií iónov draslíka. S rastúcou koncentráciou K^+ rastú aj absolútne hodnoty CD signálu všetkých troch CD pásov (označené šípkou).

Na obrázku 5.1a je zobrazená závislosť intenzity CD signálu od koncentrácie draslíka pre Fibri aptamér. Bez prítomnosti draslíka majú spektrá malé amplitúdy, čo poukazuje na prítomnosť len malého množstva G-quadruplexov. S rastúcou koncentráciou K^+ rastie aj negatívny a pozitívny CD pík okolo 267 nm, resp. 292 nm. Takéto CD spektrá indikujú formovanie G-quadruplexu s antiparalelným usporiadaním vlákien (Lu a kol. 1993). Na spektrách môžeme vidieť dva izoeliptické body pri 257 nm a 278 nm, ktoré poukazujú na dvojestavovú povahu konformačných prechodov počas vytvárania komplexu draslíka s aptamérom. Dosiahnuté výsledky sú zhodné s predchádzajúcimi štúdiami Fibri aptaméra v prítomnosti rozličných katiónov (Kankia a Marky 2001) a v prítomnosti rozličných koncentrácií draslíka (Smirnov a Shafer 2000, Nagatoishi a kol. 2007, Trajkovski a kol. 2009). CD spektrálne charakteristiky Hepa aptaméra neboli doposiaľ študované. Z obrázku 5.1b môžeme vidieť, že bez K^+ iónov sú amplitúdy pásov pomerne malé. Avšak s nárastom koncentrácie draslíka dochádza k rastu kladných aj záporných Cottonových pásov. Výrazné maximum okolo 292 nm a minimum okolo 267 nm svedčí o vzniku antiparalelného

guanínového quadruplexu. Aj v prípade Hepa aptaméra môžeme pozorovať izoeliptické body nachádzajúce sa pri vlnových dĺžkach 254 nm a 278 nm, čo poukazuje na dvojstavový proces zbaľovania. Z toho usudzujeme, že po pridaní draslíka sa quadruplexová štruktúra kooperatívne zbaľuje a každé nasledujúce zvýšenie koncentrácie spôsobí kompletne zbalenie určitej časti molekúl, zatiaľ čo zvyšné molekuly zostávajú rozbalené. Tento mechanizmus predpokladáme pre oba trombínové DNA aptaméry.

Iný charakter má interakcia aptamérov s kationmi sodíka. S rastúcou koncentráciou kationov dochádza len k malým zmenám v CD spektrách. Na rozdiel od CD kriviek zobrazujúcich interakciu aptamérov s draslíkom, sa v spektrách nameraných v prítomnosti sodíka nenachádzajú izoeliptické body. Neprítomnosť izoeliptických bodov naznačuje, že nedochádza ku kooperatívnym zmenám v konformácii oligonukleotidov, prípadne poukazuje na výskyt iných konformácií – náhodných štruktúr alebo paralelných quadruplexov. Tento predpoklad bol overený NMR metódou (Trajkovsky a kol. 2009), keď titrácia Fibri aptaméra kationmi sodíka vyústila do vzniku jedného majoritného a niekoľkých minoritných druhov G-quadruplexov. Prítomnosť majoritného druhu – antiparalelného quadruplexu opisuje signál z imino protónov, pričom ďalšie prídavné píky opisujú vznik paralelných quadruplexov. Rovnaký signál bol pozorovaný pre ribonukleotidový analóg Fibri aptaméra v prítomnosti K^+ , ktorý vytvára bimolekulárne paralelné quadruplexy (Tang a Shafer 2006).

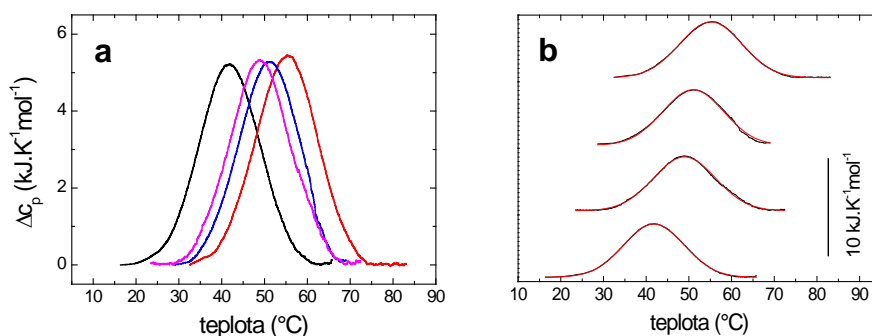
Porovnanie CD profilov aptamérov v prítomnosti kationov draslíka, uvedené na obrázku 5.1, poukazuje na kvalitatívne rovnakú interakciu aptamérov s draslíkom. Pre kvantitatívnu analýzu tejto interakcie sme pri danej vlnovej dĺžke (292 nm) zostrojili väzobné izotermy, ktoré sú pre oba aptaméry podobné. Na základe analýzy kriviek, sme určili disociačné konštanty a vypočítali zmeny Gibbsovej energie. Vyššej stabilite komplexu Fibri- K^+ nasvedčuje disociačná konštanta, ktorá je približne štvornásobne nižšia ako u komplexu Hepa- K^+ . Hodnota $\Delta G^0 = -22.2$ kJ/mol získaná pre Fibri- K^+ je porovnateľná s hodnotou, ktorú pomocou izotermálnej titračnej kalorimetrie určili Kankia a kol. (2005). Pre komplex Hepa- K^+ sme určili hodnotu $\Delta G^0 = -18.8$ kJ/mol, ktorá odráža menšiu afinitu aptaméru k draslíku pri formovaní quadruplexovej štruktúry v porovnaní s Fibri. Podobne sme zostrojili aj izotermy pre interakciu oligonukleotidov so sodíkom. Porovnanie väzobných kriviek poukazuje na rozdiely v schopnosti interagovať s iónmi sodíka. Z fitov sme získali výrazne vyššie hodnoty disociačných konštánt pre sodík v porovnaní s draslíkom. Hodnoty ΔG^0 boli stanovené na -2.5 kJ/mol pre Fibri- Na^+ a -5.4 kJ/mol pre Hepa- Na^+ komplex, čo poukazuje na vyššiu afinitu iónov sodíka k Hepa aptaméru. Výsledok môže súvisieť s primárnou nukleotidovou postupnosťou, ktorá okrem guanínov a tymínov obsahuje aj dva adeníny. Keďže prítomnosť

adenínov v telomérovej sekvencii ovplyvňuje vytváranie quadruplexov a aj ich afinitu ku kationom sodíka a draslíka (Guo a kol. 1992), môže byť príčinou takéhoto správania práve ich prítomnosť v sekvencii.

Pre ďalšie porovnanie vlastností aptamérov sme z CD denaturačných kriviek a diferenčnej kalorimetrie študovali ich teplotnú stabilitu. V prvej časti denaturačných experimentov sme zisťovali zmeny termodynamických parametrov v závislosti od rastúcej koncentrácie iónov KCl pri konštantnej koncentrácii oligonukleotidov. Krivky závislosti elipticity pri 292 nm od teploty majú typický sigmiodálny tvar, pričom s rastúcou teplotou CD intenzita klesá. Teplota topenia, rovnako ako zmena van't Hoffovej entalpie pre oba aptaméry s rastúcou koncentráciou kationov rastie. Teda zvyšujúca sa koncentrácia draslíka má priaznivý vplyv na stabilitu oboch quadruplexov. Hodnoty teploty topenia a zmeny van't Hoffovej entalpie, stanovené pre Hepa aptamér, sú približne o 5 °C resp. 25-30 kJ/mol nižšie. To potvrdzuje nižšiu stabilitu Hepa aptaméra v porovnaní s Fibri nameranú pri titračných experimentoch. Zaujímavá situácia nastáva pri použití vyšších koncentrácií DNA reťazcov. Z analýzy teplôt topenia ako funkcie koncentrácie oligonukleotidov vyplývajú rozdielne termodynamické vlastnosti aptamérov. Teplota topenia pre Hepa rastie s rastúcou koncentráciou vlákien, zatiaľ čo pre Fibri zostáva v meranom intervale konštantná. Táto vlastnosť Fibri aptamérov je známa a popisuje monomérnu formu tohto aptaméru v širokom koncentračnom rozsahu (Kankia a Marky 2001, Tang a Shafer 2006). Na rozdiel od všeobecného názoru, že Fibri formuje intramolekulárny quadruplex, existujú aj práce, kde bol Fibri identifikovaný ako bimolekulárny quadruplex (Fialová a kol. 2006). V našej práci to platí pre Hepa aptamér. Predpokladáme, že nárast T_m s rastúcou koncentráciou Hepa aptamérov poukazuje na možnosť formovania dimérov alebo vyšších agregátov, čo pravdepodobne prispieva k stabilizácii quadruplexového jadra.

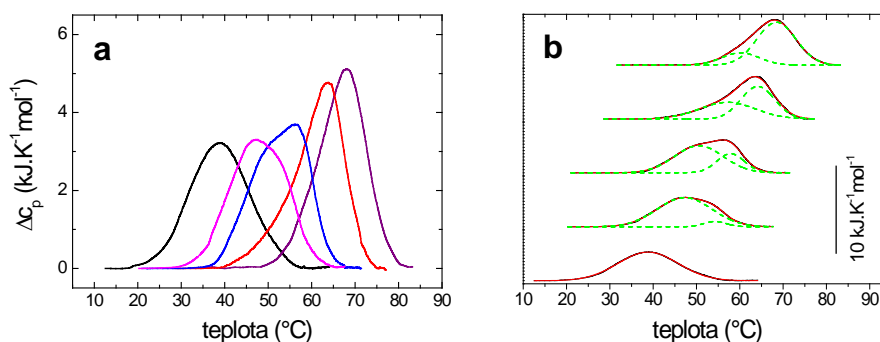
Ďalšou metódou, ktorú sme použili na termodynamickú charakteristiku aptamérov bola diferenčná kalorimetria (DSC). Teplotné prechody pre Fibri aptamér v prítomnosti rôznych koncentrácií draslíka (obrázok 5.2) majú typický tvar Gaussovej krivky, sú monofázové a so zvyšujúcou koncentráciou KCl sa maximá kriviek posúvajú k vyšším teplotám. Termodynamické parametre Fibri aptaméra majú s rastúcou koncentráciou iónov draslíka stúpajúcu tendenciu. Rastie teplota prechodu, zmena kalorimetrickej entalpie aj teplotná stabilita určená zmenou Gibbsovej energie. Hodnoty zmeny van't Hoffovej entalpie určené z DSC experimentu korešpondujú s teplotnými CD experimentami. Rovnako súhlasia aj s predošlými publikáciami zameranými na termodynamické parametre Fibri aptaméra (Kankia a Marky 2001, Olsen a kol. 2006, Pagano a kol. 2008, Olsen a Marky 2010). Termodynamika

Hepa aptaméra je o trochu zložitejšia, čomu nasvedčuje koncentračná závislosť teploty topenia a DSC denaturačné krivky (obrázok 5.3). Nakoľko v DSC experimentoch bola použitá 20 násobne vyššia koncentrácia oligonukleotidových vlákien, výrazne sa to prejavilo na charakteristikách denaturačných kriviek. Rastúca koncentrácia iónov draslíka mala, okrem rastu teploty topenia, za následok aj vznik dvojfázových teplotných prechodov.



Obrázok 5.2 DSC termogramy (a) a ich fity (b) Fibri aptaméra v 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, pri rastúcej koncentrácii KCl.

Pri nízkej iónovej sile je prechod monofázový s pomerne nízkou zmenou Gibbsovej energie. Jej hodnota 3.5 kJ/mol vypovedá o nedostatočnej stabilizácii komplexu. Zvýšenie koncentrácie iónov spôsobí rast ďalšieho píku s vyššou teplotou topenia a nízkou $\Delta G = 0.4$ kJ/mol. Postupne, s rastúcou iónovou silou vzrastá amplitúda druhého píku, pričom prvý ju stráca. Pri 500 mM koncentrácii KCl je predný pík výrazne menší ako zadný. Predpokladáme, že jednotlivé píky opisujú rôzny stupeň agregácie DNA vlákien u Hepa aptaméra, čo je prirodzená vlastnosť sekvencií bohatých na guanínové bázy (Davis 2004).

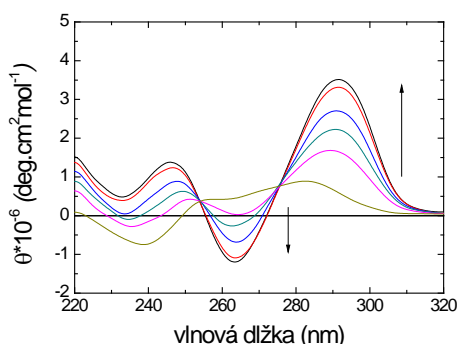


Obrázok 5.3 DSC termogramy (a) a ich fity (b) Fibri aptaméra v 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, pri rastúcej koncentrácii KCl

Pre ďalšie porovnanie vlastností aptamérov sme z CD denaturačných kriviek študovali ich teplotnú stabilitu, v prítomnosti 140 mM NaCl, 50 mM KCl a 140 mM NaCl + 50 mM KCl. Krivky závislosti elipticity pri 292 nm od teploty majú sigmoidálny tvar a s rastúcou teplotou CD intenzita klesá. Z hodnôt termodynamických veličín vidieť, že prítomnosť 140 mM NaCl spôsobila pokles T_m u oboch aptamérov, avšak Hepa- K^+ komplex je ovplyvnený výraznejšie. Prítomnosť Na^+ spôsobí aj pokles ΔH_{vH} topenia G-quadruplexov oboch aptamérov. Zo zistených hodnôt vyplýva väčší vplyv sodných katiónov na stabilitu Hepa- K^+ komplexu.

Teplotné prechody aptamérov v prítomnosti 140 mM NaCl a 50 mM KCl boli študované aj pomocou diferenčnej kalorimetrie. DSC krivka pre Fibri aptamér predstavuje monofázový teplotný prechod s teplotou topenia 46.2 °C, čo je o 2.7 °C menej ako bez prítomnosti sodných katiónov. Pokles o približne 17 kJ/mol pozorujeme aj na hodnote ΔH_{cal} . Naopak prítomnosť sodných katiónov má priaznivý vplyv na zmenu entropie. Môžeme to vysvetliť kozmotropnou povahou Na^+ , ktorý imobilizuje molekuly vody vo svojom okolí (Collins 1997) a tiež dostatočným tienením nábojov na fosfátoch čo prispieva k celkovej stabilizácii štruktúry. Entalpisko-entropická kompenzácia má za následok, že $\Delta G = 8.5$ kJ/mol je porovnateľná s hodnotou $\Delta G = 8.4$ kJ/mol bez prítomnosti sodných katiónov a teda, vplyv sodíka na stabilitu Fibri aptaméra je zanedbateľný. Toto zistenie podporujú aj predošlé výsledky, kedy sme ukázali, že sodík nemá na K^+ -sprostredkovanú tvorbu Fibri quadruplexov vplyv. Prítomnosť sodných katiónov sa u Hepa aptaméra prejaví v prvom rade na tvare DSC krivky. Zatiaľ čo v 50 mM KCl sa prídavný pík nachádza za hlavným a má vyššiu teplotu topenia a nízku stabilitu, prídanie 140 mM NaCl spôsobí, že dominantný pík popisuje druhý teplotný prechod, podobne ako je to pri vysokých koncentráciách KCl (300 mM a 500 mM). Z toho usudzujeme, že na tvar termogramu nemá výhradný vplyv typ iónov ale rovnako aj iónová sila, teda opäť tu dochádza okrem zbaľovania DNA do quadruplexovej formy aj k agregácii quadruplexov vplyvom vyššej iónovej sily (Hightower a kol. 2009). Výrazný vplyv na quadruplexovú štruktúru v prítomnosti rôznych koncentrácií K^+ a Na^+ bol pozorovaný aj na iných DNA sekvenciách (Rujan a kol. 2005). Napríklad telomérová sekvencia stavovcov tvorí v prítomnosti 140 mM NaCl antiparalelný quadruplex, pričom po pridaní 100 mM KCl sa táto konformácia mení na paralelnú typu vrtuľka. Telomérová sekvencia Tetrahymeny vykazuje v 100 mM NaCl zmes dvoch antiparalelných štruktúr (Phan a kol. 2004), zatiaľ čo v 5 mM NaCl je to štvorvláknová paralelná konformácia (Rujan a kol. 2005). Teda rozdielna iónová sila v tomto prípade nemá vplyv len na konformáciu ale aj na molekularitu quadruplexu.

5.2 Štruktúrne a termodynamické vlastnosti aptaméra Hepa29



Obrázok 5.4 CD spektrá Hepa29 aptaméra bez prítomnosti a v prítomnosti rozličných koncentrácií draselných iónov. S rastúcou koncentráciou K^+ rastú aj absolútne hodnoty CD signálu CD pásov (označené šípkou).

O dvojstavovej povahe tvorby 3-D štruktúry svedčí prítomnosť izoeliptických bodov pri 254 nm a 275 nm. Rovnaké spektrá ako v prítomnosti draslíka získame aj po pridaní 140 mM NaCl do tlmivého roztoku a následnej titrácii kationmi draslíka. Prítomnosť sodných iónov nemá na draslíkom sprostredkovanú tvorbu quadruplexov výraznejší vplyv, nakoľko nasýtenie spektier získame opäť až pri koncentráciách K^+ okolo 100 mM. Porovnaním väzobných izoterm zistíme, že interakcia s draslíkom v prítomnosti aj bez prítomnosti sodíka je takmer rovnaká. Z disociačných konštánt sme vypočítali zmeny Gibbsovej energie pre obidva tlmivé roztoky. Hodnoty $\Delta G^0 = -7$ kJ/mol a $\Delta G^0 = -6.7$ kJ/mol nasvedčujú, že aptamér má porovnateľnú stability v oboch roztokoch a prítomnosť sodíka nemá výrazný negatívny vplyv na viazanie draslíka.

Termodynamické parametre Hepa29 aptaméra sme určovali z DSC termogramov. Z tvaru denturačných kriviek sme zistili, že aptamér v týchto podmienkach denaturuje monofázovo a proces je opísaný Gaussovou krivkou. S rastúcou koncentráciou K^+ rastie aj teplota prechodu a píky sa posúvajú k vyšším teplotám. Pomer $\Delta H_{vH}/\Delta H_{cal}$ sa so stúpajúcou iónovou silou klesá. Predpokladáme, že s rastúcou koncentráciou iónov draslíka, dochádza k jasnejšie definovanej štruktúre aptaméra a na rozdiel od čiastočnej agregácie, prípadne prevažujúcej dimérnej formy pri nízkych iónových silách sa efektívnejším tienením nábojov výraznejšie stabilizuje monoména forma aptaméra. So zvyšujúcou sa iónovou silou dochádza

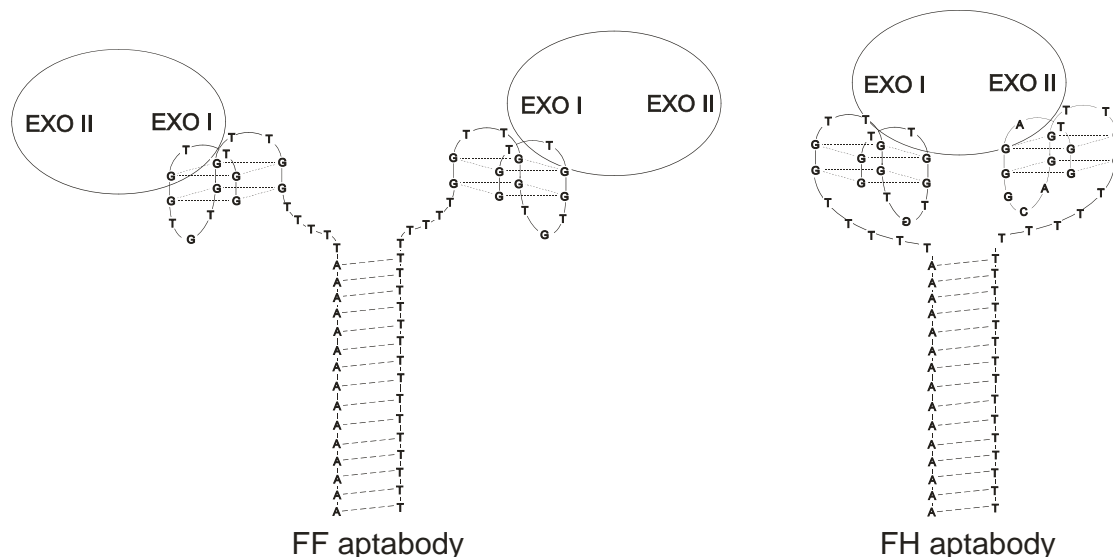
Hepa29 je anti-trombínový aptamér špecificky sa viažuci na heparínové väzobné miesto. Nakoľko doposiaľ neboli bližšie určené jeho štruktúrne a termodynamické charakteristiky, študovali sme jeho schopnosť vytvárať G-quadruplexy a teplotnú stabilitu v prítomnosti draslíka a sodíka. Podobne ako u predošlých oligonukleotidov, so zvyšujúcou sa koncentráciou K^+ pozorujeme aj u Hepa29 nárast Cottonových pásov CD kriviek, pričom nasýtenie dosahujeme až pri koncentrácii K^+ vyššej ako 100 mM. Kladný pás s maximom pri 292 nm a záporný s minimom pri 265 nm opisujú vznik antiparalelných tetraplexov (obrázok 5.4).

k výraznej stabilizácii Hepa29 aptaméra, kedy ΔG rastie z 1.8 kJ/mol na 8.4 kJ/mol. DSC termogramy majú aj pri stálej koncentrácii Na^+ (140 mM) a rastúcej koncentrácii K^+ monofázový charakter. Prítomnosť 140 mM NaCl sa však prejaví už pri najnižšej meranej koncentrácii draselných kationov. Výrazný stabilizujúci vplyv sodíka pozorujeme na hodnotách zmeny kalorimetrickej entalpie aj teploty topenia. Zmeny van't Hoffovej entalpie majú opäť jemne klesajúcu tendenciu a pomer entalpií taktiež s rastúcou iónovou silou klesá. Rozdiely však už nie sú také markantné ako v predchádzajúcom experimente. S rastúcou koncentraciou K^+ rastie celková stabilita Hepa29 aptaméra. Pri 100 mM KCl sa hodnoty ΔG získané v prítomnosti a bez prítomnosti NaCl vyrovnajú. Môže to súvisieť s predchádzajúcim zistením, že pri 100 mM koncentrácii draslíka je G-quadruplex aj v 140 mM NaCl kompletne sformovaný a ďalšie zvyšovanie koncentrácie K^+ už na jeho konformáciu nemá výraznejší vplyv. Zásadným výsledkom experimentov vykonaným s Hepa29 aptamérom je fakt, že prídavné sekvencie nespárovanej časti nukleotidov a duplexu poskytujú Hepa quadruplexu dostatočnú stabilitu na to, aby aj pri vyšších koncentráciách aptamérov nebola pre stabilizáciu nevyhnutná agregácia DNA vlákien.

5.3 Štúdium konformačných a termodynamických vlastností aptamérových dimérov

Na štúdium DNA aptamérových dimérov a porovnanie ich vlastností s klasickým jednoreťazcovým Fibri aptamérom sme použili cirkulárny dichroizmus (CD), diferenčnú kalorimetriu a teplotnú gradientnú gélovú elektroforézu. Študovali sme dva typy dimérov – homodimér (FF) a heterodimér (FH), skonštruované na princípe hybridizácie ich prídavných sekvencií (obrázok 5.5). Diméry, označené ako aptabody, obsahujú dve väzobné miesta, homodimér FF sa špecificky viaže na dve molekuly trombínu v ich fibrinogénových väzobných miestach, heterodimér FH sa jednou časťou viaže na fibrinogénové, druhou na heparínové väzobné miesto na trombíne.

Základnou podmienkou inhibície koagulačnej funkcie trombínu aptamérom je vytvorenie špecifickej trojdimenzionálnej štruktúry. Podobne ako u klasických jednoreťazcových anti-trombínových DNA aptamérov je väzobným motívom aptabody guanínový quadruplex. CD spektrá jednotlivých komponentov aptamérových dimérov, rovnako ako u klasického anti-trombínového aptaméra Fibri, opisujú vznik antiparalelného typu quadruplexu.



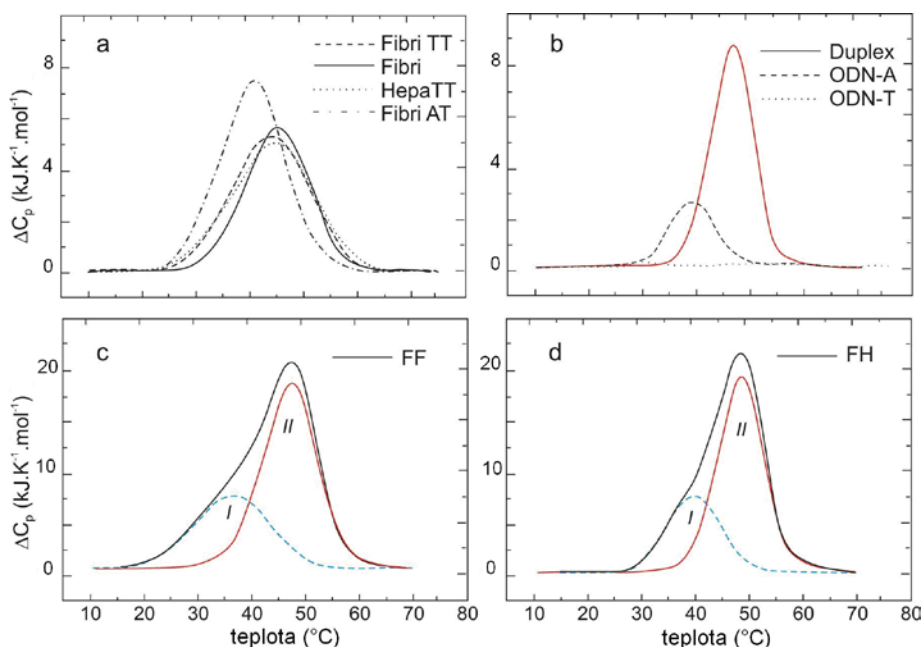
Obrázok 5.5 Aptamérové diméry – homodimér FF aptabody a heterodimér FH aptabody, naviazané na molekuly trombínu. EXO I predstavuje fibrinogénové väzobné miesto a EXO II reprezentuje heparínové väzobné miesto na trombíne.

U oligonukleotidov sa v prítomnosti iónov draslíka vytvára pík s maximom pri 292 nm a dochádza k posunu minima záporného pásu z 267 nm na 249 nm u FibriAT a okolo 260 nm u FbriTT a HepaTT. Posun je pravdepodobne spôsobený pripojenými sekvenciami $dA_{15}T_{15}$ v prípade FibriAT a dT_{20} u zvyšných dvoch oligonukleotidov. Z porovnania spektier s Fibri aptamérom môžeme usudzovať, že v prítomnosti iónov draslíka dochádza k formovaniu neusporiadaných štruktúr do antiparalelných quadrupelxov (Poniková a kol. 2011).

Vytváranie aptamérových dimérov je spojené aj s hybridizáciou duplexovej časti molekuly. Rovnako ako quadruplex aj formovanie duplexu môžeme pozorovať na CD spektrách. V prítomnosti vyššej iónovej sily dochádza ku kompletnej hybridizácii charakterizovanej vlnovkou s lokálnym minimom pri 266 nm a lokálnym maximom pri 259 nm. Rovnaký vlnovkový motív CD spektra, avšak s výraznejšími lokálnymi extrémami bol pozorovaný pre poly(dA.dT) v duplexovej konformácii (Luck a kol. 1974). Môžeme teda predpokladať, že vlnovkový motív na CD spektrách zobrazujúci usporiadanie molekúl v homodimére FF a heterodimére FH odráža hybridizáciu prídavných sekvencií. Rovnako ako oligonukleotidové monoméry aj diméry sú schopné vytvárať quadruplexové štruktúry na Fibri a Hepa hlavičkách. U oboch dimérov to pozorujeme ako výrazné maximá pri 292 nm. Minimum, obyčajne sa vyskytujúce pri 265 nm, je prekryté vlnovkovým motívom indikujúcim tvorbu duplexu. Naše výsledky nasvedčujú tomu, že vo vhodných podmienkach oba typy aptabody vytvárajú G-quadruplexové väzobné motívy vo Fibri a Hepa hlavičkách a sú hybridizované do duplexu na adenínových a tymínových reťazcoch.

Na zistenie termodynamických vlastností aptamérových dimérov a ich komponentov boli urobené DSC experimenty (obrázok 5.6). Ako prvá bola študovaná denaturácia 15-méru Fibri a jednotlivých častí aptamérových dimérov – FibriTT, HepaTT a FibriAT (obrázok 5.6a). Termogram Fibri 15-méru opisuje vratný monofázový prechod so symetrickým tvarom a teplotou topenia, T_m , 46.2 °C. Integráciou denaturačnej krivky získame hodnotu zmeny entalpie $\Delta H_{cal} = 92.0$ kJ/mol, pomocou ktorej vypočítame zmenu Gibbsovej energie, $\Delta G = 8.5$ kJ/mol. Tieto hodnoty súhlasia s hodnotami publikovanými v iných prácach: 49.1 °C a 9.6 kJ/mol (Kankia a Marky 2001), 52 °C a 8.4 kJ/mol (Olsen a Marky 2010) alebo 53 °C a 7.9 kJ/mol (Pagano a kol. 2008), pre T_m , resp. ΔG . Hodnota teploty topenia je v našom meraní nižšia. Predpokladáme, že táto odchýlka môže byť spôsobená použitím iného tlmivého roztoku, v ktorom sa nachádza pomerne vysoká koncentrácia NaCl a nižšia koncentrácia KCl v porovnaní s experimentmi v citovaných prácach. Prítomnosť sodných katiónov má na teplotu topenia aptamérov nepriaznivý vplyv (viď. časť 5.1), avšak stabilita u Fibri aptaméra zostáva zachovaná. Krivky jednotlivých komponentov aptamérových dimérov majú symetrický tvar a predstavujú monofázové prechody. Termodynamické parametre pre FibriTT majú nižšie hodnoty v porovnaní s Fibri 15-mérom. To svedčí o destabilizačnom efekte tymínového chvosta na quadruplexovú hlavičku (Viglaský a kol. 2010). Na druhej strane FibriAT má omnoho priaznivejšiu hodnotu zmeny kalorimetrickej entalpie. Pretože FibriTT a FibriAT majú rovnakú quadruplexovú hlavičku, masívny DSC pík u FibriAT pravdepodobne súvisí s vplyvom tymínovo-adenínového chvosta. S ohľadom na vysokú štruktúrnu variabilitu quadplexov (Hardin a kol. 2001), použili sme program mfold (Markham a Zuker 2005) na predpovedanie formácie alternatívnych štruktúr. Z analýzy vyplynulo, že päť tymínov a päť adenínov môžu formovať stabilný duplex spájajúci dve FibriAT molekuly. Dôvodom, prečo ΔH_{cal} a ΔG je výrazne vyššia v porovnaní s Fibri a FibriTT môže byť fakt, že denaturačná krivka opisuje dva separátne denaturačné procesy s podobnou teplotou topenia; denaturáciu G-quadruplexu a duplexu. Termogramy pre FibriTT a HepaTT majú podobný tvar s takmer rovnakou teplotou topenia, avšak s rozdielnou stabilitou. HepaTT má však výrazne vyššiu hodnotu $\Delta G = 9$ kJ/mol, v porovnaní s FibriTT ($\Delta G = 7.7$ kJ/mol). Nakoľko sú prídavné sekvencie chvostov oboch oligonukleotidov rovnaké, pozostávajúce len z tymínových báz, predpokladáme, že ΔG je ovplyvnená rozdielnymi quadruplexovými hlavičkami. Príčina tohto správania je pravdepodobne spojená so zložitejšou termodynamikou Hepa hlavičky, ktorá na rozdiel od Fibri vykazuje koncentračne závislé termodynamické charakteristiky (viď. časť 5.1)

Pre bližšie určenie termodynamickej stability aptabody sme študovali DSC krivky duplexovej časti diméru a jednotlivé jednoreťazcové oligonukleotidy ODN-A a ODN-T (obrázok 5.6b). ODN-T je zložený z 20 tymínov a nevykazuje žiaden teplotne závislý konformačný prechod v rozmedzí 0 °C – 100 °C, čo vypovedá o neprítomnosti DNA agregátov. Na druhej strane, u ODN-A, ktorého postupnosť obsahuje 10 adenínov a 5 tymínov, pozorujeme monofázový teplotný prechod, čo opäť potvrdzuje prítomnosť A-T párovania, pri ktorom sa môžu formovať duplexy, alebo párovanie prebieha v rámci jednej molekuly za vzniku jednoduchých slučiek. Termogram duplexovej časti diméru zloženého z ODN-A:ODN-T v mólovom pomere 1:1 má teplotu topenia a ΔG duplexu je výrazne vyššiu ako samotné ODN-A. Tento výsledok poukazuje na prítomnosť iba zanedbateľnej populácie komplexov tvorených iba ODN-A vláknami.



Obrázok 5.6 DSC termogramy individuálnych komponentov aptamérových dimérov (FibrTT, HepaTT, FibrAT) a FibrI aptaméra (a), duplexovej časti aptabody a jednotlivých reťazcov ODN-A a ODN-T (b), FF homodiméra (c) a FH heterodiméra (d).

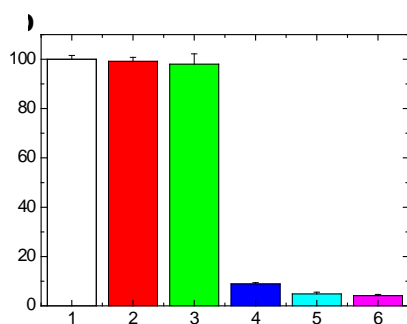
Interakcia FibrAT a FibrTT vyústi do sformovania aptamérového diméru – FF aptabody. Termogram FF diméru je charakterizovaný komplexnejším prechodom, opisujúcim superpozíciu dvoch monofázových prechodov (obrázok 5.6c). Prvý z nich predstavuje denaturáciu dvoch G-quadruplexových hlavičiek aptabody a druhý pripisujeme topeniu duplexovej časti. Získané teploty topenia sú podobné ako u jednotlivých komponentov.

Formovanie aptamérového diméru nepriaznivo vplýva na stabilitu quadruplexových hlavičiek. Podobne ako homodimér aj FH heterodimér denaturuje asymetrickým multifázovým prechodom (obrázok 5.6d). Fitovanie multi-píkovým gaussiánom rozlíšilo dva individuálne dvoj-stavové prechody. Opäť pozorujeme pokles stability quadruplexov oproti individuálnym komponentom. Stabilita duplexovej časti je prítomnosťou quadruplexov ovplyvnená len minimálne. V súhrne môžeme povedať, že termodynamické charakteristiky u oboch dimérov sú ovplyvnené prítomnosťou druhého quadruplexu a prídavnej duplexovej časti. Napriek tomu, oba aptamérové diméry vykazujú dostatočnú teplotnú stabilitu a môžu byť použité ako potenciálne trombínové inhibítory.

Elektroforetická separácia, prebiehajúca v nedenaturačných podmienkach, bola použitá na overenie molekularity DNA oligonukleotidov. Elektroforetické experimenty boli urobené na Katedre biochémie Prírodovedeckej fakulty UPJŠ v Košiciach v spolupráci s Doc. RNDr. V. Víglaským, PhD. a Mgr. Katarínou Tlučkovou a opublikované v spoločnej práci (Poniková a kol. 2011). Štandardná PAGE jednoznačne ukázala, že Fibri, FibriTT, Hepa a HepaTT sa pohybujú v gély v jednom jasne ohraničenom páse. Naopak FibriAT má pás rozmazaný, pričom výraznejšia časť sa pohybuje pomalšie ako u FibriTT. Tento fakt podporuje vyššie uvedený názor, že u FibriAT dochádza k vzniku viacerých konformačných stavov. FF a FH komplexy majú podobnú pohyblivosť korešpondujúcu s homo- a heterodiménnymi molekulami, avšak pri iónovej sile použitej v PAGE experimente sa vyskytovali aj neasociované FibriTT a/alebo FibriAT molekuly a HepaTT a/alebo FibriAT molekuly. Teplotná denaturácia, pozorovaná teplotnou gradientnou gélovou elektroforézou (TGGE), sa prejavuje ako disociácia ODN-A:ODN-T duplexu na oligonukleotidy ODN-A a ODN-T. Rovnaký proces sledujeme aj pre komplexy FF a FH. Disociácia DNA má za následok zvýšenie mobility, nakoľko jednotlivé štruktúry sa pohybujú v géli značne rýchlejšie ako aptamérové diméry a experiment jasne ilustruje disociáciu dimérových komplexov.

5.4 Štúdium inhibičnej aktivity DNA aptamérov a aptamérových dimérov

Formovanie quadruplexovej štruktúry u aptamérov a ich dostatočná teplotná stabilita však nemusí vždy korelovať so schopnosťou naviazať sa na molekulu trombínu a inhibovať jeho koagulačnú aktivitu. Pre overenie inhibičných vlastností aptamérov sme urobili experimenty v ktorých sme študovali trombínom sprostredkované formovanie fibrínových gélov v prítomnosti a bez prítomnosti aptamérov. Sledovali sme inhibičné vlastnosti jednoduchých quadruplexov – Fibri a Hepa aptamérov, Hepa29 – quadruplexu s pripojenými nespárovanými



Obrázok 4.20 Trombínom katalyzovaná tvorba fibrínových gélov bez prítomnosti inhibítora (1), a v prítomnosti aptamérov Hepa (2), Hepa29 (3), Fibri (4) a dvoch typov aptamérových dimérov – FF aptabody (5) a FH aptabody (6) vo väzobnom tlmivom roztoku s 50 mM KCl.

sekvenciami a duplexovou časťou a aptamérových homo- a heterodimérov FF a FH aptabody. Inhibícia aptamérov bez prítomnosti katiónov draslíka je zanedbateľná. Dôvodom je neprítomnosť väzobného motívu – guanínového quadruplexu, ktorý sa v daných podmienkach bez interakcie s iónmi draslíka nevytvára ani u jedného z aptamérov. Po pridaní 50 mM KCl koagulačná schopnosť trombínu v prítomnosti niektorých z aptamérov značne poklesne. Fibri aptamér vykazuje priemerne dvojnásobne nižšiu inhibičnú aktivitu v porovnaní s dimérmami. Toto zistenie je prekvapivé, ak vezmeme do úvahy, že jeho quadruplex, zodpovedný za interakciu s

trombínom je stabilnejší ako quadruplexy u dimérov. Napriek tomu, získané výsledky vyššieho inhibičného efektu aptamérových dimérov sú v zhode s predošlými pozorovaniami lepších väzobných vlastností aptabody voči molekule trombínu v porovnaní s Fibri aptamérom (Hianik a kol. 2008, 2009). Vyššia inhibičná aktivita aptabody je tiež v dobrej zhode s publikovanými prácami, kedy bol pozorovaný 2-3 násobne vyšší antikoagulačný efekt multivalentných cirkulárnych aptamérov (di Giusto a King 2004) a až 9 násobne lepšia inhibícia pri použití bivalentných komplexov (Kim a kol. 2008). Prítomnosť draslíka neovplyvňuje inhibičnú aktivitu Hepa a Hepa29 aptamérov. Tento výsledok bol očakávaný, nakoľko aptaméry sú špecifické voči heparínovému väzobnému miestu a teda nedochádza ku kompetícii s molekulami fibrinogénu.

6 Záver

V prvej časti dizertačnej práce sme sa venovali štúdiu konformačných a termodynamických charakteristík väzobných motívov dvoch anti-trombínových aptamérov. Pomocou CD spektroskopie sme ukázali, že oba aptaméry formujú stabilné guanínové quadruplexy v prítomnosti draselných iónov. Izoelipticke body nachádzajúce sa v spektrách nasvedčovali dvoj-stavovej povahe tvorby terciárnej štruktúry. Na rozdiel od draslíka, katióny sodíka takúto schopnosť nevykazovali, nakoľko spektrá väzobných motívov oboch anti-trombínových

aptamérov nenadobúdali charakteristiky porovnateľné so spektrami komplexov aptamér-draslík. Neprítomnosť izoeliptických bodov naznačovala nekooperatívne zmeny v konformácii oligomérov, prípadne poukazovala na výskyt iných konformácií – náhodných štruktúr alebo paralelných quadruplexov. Stabilita väzobných motívov v prítomnosti draslíka bola výrazne vyššia v porovnaní so sodíkom. Pridanie sodných iónov ku komplexom aptamér – draslík vyvolalo iba zmenu v teplote topenia, zmena Gibbsovej energie bola ovplyvnená minimálne. Napriek tomu sme mohli pozorovať výraznejší vplyv sodíka na Hepa aptamér. Rozdiel medzi aptamérmi sa prejavil pri vyšších koncentráciách vlákien. Zatiaľ čo Fibri má rovnaké termodynamické charakteristiky vo veľkom intervale koncentrácií, u Hepa s rastúcou koncentráciou dochádza k zvyšovaniu teploty topenia, čo poukazuje na formovanie agregátov. Tento záver potvrdili aj kalorimetrické merania, pričom s rastúcou iónovou silou vykazovali agregáty rozdielne charakteristiky. Môžeme teda povedať, že substitúcia báz v aptamére nemá vplyv na tvorbu quadruplexu, avšak na svoju stabilizáciu vyžaduje formovanie agregátov.

V ďalšej časti sme sa venovali štruktúrnym a termodynamickým vlastnostiam Hepa29 aptaméra, ktorý pozostáva z quadruplexového jadra Hepa a prídavných stabilizujúcich sekvencií. Rovnako ako Fibri a Hepa aj Hepa29 tvorí v prítomnosti draslíka stabilné quadruplexy a pridanie sodíka nemá na ich tvorbu výraznejší vplyv. Ukázali sme, že prídavné sekvencie nespárovanej časti nukleotidov a duplexu poskytujú Hepa quadruplexu dostatočnú stabilitu na to, aby pri vyšších koncentráciách aptaméra nebola pre stabilizáciu potrebná agregácia DNA reťazcov.

V tretej časti sme opísali aptamérové diméry a porovnali sme ich charakteristiky s klasickým Fibri aptamérom. Naviazanie prídavných sekvencií na quadruplexové hlavičky nemalo na konformáciu väzobných motívov vplyv, jemne nepriaznivo ovplyvnilo ich termodynamickú stabilitu. Napriek tomu oba aptamérové diméry vykazovali dostatočnú teplotnú stabilitu na to, aby predstavovali potenciálne trombínové inhibítory.

Inhibičnú aktivitu aptamérových dimérov i jednotlivých aptamérov sme skúmali v záverečnej časti našej práce. Aptaméry Hepa a Hepa29 nemali na trombínom sprostredkovanú tvorbu fibrínových gélov vplyv. Tento výsledok nebol prekvapujúci, nakoľko sa špecificky viažu na heparínové väzobné miesto na trombíne, teda v *in vitro* podmienkach nezabraňovali konverzii fibrinogénu na fibrín. Formovaniu fibrínových gélov zabráňovali zvyšné tri potenciálne inhibítory. V porovnaní s Fibri aptamérom však oba diméry vykazovali dvojnásobne lepšiu inhibičnú schopnosť. Nakoľko heterodimér obsahuje vo svojej štruktúre iba jeden kompetitívny inhibítory (quadruplexovú hlavičku Fibri), očakávali sme, že jeho schopnosti budú porovnateľné s Fibri aptamérom. Prítomnosť Hepa quadruplexu

však efektívne prispievala k celkovej schopnosti antikoagulačnej aktivity heterodiméra, či už pevnejšou väzbou s trombínom vďaka výrazne nižšej disociačnej konštante Hepa quadruplexu oproti Fibri, alebo vplyvom alosterických zmien vo väzobných miestach na trombíne po naviazaní ligandu.

Zoznam literatúry použitej v autoreferáte

- Antonacci, C., Chaires, J. B., Sheardy, R. D. (2007) *Biochem.* 46, 4654
- Bock, L. C., Griffin L. C., Latham, J. A., Vermaas, E. H., Toole, J. J. (1992) *Nature* 355, 564
- Bunka, D. H. J., Platonova, O., Stockley, P. G. (2010) *Curr. Op. Pharm.* 10, 557
- Bunka, D. H. J., Stockley, P. G. (2006) *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 588
- Cho, E. J., Lee, J-W., Ellington, A. D. (2009) *Annu. Rev. Anal. Chem.* 2, 241
- Collins K. D. (1997) *Biophys. J.* 72, 65
- Cox, J. C., Hayhurst, A., Hesselberth, J., Bayer, T. S., Georgiou, G., Ellington, A. D. (2002) *Nucleic Acids Res.* 30, e108
- Davis J. T. (2004) *Angew. Chem. Int. Ed.* 43, 668
- Di Giusto, D. A., King, G. C. (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 46483
- Di Giusto, D. A., Wiatschesslaw, W. A., Gooding, J. J., Messerle, B. A., king. G. C. (2005) *Nucleic Acids Res.* 33, e64
- Ellington, A. D., Szostak, J. W. (1990) *Nature* 346, 818
- Famulok, M., Hartig, J. S., Mayer, G. (2007) *Chem. Rev.* 107, 3715
- Fialová, M., Kypr, J., Vorlíčková, M. (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 344, 50
- Guo, Q., Lu, M., Kallenbach, N. R. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 15293
- Hardin, C. C., Perry, A. G., White, K. (2001) *Biopolymers (Nucleic Acid Sciences)* 56, 147
- Hasegawa, H., Taira, K., Sode, K., Ikebukuro, K. (2008) *Sensors* 8, 1090
- Hianik, T., Grman, I., Karpišová, I. (2009) *Chemical Communications.* 41, 6303
- Hianik, T., Porfireva, A., Grman, I., Evtugyn, G. (2008) *Protein Pept. Lett.* 15, 799
- Hicke, B. J., Watson, S. R., Koenig, A., Lynott, C. K., Bargatze, R. F., Chang, Y. F., Ringquist, S., Moon-Mcdermott, L., Jennings, S., Fitzwater, T., Nhan, H. L., Varki, N., Albinana, I., Willis, M. C., Varki, A., Parma, D. (1996) *J. Clin. Investig.* 98, 2688
- Hightower, J. B., Olmos, D. R., Walmsley, J. A. (2009) *J. Phys. Chem. B* 113, 12214
- Jayasena, S. D.: Aptamers (1999) *Clinical Chem.* 45, 1628
- Kankia, B. I., Barany, G., Musier-Forsyth, K. (2005) *Nucl. Acids Res.* 33, 4395
- Kankia, B. I., Marky, L. A. (2001) *J. Am. Chem. Soc.* 123, 10799

- Kim, Y., Cao, Z., Tan, W. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 5664
- Lancellotti, S. De Cristofaro, R. (2009) *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem.* 7, 19
- Lee, W., Obubuafo, A., Lee, Y., Davis, L. M., Soper, S. A. (2010) *J. Fluorescenc.* 20, 203
- Lu, M., Guo, Q., Kallenbach, N. R. (1993) *Biochemistry* 32, 598
- Luck, G., Triebel, H., Waring, M., Zimmer, C. (1974) *Nucleic Acids Res.* 1, 503
- Macaya, R. F., Schultze, P., Smith, F. W., Roe, J.A, Feigon, J. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 3745
- Marathias, V. M., Bolton, P. H. (1999) *Biochemistry* 38, 4355
- Marathias, V. M., Bolton, P. H (2000) *Nucl. Acids Res.* 28, 1969
- Markham, N. R., Zuker, M. (2005) *Nucleic Acids Res.* 33, W577
- Marky, L. A., Breslauer, K. J. (1987) *Biopolymers* 26, 1601
- Morris, K. N., Jensen, K. B., Julin, C. M., Weil, M., Gold, L. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 2902
- Nagatoishi, S., Tanaka, Y., Tsumoto, K. (2007) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 352, 812
- Nimjee, S. M., Rusconi, C. P., Harrington, R. A., Sullenger, B. A. (2005a) *Trends. Cardiovasc. Med.* 15, 41
- Nimjee, S. M., Rusconi, C. P., Sullenger, B. A.(2005b) *Annu. Rev. Med.* 56, 555
- Olsen, C. M., Gmeiner, W. H., Marky, L.A. (2006) *J. Phys. Chem. B.* 110, 6962
- Olsen, C. M., Marky, L. A. (2010) *Methods Mol. Biol.* 608, 147
- Paborsky, L. R., McCurdy, S. N., Griffin, L. C., Toole, J. J., Leung, L. L. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 20808
- Pagano, B., Martino, L., Randazzo, A., Giancola, C. (2008) *Biophys. J.* 94, 562
- Phan, A. T., Modi, Y. S., Patel, D. J. (2004) *J. Mol. Biol.* 338, 93
- Poniková, S., Tlučková, K., Antalík, M., Víglaský, V., Hianik, T. (2011) *Biophys. Chem.* 155, 29
- Rujan, I. N., Meleney, J. C., Bolton, P. H. (2005) *Nucleic Acids Res.* 33, 2022
- Rydel, T. J., Tulinsky, A., Bode, W., Huber, R. (1991) *J. Mol. Biol.* 221, 583
- Schultze, P., Macaya, R. F., Feigon, J. (1994) *J. Mol. Biol.* 235, 1532
- Smirnov, I., Shafer, R. H. (2000) *J. Mol. Biol.* 296, 1
- Stone S. R., Braun, P. J., Hofsteenge, J. (1987) *Biochemistry* 26, 4617
- Tasset, D. M., Kubik, M. F., Steiner, W. (1997) *J. Mol. Biol.* 272, 688
- Tang, Ch-F., Shafer, R. H. (2006) *J. Am. Chem. Soc.* 128, 5966
- Thiel, K. W., Giangrande P. H. (2009) *Oligonucleotides* 19, 209
- Trajkovski, M., Sket, P., Plavec, J. (2009) *Org. Biomol. Chem.* 7, 4677

- Tsiang, M., Gibbs, C. S., Griffin, L. C., Dunn, K. E., Leung, L. K. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 19370
- Tuerk, C., Gold, L. (1990) *Science* 249, 505
- Víglaský, V., Antalík, M., Bagel'ová, J., Tomori, Z., Podhradský, D. (2000) *Electrophoresis* 21, 850
- Víglaský, V., Bauer, Ľ., Tlučková, K., Javorský, P. (2010) *J. Nucleic Acids.* (2010) pii: 820356
- Wagner-Whyte, J., Khuri, S. F., Preiss, J. R., Kurz, J. C., Olson, K., Hatala, P., Boomer, R. M., Fraone, J. M., Brosnan, N., Makim, A. (2007) *J. Thromb. Haemost. (ISTH Congress abstracts)*
- Wang, K. Y., McCurdy, S., Shea, R. G., Swaminathan, S., Bolton, P.H. (1993) *Biochemistry* 32, 1899
- Wu, Q., Tsiang, M., Sadler, J. E. (1992) *J. Biol. Chem.* 34, 24408

Zoznam publikácií autora dizertácie súvisiacich s problematikou

- ADC 1 Hianik, T., Wang, X., Tashlitsky, V., Oretskaya, T., **Poniková, S.**, Antalík, M., Ellis, J. S., Thompson, M. : Interaction of cationic surfactants with DNA detected by spectroscopic and acoustic wave techniques. *Analyst*, Vol. 135, No. 5 (2010), S. 980-986
- ADC 2 **Poniková, S.**, Tlučková, K., Antalík, M., Víglaský, V., Hianik, T. : The circular dichroism and differential scanning calorimetry study of the properties of DNA aptamer dimers. *Biophysical Chemistry*, Vol. 155, No. 1 (2011), S. 29-35
- ADD **Poniková S.**, Antalík, M., Hianik, T. : A circular dichroism study of the stability of guanine quadruplexes of thrombin DNA aptamers at presence of K^+ and Na^+ ions. *General Physiology and Biophysics*, Vol. 27, No. 4 (2008), S. 271-277
- AEG 1 Hianik, T., **Poniková, S.**, Grman, I., Antalík, M. : The study of the mechanisms of interction of the thrombin with DNA aptamers. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters*, Vol. 36, Suppl. 1 (2007) S. 200
- AEG 2 **Poniková, S.**, Anatlík, M., Hianik, T. : A circular dichroism study of the stability of guanine quadruplexes of thrombin DNA aptamers at presence of potassium and sodium. *FEBS Journal*, Vol. 275, Suppl. 1 (2008), S. 404
- AFD **Poniková, S.**, Antalík, M., Hianik. T. : The conforamntional and thermodynamic properties of DNA aptamer dimers. *6th International Conference Structure and Stability of Biomacromolecules*, Košice : Institute of Experimental Physics SAS, 2009, S. 73-74
- AFL 1 **Poniková S.**, Antalík, M., Hianik, T. : Interaction of DNA aptamers with potassium ions. *Structure and Stability of Biomacromolecules SSB 2007*, Košice : Institute of Experimental Physics SAS, 2007, S. 61-62
- AFL 2 **Poniková, S.**, Antalík, M., Hianik, T. : A CD spectroscopy study of the formation of guanine quadruplexes by DNA aptamers that selectively bind thrombin at different exosites. *Proceedings of the III. Slovak Biophysical Symposium*, Bratislava : FMFI UK, 2008, S. 75-76
- AFK **Poniková, S.**, Antalík, M., Hianik, T. : Thermal stability of thrombin binding aptamers in the presence of stabilizing cations. *Regional Biophysics Conference 2007*, Szeged: Institute of Biophysics, 2007, S. 80

Summary

In present work we studied conformational and thermodynamic properties of anti-thrombin DNA aptamers, that specifically bind to fibrinogen-recognition exosite (Fibri) and heparin binding exosites (Hepa) on human α -thrombin. We showed that both binding motifs form stable guanine quadruplexes in presence of potassium. Sharp contrast between aptamers was observed with increase of oligonucleotide concentration. While Fibri remains in wide concentration interval in monomeric form, Hepa forms aggregates which support quadruplex stability. However, when flanked sequences have been added to Hepa (Hepa29) the aptamers was in monomeric form in all concentration range studied. Further we applied circular dichroism, differential scanning calorimetry and electrophoretic measurements to study the properties of novel bioengineered DNA aptamer dimers and compared them with canonical single stranded aptamer Fibri. Homodimer FF (with two binding motifs to fibrinogen-recognition exosite) and heterodimer FH (with binding motif to fibrinogen-recognition exosite and second to heparin binding exosite on thrombin molecule) was constructed based on hybridization of their supported parts. Both dimers form stable G-quadruplexes in presence of potassium ions. The thermal stability is slightly lower in comparison with Fibri, but sufficient for practical application. Fibri and both FF and FH dimers exhibit potassium-dependent inhibitory effect on thrombin-mediated fibrin gel formation, but for dimers this inhibition is in average two-fold higher than those of canonical single stranded aptamer Fibri.