

Povzetek

V okviru doktorske disertacije smo se osredotočili na nukleotidne ponovitve d(GGGAGCG), ki jih med seboj povezujejo adeninski ostanki in jih najdemo znotraj regulacijske regije gena PLEKGH3 na štirinajstem človeškem kromosomu. Gen je med drugim udeležen pri regulaciji razvoja in delovanja nevronov in njegove *de novo* delecije so bile povezane z razvojem avtizma. Najenostavnejša oligonukleotida, ki ju sestavimo iz dveh d(GGGAGCG) ponovitev sta oligonukleotida d(GGGAGCGAGGGAGCG), VK1, in d(GCGAGGGAGCGAGGG), VK34. S strukturnega vidika sta zelo zanimiva, saj bi se lahko po znanih podatkih iz literature zvila v G-kvadrupleks z dvema G-kvartetoma med seboj povezana z izboklinami ali pa bi G-kvadrupleksa vsebovala GCGC-kvartet. Hkrati so raziskovalci odkrili veliko z gvanini bogatih zaporedij v delih človeškega genoma, za katera ne morejo z gotovostjo trditi, da se zvijajo v G-kvadruplekse. Predpostavili smo, da bi oligonukleotida VK1 in VK34 lahko tvorila zvitja različna od G-kvadrupleksov. Potencialno lahko ti novi strukturni motivi v biološko pomembnih regijah predstavljajo tarče za zdravilne učinkovine.

Ugotovili smo, da se oligonukleotida VK1 in VK34 zvijeta v strukturi, ki spadata v novo družino štirivijačnih zvitij, ki smo jo poimenovali AGCGA-kvadrupleksi. Do sedaj znani štirivijačni družini DNA sta bili le strukturni družini G-kvadrupleksov in i-motivov. Dokazali smo, da se oligonukleotid VK1 zviije v simetrično dimerno strukturo s štirimi G-C baznimi pari v Watson-Crick geometriji, ki tvorijo jedro strukture, z dvema G-A baznima paroma v N1-N7 karbonil amino geometriji naloženima na vsako stran G-C jedra in s šestimi G-G baznimi pari v N1-karbonil simetrični geometriji. Po trije G-G bazni pari na vsaki strani AGCGA jedra strukture VK1 se razporedijo v dve »nazaj-zviti« GGG zanki.

Oligonukleotid VK34 se lahko zviije v dimerno ali tetramerno strukturo. Pretvorba iz dimera v tetramer lahko poteče spontano ali pa se pospeši pri večjih koncentracijah oligonukleotida in ob dodatku K^+ , Na^+ ali NH_4^+ ionov. Za obe zelo simetrični strukturi je značilno, da se po dva G-A bazna para v N1-N7 karbonil amino geometriji povežeta v GAGA-kvarteta naložena eden na drugega, ki tvorita GAGA jedro strukture. Na GAGA jedro se naložijo GCGC-kvarteti velikega (tetramer) ali malega (dimer) žleba, ki so zelo redko opaženi strukturni elementi. Hkrati so prisotni G-G bazni pari v N1-karbonil simetrični geometriji, ki zavzamejo »križ-kraž« topologijo. Ugotovili smo, da se v AGCGA-kvadruplekse zviijejo tudi oligonukleotidi z več VK1 ali VK34 ponovitvami (VK2, 2VK34, 4VK34). Z mutacijo gvanina na mestu 11 v inozin znotraj oligonukleotida VK34 smo pripravili mutant VK34_I11, ki tvori zvitje zelo podobno strukturi VK1. Da se lahko dva oligonukleotida z različnima zaporedjema zvijeta v tako zelo podobni strukturi, smo pojasnili z nastankom predzvite dvovijačne molekule DNA, ki z zamikom ene od komplementarnih verig oligonukleotida VK34 preide v enako razporeditev baznih parov, kot jo opazimo v strukturi VK1. Sklepali smo, da predzvite dvovijačne DNA strukture niso značilnost samo oligonukleotidov VK1, VK2, VK34 in VK34_I11, ampak jih lahko posplošimo na vse oligonukleotide, ki ustrezajo AGCGA(N₁₋₂₀)AGCGA(N₁₋₂₀)AGCGA(N₁₋₂₀)AGCGA motivu. V človeškem genomu smo našli 146 zaporedij, od katerih se 41 (poleg VK1, VK2, VK34, 2VK34 in 4VK34) nahaja v promotorskih regijah, mestih začetka prepisovanja, CTCF (CCCTC-vezavni faktor) vezavnih mestih in CNV (*ang. copy number variations*) regijah. Skupaj 46 oligonukleotidov izvira iz regulacijskih regij 38 človeških genov poleg že omenjenega gena PLEKGH3, ki jih povezujejo z razvojem živčnega sistema in nevroloških motenj, abnormalno rastjo kosti in hrustanca, razvojem raka in regulacijo osnovnih celičnih procesov. S pomočjo 1D ¹H NMR in CD spektroskopije smo potrdili, da se vseh 46 potencialno biološko zanimivih oligonukleotidov zviije v AGCGA-kvadruplekse, ki so zaradi svojih specifičnih strukturnih lastnosti v primerjavi z G-kvadrupleksi neobčutljivi na naravo prisotnih kationov in spremembe v pH vrednostih.

Ključne besede: gen PLEKGH3, AGCGA-kvadrupleksi, G-kvadrupleksi, i-motivi, oligonukleotid VK1, oligonukleotid VK34, predzvita dvovijačna DNA