ყულფის როლი დნმ-კვადრუპლექსის სტაბილურობაში

ირაკლი ოქროსცვარიძე

სამაგისტრო ნაშრომი წარდგენილია ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტის საბუნებისმეტყველო მეცნიერებებისა და საინჟინრო ფაკულტეტზე ფიზიკის მაგისტრის აკადემიური ხარისხის მინიჭების მოთხოვნის შესაბამისად

ფიზიკისა და ასტრონომიის სამაგისტრო პროგრამა

სამეცნიერო ხელმძღვანელი: ნუნუ მეტრეველი, დოქტორი

თანახელმძღვანელი: ლევან ლომიძე

ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტი

თბილისი, 2017

განაცხადი

როგორც წარდგენილი სამაგისტრო ნაშრომის ავტორი, ვაცხადებ, რომ ნაშრომი წარმოადგენს ჩემს ორიგინალურ ნამუშევარს და არ შეიცავს სხვა ავტორების მიერ აქამდე გამოქვეყნებულ, გამოსაქვეყნებლად მიღებულ ან დასაცავად წარდგენილ მასალებს, რომლებიც ნაშრომში არ არის მოხსენიებული ან ციტირებული სათანადო წესების შესაბამისად.

ირაკლი ოქროსცვარიძე

23.06.2017

აბსტრაქტი

გუანინით მდიდარ დნმ-ის თანმიმდევრობებს აქვთ G-კვარტეტებისგან შემდგარი კვადრუპლექსურ სტრუქტურებად თვითორგანიზების უნარი. კვადრუპლექსური სტრუქტურები ნაპოვნი იქნა გენომში: ტელომერებში და იმუნოგლობულინების სინთეზში მონაწილე უბნებში. პრომოტორული უბნები, რომელიც წარმოქმნიან კვადრუპლექსებს ლოკალიზებულ იქნა ონკოგენებში და კიბოსთან ასოცირებულ გენებში. ბევრი in vitro სელექციით გარკვეული სამიზნეებისთვის სპეციფიურად შერჩეული რნმ და დნმ-აპტამერი წარმოქმნის კვადრუპლექსურ სტრუქტურებს. კვადრუპლექს-პრაიმერული ამპლიფიკაცია (Quadruplex priming amplification (QPA)) წარმოადგენს დნმ-ის ამპლიფიკაციის მეთოდს, ეფექტური და მარტივი დეტექციით. ეს მეთოდი დაფუძნებულია 5'-GGGTGGGTGGGTGGG-3' (G3T) დნმ-კვადრუპლექსზე. QPA იყენებს პრაიმერს, რომელიც G3T-ის წაკვეთილი ვერსიაა და შეუძლია იზოთერმულად, თავისით დაიკეცოს მონომოლეკულურ კვადრუპლექსად, დნმ-პოლიმერაზას მიერ მისი ელონგაციის შემდეგ. QPA რეაქციის სიჩქარე ძლიერ არის დამოკიდებული პრაიმერისა და პრაიმერის დამაკავშირებელი უბნის კომპლექსის თერმულ სტაბილურობაზე. გარდა დუპლექსური დნმ-ისთვის სტანდარტულ მასტაბილიზირებელი ფაქტორებისა, კვადრუპლექსებს აქვთ სპეციფიური მასტაბილიზირებელი ფაქტორები: გუანინების კარბონილების კათიონებთან კოორდინაცია და ყულფები, რომლებიც მონაწილეობას იღებენ მონომერული და დიმერული G-კვადრუპლექსური სტრუქტურების წარმოქმნაში. ყულფების სიგრძე და პირველადი სტრუქტურა მნიშვნელოვან ზემოქმედებას ახდენს კვადრუპლექსის წარმოქმნასა და სტაბილიზაციაზე. UV-Vis სპექტროსკოპიის მეთოდით შევისწავლეთ G3T თანმიმდევრობისა და მისი სხვადასხვა ვარიანტების (ცვლილებები ყულფის პოზიციაში და მიერთებები 5' და 3' ბოლოებზე) ოპტიკური და თერმოდინამიკური თვისებები. თერმული ლღობის ექსპერიმენტებმა აჩვენა, რომ პურინი კომბინირებული მარყუჟის პოზიციაში იწვევენ G3T კვადრუპლექსის მნიშვნელოვან დესტაბილიზაციას. ხოლო, თიმინის ციტოზინით ცვლილებას აქვს უმნიშვნელო ეფექტი. სხვადასხვა სიგრძის ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობების მიმატებები 5' ბოლოზე იწვევს მნიშვნელოვან თერმულ დესტაბილიზაციას, მაშინ

როდესაც 3’ ბოლოზე მიმატების ეფექტი უმნიშვნელოა. კვლევის შედეგები შეიძლება გამოყენებულ იქნას QPA რეაქციის უფრო ეფექტური მოდელების შემუშავებისთვის. ასევე მიღებული შედეგები მომავალში შეიძლება გამოვიყენოთ დნმ-ის ნანოტექნოლოგიებსა და ბიოტექნოლოგიებში.

ძირითადი საძიებო სიტყვები: დნმ-კვადრუპლექსი, G3T, QPA, დნმ-ის ამპლიფიკაცია, თერმოდინამიკა.

Abstract

Guanine rich DNA sequences have ability to self-organize as quadruplex structures. Quadruplex structures were found in the genome: telomeres and the parts, that are responsible for the synthesis of immunoglobulins. Promotional parts that generate quadruplexes were localized in oncogens and genes associated with cancer. many in vitro specifically selected for specific targets RNA and DNA-apameres generate quadruplex structures. Quadruplex priming amplification (QPA) allows isothermal amplification of nucleic acids with improved yieldand simplified detection. This assay is based on a DNA quadruplex, 5'-GGGTGGGTGGGTGGG-3' (G3T), which in the presence of specific cations possesses unusually high thermal stability. QPA employs truncated G3T sequencesas primers, which upon polymerase elongation, self-dissociate from the binding site and allow the next round of priming without thermal unfolding of amplicons. The rate of amplification strongly depends on the thermal stability of the primer/primer binding site (PBS) complex. In addition to standard stabilizing factors for duplex DNA, the quadruplexes have specific stabilizing factors: Coordination of guainie's carbonyls with cations and loops, which are involved in the formation of monomeric and dimeric G-quadruplex structures. The length and the primary structure of loops significantly affects the formation and stabilization of the quadruplex. In the present study, we studied the foldand thermodynamic properties of the wild-type G3T and variants containing sequence modifications or extensions at the 5' and 3' ends. Thermal unfolding experiments revealed, that purine bases incorporated at loop positions significantly destabilize the quadruplex, while pyrimidines in loop positions have almost no effect. Attachments of different length nucleotides at the 5'-end causes significant thermal destabilization, though the effect of attachments at the 3'-end revealed almost no effect. Overall, the results of our research can be used to develop more efficient models of isothermal QPA reaction. Also, the results achieved through our research activity can be used in DNA nanotechnologies and biotechnology in the future.

Keywords: QPA, G3T, DNA quadruplexes; DNA amplification, thermodynamics.

მადლობა

მადლობას ვუხდი ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტის ბიოფიზიკის ინსტიტუტის თანამშრომლებს თანადგომისათვის; მადლობა ჩემს სამეცნიერო ხელძღვანელებს პროფ. ნუნუ მეტრეველს და ლევან ლომიძეს გაწეული დახმარებისათვის; მადლობა პროფ. ბესიკ კანკიას (აშშ, ოჰაიოს სახელმწიფო უნივერსიტეტის ქიმიისა და ბიოქიმიის დეპარტამენტი) რომლის ხელმძღვანელობით მიმდინარეობს პროექტი „დნმ-ის კვადრუპლექსების შესწავლა“, და რომლის მცირე ნაწილს წარმოადგენს წინამდებარე სამაგისტრო ნაშრომი.