



# Molekula življenja razkriva nove skrivnosti

## Nova spoznanja o DNK Rezultati raziskave

### so zanimivi za medicinsko in farmacevtsko stroko

Nova spoznanja o deoksiribonukleinski kislini so pokazala, da je struktura »molekule življenja« precej bolj raznolika, kot smo predvidevali. DNK zato ni samo nosilka genskega zapisa, ampak ponuja tudi številne možnosti za razvoj novih zdravil – za različne oblike raka, osteoporozo in različne kronične bolezni.

**DR. MARTINA LENARČIČ ŽIVKOVIČ, VOJČ KOCMAN, PROF. DR. JANEZ PLAVEC**

Molekulo DNK ponavadi povežemo s strukturo dvojne vijačnice, ki sta jo leta 1953 opisala nobelovca Watson in Crick. Vendar se lahko DNK zvije v široko množico prostorskih struktur, tudi takih, sestavljenih iz več vijačnic. Spoznavanje teh struktur, ki bodo uporabne pri razvoju učinkovin v genski terapiji, pa so omogočile raziskovalne metode, med katerimi ima pomembno vlogo NMR-spektroskopija.

Za DNK smo še pred osemdesetimi leti menili, da gre za precej nepomembno biomolekulo s suhoparnim ponavljanjem štirih osnovnih gradnikov, adenina, citozina, gvanina in timina. Danes vemo, da je osrednja nosilka genske informacije, ki se s podvajanjem prenaša z generacije na generacijo. Lastnosti potomcev so bolj odvisne od prepisa regij DNK (genov), ki nosijo zapise za sintezo različnih proteinov. Vendar velik del DNK sestavljajo nekodirajoče regije. Kakšna je njihova vloga?

Čeprav so jih raziskovalci še pred nekaj leti poimenovali celo odvečna (angl. *junk*) DNK, ki naj ne bi opravljala nobene funkcije in naj bi po nepotrebnem zapolnjevala genom, je opis funkcij nekodirajočih zaporedij po več letih raziskav zelo obsežen. Predvsem velja, da območja DNK, ki ne kodirajo zapisa za proteine, kontrolirajo njihovo sintezo glede na časovne in prostorsko specifične potrebe. Regulacija sinteze proteinov je nujno potrebna za (normalno) delovanje celic in organizmov, napake v sistemu kontrole pa povzročajo bolezenska stanja, kot so rakava obolenja.

### Napake povzročajo bolezni

DNK je v celicah večinoma v obliki

dvojne vijačnice, v kateri se med seboj prek vodikovih vezi prepletata s komplementarnimi nukleotidi povezani polimerni verigi. Takšna struktura ureditev molekuli DNK omogoča, da zaščiti nukleotide pred poškodbami, kar je ključno za prenos genskega zapisa na potomce. Vendar za normalno delovanje celice ni dovolj, da DNK deluje le kot nekakšen računalniški disk, ki shranjuje informacije v obliki genskega zapisa, ampak prek prepisovanja genov tudi izvaja in regulira celične procese.

Pred mestom, kjer pride do prepisa gena (nadzorna regija gena), se dvojna vijačnica razvije in s tem omogoči dostop proteinom, ki sodelujejo pri prepisovanju. DNK se v enovijačno obliko razvije tudi med procesi podvojevanja in med vzdrževanjem telomer (zaščitne regije ponavljajočih se zaporedij na koncih kromosomov). Medtem ko so slednje tesno povezane s procesi staranja, nadzorne regije kontrolirajo izražanje genov. Napake v regulacijskem sistemu povežemo s pojavom različnih hudih bolezni, kot so rakava obolenja.

Za naše raziskave so bili najbolj zanimivi odseki DNK iz telomernih in nadzornih regij, ki so bogati z gvaninskimi (G) nukleotidi. Ti se lahko zvijejo v G-kvadruplekse, strukture s štirimi vijačnicami. Raziskovalci so v človeškem genomu našli približno 800.000 zaporedij, ki izpolnjujejo pogoje za G-kvadrupleksno zvitje. Glede na visoko število z gvanini bogatih zaporedij lahko sklepamo o njihovem pomenu v različnih celičnih procesih in jih kot take obravnavamo kot potencialne tarče za razvoj učinkovin, ki bi dosegle terapevtski učinek s selektivnim ločevanjem med dvojno vijačnico in G-kvadrupleksom. Ključno vlogo pri razvoju novih visokospecifičnih zdravil ima podrobno poznavanje prostorskih struktur G-kvadrupleksov.

### Sladkorna bolezen in osteoporoz

Na nacionalnem centru NMR na Kemijskem inštitutu se že skoraj dve desetletji ukvarjamo s strukturnimi študijami, ki postajajo vse

bolj zanimive za medicinsko in farmacevtsko stroko – še zlasti zaradi vpletenosti G-kvadrupleksov v razvoj zelo različnih kompleksnih bolezni.

V sodelovanju z domačimi raziskovalci pod vodstvom prof. dr. Katarine Trebušak Podkrajšek z Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani proučujemo vpliv oksidativnega stresa na dolžino in strukturo telomernih koncev pri otrocih in mladostnikih s sladkorno boleznijo tipa 1 ali hiperholesterolemijo. To je prva študija v slovenskem raziskovalnem prostoru, ki želi neposredno povezati strukturne raziskave DNK z načrtovanjem specifične individualne obravnave bolnikov in prepoznavo bolnikov s tveganjem za razvoj zgodnjih kroničnih zapletov.

Slovenski raziskovalci smo med prvimi tudi v povezovanju z gvanini bogatih zaporedij s še eno kompleksno boleznijo – osteoporozo: boleznijo kosti, ki povzroča redčenje kostnega tkiva in v Sloveniji prizadene vsako četrto žensko po petdesetem letu starosti. Prvi rezultati projekta, ki ga vodi prof. dr. Janja Marc s Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani, nakazujejo, da nadzorna regija gena, ki igra ključno vlogo pri razvoju osteoporoz, lahko tvori G-kvadruplekse. Za zdaj je še prezgodaj sklepati, ali je tvorba G-kvadrupleksov tudi sinonim za močne kosti. Verjamemo pa, da bodo rezultati študij prispevali k razvoju aptamernih zdravil oziroma diagnostikov. Omeniti želimo še uspešno sodelovanje s skupino prof. dr. Borisa Roglja z Inštituta Jožefa Stefana na področju amiotrofične lateralne skleroze in sorodnih nevrodegenerativnih bolezni.

Raziskav z gvanini bogatih zaporedij ne vodijo le želje o razkritju vpliva teh zvitij na pojav in razvoj različnih bolezni. Zanimajo nas tudi temeljne biofizikalne značilnosti nenavadnih struktur DNK. Na tem področju že več let uspešno sodelujemo s prof. dr. Jurijem Lahom s Fakultete za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani. Po drugi strani si raziskovalci obetamo, da bomo nova spoznanja lahko v prihodnosti izkoristili za uporabo v biotehnologiji in na področju nanomaterialov. V aplikativno smer raziskav

nenavadnih DNK in bioinspiriranih nanonaprav smo se tako podali skupaj s prof. dr. Ireno Drevenšek Olenik in doc. dr. Leo Spindler z Inštituta Jožefa Stefana.

### Spoznavanje avtizma

V akademskih krogih je veljalo prepričanje, da so G-kvadrupleksi edina družina struktur, v katero se zvijejo z gvanini bogata zaporedja. Zato je bilo odkritje nove strukturne družine zelo presenetljivo.

Prvi dokazi o novih strukturah izvirajo iz študije več ponovitev zaporedja GGGAGCG iz nadzorne regije človeškega gena PLEKHG3, ki ga povezujejo s povečano stopnjo tveganja za avtizem (Lybaek, 2008 in Griswold, 2011). Struktura je bila v nasprotju s pričakovani stabilizirana z GG-pari, ki so se naložili na GA- in GC-pare v obliki štirivijačnega zvitja, in je odstopala od vseh do tedaj objavljenih struktur z gvanini bogatih zaporedij. Rezultate preliminarne študije smo objavili v priznani reviji *Nature Communications* (Kocman in Plavec, 2014). Z nadaljnjim proučevanjem pa smo ugotovili, da najdemo odseke s podobnimi ponovitvami še v nadzornih regijah 38 človeških genov, ki so povezani z razvojem živčevja, nevrološkimi motnjami, abnormalnimi razvojem kosti in hrustanca, rakom in nadzorom osnovnih celičnih procesov.

Omenjena zaporedja se zvijejo v strukture, ki jih poleg GG-baznih parov stabilizirajo razporeditve adeninskih (A) in gvaninskih nukleotidov v prvič opisane GAGA-kvartete, na katere se z obeh strani naložijo GC-pari. Novo družino štirivijačnih struktur smo poimenovali AGCGA-kvadrupleksi, dosežek pa nedavno objavili v reviji *Nature Communications* (Kocman in Plavec, 2017). Poglobljena študija NMR pomeni napredek pri razumevanju regulacije genov, ki so povezani z boleznimi, kot so avtizem, epilepsija in shizofrenija, Tourettovim sindromom in rakom kosti. Unikatni strukturni motivi, ki jih opazimo v AGCGA-kvadrupleksih, so zato vsekakor obetavna tarča za razvoj novih zdravilnih učinkovin proti omenjenim boleznim.

### S kvasovkami proti staranju

Podobno kot v nadzornih regijah genov je tudi za telomerne regije do nedavnega veljalo, da se z gvanini bogata zaporedja, prisotna na teh odsekih DNK, zvijajo le v G-kvadruplekse. V sodelovanju s kolegi iz Češke smo dokazali, da se z gvanini bogato zaporedje GTGT-GGGTGTG iz telomerne regije kvasovke (*Saccharomyces cerevisiae*) zvije v strukturo, ki smo jo poimenovali G-lasnica, kar smo nedavno objavili v ugledni reviji *Journal of the American Chemical Society* (Gajarský, Lenarčič Živkovič in sod., 2017).

G-lasnica je stabilizirana z GG-baznimi pari. Čeprav je zaporedje kratko, se prostorska struktura ponaša s številnimi nenavadnimi elementi, kot sta obrat smeri verige (G7 se vrine med G5 in G6) in nalaganje končnih gvaninov (G1 in G11). To je prva struktura stabilne G-lasnice iz naravno prisotnega zaporedja, določena z atomsko ločljivostjo. Kompleksna in stabilna struktura tako kratkega zaporedja kaže na neverjetne sposobnosti narave, ki ji tudi najkrajša zaporedja uspe zviti v stabilne enote, pomembne za celico.

V večjem delu celičnega cikla je enoverižna DNK na telomernem koncu kvasovke dolga le kakšen nukleotid več od proučevanega zaporedja. Na podlagi strukturnih študij predvidevam, da G-lasnica tvori »kapico« na koncu DNK in jo tako zaščiti pred razvijanjem in razgradnjo. Rezultati so pravo nasprotje vsega, kar smo do sedaj vedeli o telomernih koncih iz drugih organizmov, kjer so z gvanini bogate telomerne regije dosti daljše in tvorijo predvsem G-kvadruplekse.

Dolžina telomernih koncev je pri teh organizmih obratno sorazmerna s številom celičnih delitev, zato jih povezujemo s procesi staranja. Po drugi strani se celice kvasovk delijo kljub kratkemu koncu telomer. Do podobnega ohranjanja dolžine telomernih koncev ne glede na število celičnih delitev pride tudi pri rakavih celicah. Vzponice pri vzdrževanju telomer med kvasovkami in rakavimi celicami nakazujejo na potencialno uporabo kvasovk kot modelni sistem za proučevanje telomer v patofizioloških razmerah v človeških celicah.

Nadaljnje raziskave pa bodo pokazale, ali lahko zanesljive vzponice potegnemo tudi s celično delitvijo v fizioloških pogojih.

### Nujna je posodobitev opreme

Opisana izjemna dosežka sta le majhen del raziskav naše programske skupine.

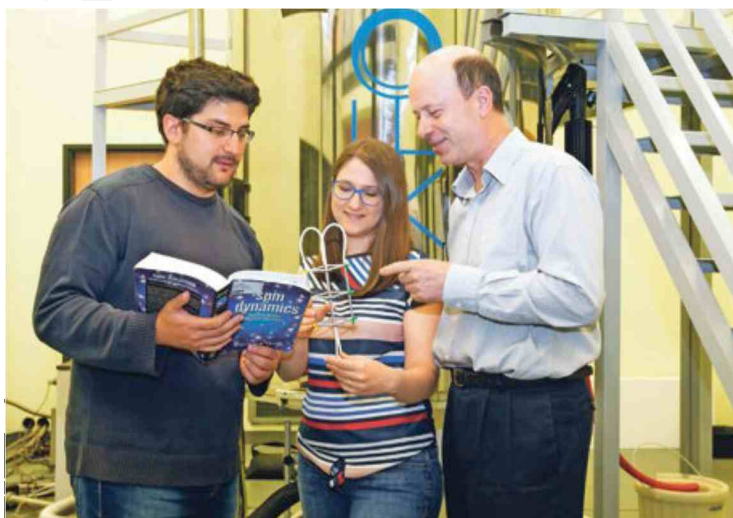
Center NMR s svojo infrastrukturo deluje kot nacionalno vozlišče, kjer so na enem mestu zbrani raziskovalna oprema in kadri za njeno učinkovito uporabo, kar je med drugim pomembno pri povezovanju akademskih krogov z industrijo. Trenutno v centru deluje pet spektrometrov, katerih kakovost in zmogljivosti so odločilne za izvajanje visokokakovostnih in mednarodno primerljivih raziskav. Razvoj in trendi v raziskovalnem delu pa narekujejo investicije v modernejšo in zmogljivejšo opremo.

Naš »paradni« 800-megaherčni spektrometer se bliža 15-letnici obratovanja. Tako staro opremo moramo čim prej obnoviti. Načrtujemo posodobitev opreme z nakupom 1,0 GHz spektrometra za študije, vezane na področje ved o življenju, ter 800-megaherčnega NMR-spektrometra, prilagojenega za študije trdnih materialov na področju znanosti o materialih in v farmaciji. Koordinirana vlaganja v moderno raziskovalno opremo v Sloveniji omogočajo ohranjanje konkurenčnosti v mednarodni znanstveni skupnosti in sočasno zadovoljujejo potrebe industrijskih partnerjev. Hkrati s pomočjo opreme centra NMR znanje prenašamo na študente vseh stopenj izobraževanja: od bolonjske diplome prve stopnje do doktorata znanosti. Pretehtane investicije v raziskovalno opremo zato vidimo kot dolgoročno investicijo v prihodnost slovenske znanosti in družbe, za katero verjamemo, da bo znala tehnološko visokousposobljen kader vključiti v svoja prizadevanja in družbene izzive.

**Razvoj in trendi v raziskovalnem delu nam narekujejo investicije v modernejšo in zmogljivejšo opremo.**



DNK ni samo osrednja nosilka genetske informacije. Spoznavanje njenega delovanja je ključno za razumevanje bolezni in za razvoj genske terapije.



Avtorji prispevka in omenjenih znanstvenih publikacij: Vojč Kocman, dr. Martina Lenarčič Živkovič in prof. dr. Janez Plavec. FOTO JERNEJ STARE