

**Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych
Polskiej Akademii Nauk
w Łodzi**

Arkadiusz Chworóś

'Samo-organizujące się fragmenty RNA'

**Autoreferat
przedłożony Centralnej Komisji
do Spraw Stopni i Tytułów**

Łódź 2013

Spis treści:

1. Curriculum vitae

| | |
|--|---|
| 1.1. Dane personalne | 3 |
| 1.2. Wykształcenie | 3 |
| 1.3. Doświadczenie zawodowe | 3 |
| 1.4. Wymiany międzynarodowe i stypendia | 4 |
| 1.5. Dotychczasowe doświadczenia i zainteresowania naukowe | 4 |

2. Osiągnięcia naukowe

| | |
|--|----|
| 2.1. Skrócony opis kariery naukowej | 5 |
| 2.2. Lista publikacji (ISI Web of Knowledge) i monografii | 7 |
| 2.2.1. Publikacje opublikowane podczas wykonywania pracy doktorskiej | 7 |
| 2.2.2. Publikacje opublikowane po uzyskaniu stopnia doktora | 8 |
| 2.2.3. Lista zgłoszeń patentowych | 11 |

3. Tematyka rozprawy:

| | |
|--|----|
| 3.1. Lista publikacji naukowych stanowiących podstawę rozprawy habilitacyjnej .. | 12 |
| 3.2. Omówienie tematyki rozprawy pt. „ <i>Samo-organizujące się fragmenty RNA</i> ” | 13 |
| 3.2.1. Metodyka racjonalnego projektowania strukturalnych fragmentów RNA i ich zastosowania w bionanotechnologii | 13 |
| 3.2.2. Zastosowanie technik mikroskopii skaningowej do badania nano-objektów zbudowanych z kwasów nukleinowych | 16 |

| | |
|---|-----------|
| 4. Szczegółowy opis wybranych prac naukowych | 17 |
|---|-----------|

| | |
|---------------------------------|-----------|
| 5. Spis literatury | 26 |
|---------------------------------|-----------|

| | |
|-----------------------------|-----------|
| 6. Perspektywy | 28 |
|-----------------------------|-----------|

| | |
|--|-----------|
| 7. Podsumowanie osiągnięć naukowych i wkład naukowy | 28 |
|--|-----------|

| | |
|---|-----------|
| 8. Udział w finansowanych projektach naukowych | 28 |
|---|-----------|

| | |
|---|-----------|
| 9. Działalność pedagogiczna i edukacyjna | 29 |
|---|-----------|

| | |
|---|-----------|
| 10. Opieka nad pracami magisterskich | 29 |
|---|-----------|

Curriculum vitae

Dane personalne:

Imię i nazwisko: Arkadiusz Chworoś
Tytuł naukowy: Doktor
Miejsce pracy: Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych
Polska Akademia Nauk w Łodzi
ul. Sienkiewicza 112,
90-363 Łódź
Stanowisko: adiunkt
Nr telefonu: +48 42 6803249
Fax: +48 42 6815483
E-mail: achworos@cbmm.lodz.pl

Wykształcenie:

- 1991 Technikum Chemiczne w Mińsku Mazowieckim (mazowieckie), specjalizacja: analiza chemiczna
- 1996 Studia magisterskie, Wydział Matematyki Fizyki i Chemii, Katedra Chemii Organicznej i Stosowanej, Uniwersytet Łódzki, specjalizacja: chemia bioorganiczna. Tytuł pracy magisterskiej: *'Stereokontrolowana synteza metanofosfonianu (3',5') ditymidylowego z wykorzystaniem 3'-O-(O-benzoilometanofosfonianów) 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo) tymidylowych.'* Pod kierunkiem Prof. dr hab. Grzegorza Mlostonia (UŁ) i Prof. dr hab. Wojciecha J. Steca (CBMM)
- 2001 Praca doktorska, Zakład Chemii Bioorganicznej, CBMM PAN, specjalizacja: biochemia kwasów nukleinowych. Tytuł pracy doktorskiej: *'Synteza i przemiany nukleozydowych pochodnych kwasu metanofosfonowego i jego tio- i selenofosfonylowych analogów'*. Pod kierunkiem Prof. dr hab. Wojciecha J. Steca.

Doświadczenie zawodowe:

- 1995 - 2002 Zakład Chemii Bioorganicznej, Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk – asystent
- 2003 - 2006 Department of Chemistry and Biochemistry i Materials Research Laboratory, University of California, Santa Barbara – staż podoktorski
- 2006 - 2008 Department of Physics, University of California, Santa Barbara, stanowisko samodzielne (project scientist)
- 2008 - 2009 Department of Chemistry and Biochemistry i Institute for Collaborative Biotechnologies, University of California, Santa Barbara
- 2010 - Zakład Chemii Bioorganicznej, Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk w Łodzi – adiunkt

Wymiany międzynarodowe i stypendia:

- 1999-2000 Staż studencki w Laboratoire de Chimie de Coordination du CNRS, Toulouse, FRANCE, zespół dr. Bernarda Meunier
- 2001-2002 Staż podoktorski w Laboratoire de Chimie de Coordination du CNRS, Toulouse, FRANCE, zespół dr. Bernarda Meunier

Dotychczasowe doświadczenia i zainteresowania naukowe:

- Projektowanie struktur tecto-RNA, zastosowanie bionanotechnologii RNA w procesach regulacji ekspresji genów.
- Projektowanie, synteza i wizualizacja strukturalnych fragmentów RNA. Termodynamiczne badania fałdowania RNA, badanie procesów samoorganizacji RNA-RNA i RNA-DNA, badanie oddziaływań RNA-minerały. Wizualizacja nanostruktur RNA z wykorzystaniem mikroskopii sił atomowych - AFM.
- Zastosowanie metod mikroskopii skaningowej do wizualizacji biomateriałów (siatki DNA/RNA, oddziaływania DNA - białka, dwuwarstwy lipidowe, ampfile peptydowe, czy też materiały twarde, takie jak zębina, kości). Nanomateriały zbudowane z kwasów nukleinowych (otrzymywanie i charakterystyka). Analiza obrazów cyfrowych i bioinformatyka.
- Bioanaliza z wykorzystaniem kompleksu skoniugowanych oligoelektrolitów z DNA, inżynieria biosensorów stosowanych do różnicowania komórek bakteryjnych.
- Analiza teoretyczna i mechanistyczne badania degradacji dupleksu DNA (naturalny/tiofosforanowy). Czynniki strukturalne a stabilność enzymatyczna P-chiralnych tiofosforanowych analogów DNA.
- Badania procesów utleniania DNA za pomocą chemicznych nukleaz takich jak metaloporfiryny. Biofizyczne i spektroskopowe badania produktów uszkodzenia DNA w wyniku stresu oksydacyjnego.
- Synteza pochodnych kwasów nukleinowych o potencjalnym zastosowaniu terapeutycznym.

Osiągnięcia naukowe:

Skrócony opis kariery naukowej:

Pierwsze zetknięcie z syntezą i analizą chemiczną miało miejsce w roku 1986, w technikum chemicznym w Mińsku Maz. (mazowieckie). Prowadzone tam zajęcia, w przeważającej ilości zajęcia praktyczne, skupiały się głównie na chemii analitycznej. Pięć lat później, w 1991r. zostałem przyjęty na Wydział Matematyki, Fizyki i Chemii Uniwersytetu Łódzkiego, na specjalizację chemii organicznej. Za radą byłego pracownika CBMM PAN - dr Krystyny Brzezinskiej, będąc studentem 3 roku studiów zostałem przyjęty do Zakładu Chemii Bioorganicznej, wówczas kierowanego przez prof. dr hab. Wojciecha Steca. Tam zdobywając doświadczenia w dziedzinie chemii kwasów nukleinowych ukończyłem część eksperymentalną pracy magisterskiej, obronionej na Wydziale Matematyki, Fizyki i Chemii UŁ w roku 1996.

Badania rozpoczęte w czasie wykonywania pracy magisterskiej, skupiające się na chemicznej syntezie modyfikowanych fragmentów DNA, były kontynuowane podczas studiów doktorskich. Rozprawa doktorska podejmowała tematykę syntezy naturalnych i modyfikowanych fragmentów DNA i ich stabilności nukleolitycznej. Przykładowymi, badanymi przeze mnie związkami były tiofosforany, metylofosfoniany i metylo(seleno)fosfoniany nukleozydów. Kluczowym elementem było otrzymanie nukleozydowych mieszanych bezwodników fosfonowo-karboksylowych w formie stereozdefiniowanej, a następnie przebadanie kierunku reakcji podstawienia nukleofilowego na atomie węgla lub fosforu. Okazało się, że reakcja w/w bezwodników z alkoholami I i II-rzędowymi zachodząca w obecności DBU prowadzi do inwersji konfiguracji na atomie fosforu. Odkrycie to pozwoliło na opracowanie metodologii wzajemnej konwersji P-chiralnych metanotiofosfonianów. Kolejnym tematem podjętym podczas wykonywania pracy doktorskiej było otrzymanie nukleozydowych mieszanych seleno-siarczków i zbadanie ich reakcji z trifenylofosfiną, które nieoczekiwanie prowadziły wyłącznie do produktów reakcji utlenienia, a nie desulfuracji. Wyniki badań wchodzące w skład rozprawy doktorskiej zostały opublikowane w 9 pracach oryginalnych (1-8,11) i jednym zgłoszeniu patentowym. Praca doktorska zatytułowana *'Synteza i przemiany nukleozydowych pochodnych kwasu metanofosfonowego i jego tio- i selenofosfonylowych analogów'* przygotowana w Zakładzie Chemii Bioorganicznej, Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi została obroniona w roku 2001.

Podczas studiów doktorskich odbyłem 6-cio miesięczny staż studencki w laboratorium dr. Bernarda Meunier (późniejszego dyrektora CNRS, członka Francuskiej Akademii Nauk) w Laboratoire de Chimie de Coordination du CNRS, w Tuluzie. Podczas tego pobytu prowadziłem badania produktów utlenienia krótkich fragmentów dwuniciowego DNA. Stosując techniki NMR i LC-ESI-MS udało nam się zidentyfikować nieznany dotąd produkt takiego utlenienia. Powstająca pochodna guanidynohydantoinowa okazała się być istotnym produktem procesu utlenienia 2'-deoksy-guanozyny, a zaproponowany mechanizm uzupełnieniem oksydacyjnego procesu uszkodzania genomowego DNA.

Pierwszy staż podoktorski (także w LCC CNRS) był poświęcony badaniom procesu nukleolitycznego przecięcia tiofosforanowego dwuniciowego DNA, zachodzącego pod wpływem chemicznej nukleazy jaką jest metaloporfiryna. Badania eksperymentalne, jak i modelowanie komputerowe pokazały, że żelazoporfiryna modyfikowana w pozycji ekwatorialnej pierścienia lokalizuje się specyficznie w przestrzeni małej bruzdy helisy DNA i powoduje utlenienie pozycji 5'-C nukleozydu, co w konsekwencji prowadzi do rozerwania łańcucha oligonukleotydu. Powyższe dwa krótkie pobyty w LCC CNRS zaowocowały opublikowaniem 3 oryginalnych prac w czasopismach o zasięgu międzynarodowym (9-10,12).

Kolejny staż podoktorski, odbyty w Departamencie Chemii i Biochemii Uniwersytetu Kalifornijskiego w Santa Barbara, wiązał się ze zmianą tematyki. Zainteresowania moje ukierunkowane były w stronę racjonalnego modelowania i badania procesów samoorganizacji nanocząstek zbudowanych z fragmentów RNA oraz ich analizy, przy użyciu technik mikroskopii skaningowej '*scanning probe microscopy*' (SPM).

Pośród powodów, dla których kwasy nukleinowe są tak interesujące i chętnie stosowane w dziedzinie bionanotechnologii jest ich biokompatybilność, programowalność, biodegradowalność, sekwencyjna specyficzność (istotna w procesach rozpoznawania) oraz, w przypadku zastosowania modyfikacji, ich stabilność chemiczna. Szczególnie zainteresowała mnie wielofunkcyjność cząsteczek RNA. Z jednej strony kwas rybonukleinowy posiada, podobnie jak jego deoksy-odpowiednik, zakodowaną informację genetyczną, która może być kontrolowana na poziomie sekwencji (struktury pierwszorzędowej). Z drugiej jednak strony cząsteczki RNA posiadają swoistą funkcjonalność enzymatyczną i/lub regulatorową, która może być winkorporowana w strukturę oligomeru.

W czasie trzyletniego stażu podoktorskiego poświęciłem się opracowaniu metodologii, na podstawie której możliwe było zaprojektowanie przestrzennych układów zbudowanych z RNA, kontrolowanie procesów fałdowania i samostnej samoorganizacji fragmentów RNA, celem wytworzenia programowalnych nanocząstek lub struktur wyższego rzędu. Dodatkowo zostały opracowane procedury pozwalające na obrazowanie tego typu struktur przestrzennych za pomocą mikroskopii sił atomowych '*atomic force microscopy*' (AFM).

Doświadczenia uzyskane w trakcie realizacji pracy doktorskiej i odbytych staży podoktorskich wpłynęły na późniejsze sukcesy w prowadzeniu niezależnych badań, prowadzonych w Departamencie Fizyki Uniwersytetu Kalifornijskiego w Santa Barbara. Głównym tematem naszych zainteresowań było zastosowania mikroskopii sił atomowych do wizualizacji powierzchni biomateriałów. Badania, sponsorowane z grantu amerykańskiej fundacji na rzecz nauki '*National Science Foundation*' (NSF) nr. 0236093, skupiały się na analizie powierzchni pochodzenia biologicznego, takich jak nanocząstki i siatki zbudowane z DNA/RNA. Badania te zostały rozwinięte w kierunku analizy kompleksów białkowych, połączeń białkowo-lipidowych, dwuwarstw lipidowych, polimerowych miceli, powierzchni lateksowych czy materiałów twardszych, takich jak zębina, powierzchnia kości, czy też powierzchnia pancerzy insektów. W tym czasie opracowany został zestaw procedur,

pozwalających na uzyskanie wysokiej rozdzielczości obrazów materiałów miękkich w warunkach gazu obojętnego, jak również w środowisku buforowym (naturalnym dla biocząsteczek DNA/RNA i białek).

Pomimo, iż moje doświadczenia pochodzą z różnych dziedzin nauki, mają na celu zrozumienie istoty procesów fałdowania kwasów nukleinowych, jak i ich zastosowanie w bionanotechnologii. Obecne badania koncentrują się na zastosowaniu strukturalnych nanocząsteczek RNA w procesie regulacji ekspresji genów.

W 2010 r. podjąłem decyzję o powrocie do macierzystego Zakładu Chemii Bioorganicznej CBMM PAN w Łodzi, w którym zdobyta przeze mnie wiedza na temat racjonalnego modelowania nanocząsteczek RNA komplementarnie uzupełnia tutejsze doświadczenia w zakresie badania regulacji ekspresji genów w komórkach eukariotycznych.

Lista publikacji (ISI Web of Knowledge) i monografii:

Publikacje opublikowane podczas wykonywania pracy doktorskiej:

1. Base-Dependent Regioselective and P-stereocontrolled Hydrolysis of Nucleoside 3'-O-(O-2,4,6-trimethylbenzoyl methanephosphonothioate)s.
Lucyna A. Woźniak, Jarosław Pyzowski, Arkadiusz Chworos and Wojciech J. Stec
Journal of Organic Chemistry; 63, 1998, 9109-9112.
2. A Facile Conversion of Thio- and Selenophosphoric Acids and Their Derivatives into Fluoridates by Means of Reaction with Silver Fluoride.
Arkadiusz Chworos and Lucyna A. Woźniak
Tetrahedron Letters; 41, 1999, 9337-9340.
3. Mixed Phosphorus-Carboxylic Anhydrides as Synthons for Stereoselective Synthesis of [Rp]-Dinucleoside (3',5')-Methanephosphonates.
Lucyna A. Woźniak, Arkadiusz Chworos and Wojciech J. Stec
Phosphorus, Sulfur and Silicon; 146, 1999, 649-652.
4. Chemo- and Stereoselectivity of Nucleophilic Substitution at Phosphorus in Mixed Phosphorus-Carboxylic Anhydrides.
Lucyna A. Woźniak, Arkadiusz Chworos and Wojciech J. Stec
Phosphorus, Sulfur and Silicon; 147, 1999, 1263-1264.
5. Stereoselective Synthesis of [Rp]-Dinucleoside (3',5')-Methanephosphonates.
Lucyna A. Woźniak, Arkadiusz Chworos and Wojciech J. Stec
Phosphorus, Sulfur and Silicon; 147, 1999, 1265-1266.
6. One-Pot Synthesis of Nucleoside 3'-O-(S-Phenyl Methanephosphonothioate)s.
Jarosław Pyzowski, Arkadiusz Chworos, Lucyna A. Woźniak, Wojciech J. Stec
Tetrahedron Letters, 41, 2000, 1223-1226.

7. The Synthesis of Unsymmetrical S¹-(3'-O-Thymidine-O-Methanephosphonyl)-S²-p-Nitrophenyl Disulfides and Their Reactions with Triphenylphosphine.
Arkadiusz Chworos, Lucyna A. Woźniak and Wojciech J. Stec
Tetrahedron Letters, 41, 2000, 1219-1222.
8. Stereochemical Correlation and Absolute Configuration
Assignment for Thymidine 3'-(S-Phenyl Methanephosphonothioate).
Arkadiusz Chworos and Lucyna A. Woźniak
Proceedings of the VIth Int. Symp. Solid Phase Synthesis & Combinatorial Chemical Libraries York, UK. 1999, entitled " Innovation and Perspectives in Solid Phase Synthesis & Combinatorial Libraries 2000"; 43-46.

Publikacje opublikowane po uzyskaniu stopnia doktora:

9. Guanine oxidation: NMR characterization of a dehydro-guanidinohydantoin residue generated by a 2e-oxidation of d(GpT).
Arkadiusz Chworos, Yannick Coppel, Igor Dubey, Genevieve Pratviel and Bernard Meunier
Journal of the American Chemical Society; 123, 2001, 5867-5877.
10. Characterization of the dehydro-guanidinohydantoin oxidation product of guanine in a dinucleotide.
Arkadiusz Chworos, Christel Seguy, Genevieve Pratviel, and Bernard Meunier
Chemical Research in Toxicology; 15, 2002, 1643-1651.
11. New examples of mixed seleno-sulfides; reactions with triphenylphosphine.
Arkadiusz Chworos, Lucyna A. Woźniak and Wojciech J. Stec
Chemistry Commun.; 7, 2002, 518-519.
12. Comparison of the cleavage profiles of oligonucleotide duplexes with or without phosphorothioate linkages by using a chemical nuclease probe.
Arkadiusz Chworos, Philippe Arnaud, Krystyna Zakrzewska, Piotr Guga, Geneviève Pratviel, Wojciech J. Stec and Bernard Meunier
Journal of Biological Inorganic Chemistry, 9, 2004, 374-384.
13. Building Programmable Jigsaw Puzzles with RNA.
Arkadiusz Chworos, Isil Severcan, Alexey Y. Koyfman, Patrick Weinkam, Emin Oroudjev, Helen G. Hansma and Luc Jaeger
Science, 306, 2004, 2068-2072
14. From RNA Tectonics to Programmable Jigsaw Puzzles Made of RNA
Arkadiusz Chworos and Luc Jaeger
Proceedings Foundations of Nanoscience, 2005, 157-162
15. Controlled Spacing of Cationic Gold Nanoparticles by Nanocrown RNA
Alexey Y. Koyfman, Gary Braun, Sergei Magonov, Arkadiusz Chworos, Norbert O. Reich, Luc Jaeger
Journal of the American Chemical Society, 127, 2005, 11886 -11887

16. Thermal stability analysis of self-assembling tRNA tecto-squares
Isil Severcan, Arkadiusz Chworos, Luc Jaeger
Biophysical Journal 88, 2005, 571a Part 2 Supplement S
17. The architectonics of programmable RNA and DNA nanostructures
Luc Jaeger and Arkadiusz Chworos
Current Opinion of Structural Biology, 16, 2006, 531-543.
18. The design and characterization of modular polyhedral architectures made of RNA
Isil Severcan, Cody Geary, Arkadiusz Chworos, Luc Jaeger
Biophysical Journal, 2007 350a-351a Supplement S
19. Nucleic acid foldamers: design, engineering and selection of programmable bio-materials with recognition, catalytic and self-assembly properties
Arkadiusz Chworos and Luc Jaeger
Foldamer, by Wiley, Chapter 10, 2007, 291-329.
20. Self-assembled Materials Containing Complementary Nucleobase Molecular Recognition
Wirasak Smitthipong, Arkadiusz Chworos, Brian Lin, Thorsten Neumann, Surekha Gajria, Luc Jaeger, and Matthew Tirrell
Materials Research Society Symposium Proceedings, 1094, 2008
21. Supramolecular Materials Comprising Nucleic Acid Biopolymers
Wirasak Smitthipong, Thorsten Neumann, Arkadiusz Chworos, Luc Jaeger, and Matthew Tirrell
Macromolecular Symposia, 264, 2008, 13–17
22. Anatomy and Growth Characteristics of Conjugated Polyelectrolyte/DNA Aggregates.
Chunyan Chi, Arkadiusz Chworos, Jinping Zhang, Alexander Mikhailovsky and Guillermo C. Bazan
Advanced Functional Materials, 18, 2008, 3606–3612.
23. Noncovalent Supramolecular Self-assembling Polyelectrolyte: Nucleic Acid Based Materials
Wirasak Smitthipong, Thorsten Neumann, Surekha Gajria, Youli Li, Arkadiusz Chworos, Luc Jaeger, and Matthew Tirrell
BioMacromolecules, 2009, 10, 221–228
24. Preliminary structural investigations of the Eut-L shell protein of the ethanolamine ammonia-lyase metabolosome of *Escherichia coli*
Kiel Nikolakakis, Akashi Ohtaki, Keith Newton, Arkadiusz Chworos and Martin Sagermann
Acta Crystallographica, 65, 2009, F65, Part 2, 128–132
25. Square-Shaped RNA Particles from Different RNA Folds
Isil Severcan, Cody Geary, Erik Verzemnieks, Arkadiusz Chworos, and Luc Jaeger
Nano Letters, 9, 2009, 1270-1277.

26. Automatic Analysis of Conjugated Polyelectrolytes - DNA Interactions Based on Sequential Analysis of AFM Imaging
Arkadiusz Chworos, Boguslaw Obara
IEEE Transactions on Nanotechnology, 8, 2009, 457-462.
27. A Tripod Molecular Tip for Single Molecule Ligand-Receptor Force Spectroscopy by AFM
Michael E. Drew, Arkadiusz Chworos, Emin Oroudjev, Helen Hansma, Yoko Yamakoshi
Langmuir, 2010, 26 (10), 7117-7125.
28. Specific interaction of DNA-functionalized polymer colloids
Rungsima Chollakup, Wirasak Smitthipong and Arkadiusz Chworos
Polymer Chemistry, 2010, 1 (5), 658-662
29. Identification of Bacteria by Conjugated Oligoelectrolyte/Single-Stranded DNA Electrostatic Complexes
Aidee Duarte, Arkadiusz Chworos, Suvi F. Flagan, Grady Hanrahan, Guillermo C. Bazan
Journal of the American Chemical Society, 2010, 132 (36), 12562-12564
30. Modification of the Optoelectronic Properties of Membranes via Insertion of Amphiphilic Phenylenevinylene Oligoelectrolytes
Logan E. Garner, Juhyun Park, Scott M. Dyar, Arkadiusz Chworos, James J. Sumner, Guillermo C. Bazan
Journal of the American Chemical Society, 2010, 132 (29), 10042-10052
31. A polyhedron made of tRNAs
Isil Severcan, Cody Geary, Arkadiusz Chworos, Neil Voss, Erica Jacovetty, Luc Jaeger
Nature Chemistry, 2010, 2, 772 - 779
32. Improved isolation of proteins tagged with glutathione S-transferase
Nicholas K. Vinckier, Arkadiusz Chworos, Stanley M. Parsons
Protein Expression And Purification, 2011, 75(2), 161-164
33. Self-Assembling RNA Nanorings Based on RNAI/II Inverse Kissing Complexes
Wade W. Grabow, Paul Zakrevsky, Kirill Afonin, Arkadiusz Chworos, Bruce A. Shapiro, and Luc Jaeger
Nano Letters, 2011, 11(2), 878-887.
34. Promoting RNA Helical Stacking via A-minor Junctions
Cody Geary, Arkadiusz Chworos, and Luc Jaeger
Nucleic Acids Research, 2011, 39(2), 1066-1080.
35. Self-Assembly of an Optically Active Conjugated Oligoelectrolyte
Julia H. Ortony, Tirtha Chatterjee, Logan E. Garner, Arkadiusz Chworos, Alexander Mikhailovsky, Edward J. Kramer, and Guillermo C. Bazan
Journal of the American Chemical Society, 2011, 133, 8380-8387

36. Effect of the Peptide Secondary Structure on the Peptide Amphiphile Supramolecular Structure and Interactions
Dimitris Missirlis, Arkadiusz Chworos, Caroline J. Fu, Htet A. Khant, Daniel V. Krogstad, and Matthew Tirrell
Langmuir, 2011, 27, 6163–6170
37. Od chemii bioorganicznej do biologii chemicznej
Wojciech T. Markiewicz, Henryk Koroniak, Arkadiusz Chworos, Piotr Mucha, Jan Barciszewski
Misja Nauk Chemicznych, Wydawnictwo Nauka I Innowacja, 2011, 109-124 (book chapter)
38. Rational design of RNA nanoparticles and nanoarrays
Arkadiusz Chworos
RNA Nanotechnologies, Pan Stanford Publishing, 2013, (book chapter)

Lista zgłoszeń patentowych:

1. W.J. Stec, L.A. Woźniak, A. Chworos, J. Pyzowski
Methods of Synthesis P-chirality's analogues of nucleotides
UP RP P-319677 25.04.1997
2. W.J. Stec, L.A. Woźniak, A. Chworos, J. Pyzowski
A Process for the Synthesis of Modified P-Chiral Nucleotide Analogs
European Patent: EP 0 977 769 B1 (Nov. 5, 1998)
World Wide Patent: WO 98/49179 (Nov. 5, 1998)
United States Patent: US 6,407,223 B1 (Jun. 18, 2002)

Rozprawa habilitacyjna

Tytuł: „Samo-organizujące się fragmenty RNA”

Podstawę rozprawy habilitacyjnej stanowi 9 prac współautorstwa habilitanta, z których 5 to prace oryginalne [H1, H3, H6-H8], 3 przeglądy literaturowe, lub rozdziały do książek [H4-H5, H9] i jedno doniesienie pokonferencyjne [H2].

Lista publikacji naukowych stanowiących podstawę rozprawy habilitacyjnej

H1. Building Programmable Jigsaw Puzzles with RNA.

Arkadiusz Chworos, Isil Severcan, Alexey Y. Koyfman, Patrick Weinkam, Emin Oroudjev, Helen G. Hansma and Luc Jaeger

Science, 306, 2004, 2068-72. (IF2011=31.201, cited:224)

H2. From RNA Tectonics to Programmable Jigsaw Puzzles Made of RNA

Arkadiusz Chworos and Luc Jaeger

Proceedings Foundations of Nanoscience, 2005, 157-162

H3. Controlled Spacing of Cationic Gold Nanoparticles by Nanocrown RNA

Alexey Y. Koyfman, Gary Braun, Sergei Magonov, **Arkadiusz Chworos**, Norbert O. Reich, Luc Jaeger

Journal of the American Chemical Society, 127, 2005, 11886 -11887 (IF2011:9.907, cited:40)

H4. The architectonics of programmable RNA and DNA nanostructures

Luc Jaeger and **Arkadiusz Chworos**

Current Opinion of Structural Biology, 4, 2006, 531-543. (IF2011=9.424, cited:100)

H5. Nucleic acid foldamers: design, engineering and selection of programmable biomaterials with recognition, catalytic and self-assembly properties

Arkadiusz Chworos and Luc Jaeger

Foldamer, by Wiley, Chapter 10, 2007, (book chapter)

H6. Square-Shaped RNA Particles from Different RNA Folds

Isil Severcan, Cody Geary, Erik Verzemnieks, **Arkadiusz Chworos**, and Luc Jaeger

Nano Letters, 2009, vol 9, issue 3, 1270-1277. (IF2011=13.198, cited:29)

H7. A polyhedron made of tRNAs

Isil Severcan, Cody Geary, **Arkadiusz Chworos**, Neil Voss, Erica Jacovetty, Luc Jaeger

Nature Chemistry, 2010, 2, 772 – 779 (IF2011=20.524, cited:28)

H8. Promoting RNA Helical Stacking via A-minor Junctions

Cody Geary, **Arkadiusz Chworos**, Luc Jaeger

Nucleic Acids Research, 2011, 39(2), 1066–1080. (IF2011=8.026, cited:10)

H9. Rational design of RNA nanoparticles and nanoarrays

Arkadiusz Chworos

RNA Nanotechnologies, by Pan Stanford Publishing, 2013

Omówienie tematyki rozprawy pt. „Samo-organizujące się fragmenty RNA”

Tematykę rozprawy można podzielić na dwa zasadnicze tematy:

1. Metodyka racjonalnego projektowania strukturalnych fragmentów RNA i ich zastosowania w bionanotechnologii
2. Zastosowanie technik mikroskopii skaningowej do badania nano-objektów zbudowanych z kwasów nukleinowych

Ad.1 Metodyka racjonalnego projektowania strukturalnych fragmentów RNA i ich zastosowania w bionanotechnologii

Początek badań nad cząsteczkami RNA sięga niemal stu lat wstecz; ich zdolność do przekazywania informacji genetycznej, sposoby fałdowania, a także właściwości regulatorowe są wciąż badane, a ogromny potencjał strukturalny pozostaje nie w pełni wykorzystany. Wielu badaczy określa cząsteczkę RNA jako ‘molekulę życia’, której prekursor mógł stanowić platformę dla pierwszych, samoreplikujących się organizmów ożywionych. Dzisiaj wiemy już, że RNA bierze udział w większości procesów życiowych jako matryca do biosyntezy białek, transporter pojedynczych aminokwasów i główna część maszyneryi rybosomalnej. Krótkie fragmenty RNA stanowią również część aparatu regulatorowego oraz sygnałowego, stosowanego przez Naturę do komunikacji międzykomórkowej.

W roku 2003, w ramach stażu naukowego dołączyłem do grupy badawczej Prof. L. Jaegera. Wspólnie staraliśmy się odpowiedzieć na nurtujące nas pytanie: czy strukturalne fragmenty RNA mogą ulegać samo-organizacji poza naturalnym środowiskiem, w sposób pozwalający na kontrolę kształtu i wielkości powstających cząstek. Opieraliśmy się w tym czasie na dostępnej wiedzy dotyczącej strukturalnych komponentów RNA, takich jak powtarzalność motywów RNA [Leontis *et al.* 2002, Lescoute *et al.* 2005], budowa fragmentów RNA [Leontis and Westhof 2001 and 2003] oraz podstaw reorganizacji motywów RNA w przestrzeni wirtualnej *in-silico* [Jaeger and Leontis 2000, Jaeger *et al.* 2001]. Zagadnienie samo-organizacji zaprogramowanych fragmentów RNA musiało jednak być dokładniej przebadane i udokumentowane. Przedstawione tutaj badania pokazują proces przejścia od ‘*building artificial RNA-based jigsaw puzzle*’, do bionanotechnologii RNA. Streszczenie całej metodologii przedstawione zostało w rozdziale książki, będącej ostatnią pozycją rozprawy [H9].

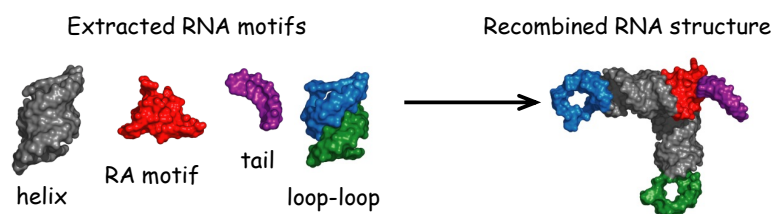
Cząsteczki kwasu rybonukleinowego (RNA), zdolne są, z jednej strony, do transferu informacji genetycznej zdeponowanej w DNA, z drugiej zaś, RNA znane jest ze swej specyficznej aktywności katalitycznej. Poczynając od odkrycia aktywności enzymatycznej rybozymów, poprzez określenie funkcji katalitycznej RNA w rybosomach, poznano aktywności nukleolityczne cząsteczek RNA. Dodatkowo, w ostatnich latach poznano wiele sekwencji aptamerycznych zdolnych do specyficznego wiązania ligandów takich jak np. flawina, ATP, GFP, teofilina (1,3-dimetyloksantyna), itp. Odkryto również fragmenty RNA, tzw. ryboprzełączniki zmieniające swoją strukturę w obecności swoistych ligandów i regulujące w ten sposób ekspresję genów na poziomie transkrypcji i translacji. Niedawno odkryta została również kolejna funkcja krótkich sekwencji RNA. Okazuje się, że część niekodujących fragmentów transkrybowanego RNA (ncRNA), w formie krótkich

(małych) interferujących RNA (siRNA) oraz mikroRNA (miRNA) odpowiedzialna jest za regulację ekspresji genów i prawdopodobnie przekaz sygnałów międzykomórkowych i/lub międzytkankowych.

Odkryciem istotnym dla bionanotechnologii, opierającej się na RNA, było poznanie motywów, obecnych w przestrzennych strukturach RNA [Batey *et al.* 1999, Lescoute *et al.* 2005]. Motywy strukturalne RNA to kilku-kilkunastonukleotydowe fragmenty posiadające charakterystyczne ułożenie przestrzenne. Zauważono, że w przeciwieństwie do formy deoksy-, zasady nukleinowe w RNA zdolne są do tworzenia wiązań wodorowych pomiędzy wszystkimi trzema płaszczyznami nukleotydu, zwanymi dalej: 'Watson-Crick edge' (WC), 'Hoogsteen edge' (H) i 'sugar groove edge' (SG). Biorąc pod uwagę dwa możliwe ułożenia parowania zasad nukleinowych: *cis* (współbieżny względem wiązania glikozydowego) lub *trans* (przeciwbieżny), istnieje potencjalnie możliwość występowania 12 oddziaływań dwóch nukleozydów, przy czym w naturze odnaleziono tylko 11 tego typu połączeń [Leontis and Westhof 2003]. Wiele z tych oddziaływań występuje jednocześnie w jednym motywie, tworząc bardzo stabilne układy przestrzenne. Pozwala to na przypuszczenie, że tak zdefiniowane fragmenty (motywy) będą tworzyły stabilną strukturę, jak w przypadku parowania wyłącznie typu WC, podczas formowania podwójnej helisy DNA czy RNA. Przypuszczenie to było jednak niepotwierdzone w przypadku RNA. Podjęliśmy więc zadanie wykorzystania wiedzy o motywach RNA celem zbudowania sztucznych struktur, mogących fałdować się i samo-organizować w przewidywalny sposób.

Pierwotnym założeniem było skonstruowanie układu zbudowanego z RNA, posiadającego geometryczny kształt, taki by był on dostatecznie unikatowy. Podjęliśmy decyzję, aby zbudować nanocząstkę RNA, przypominającą kształtem kwadrat. W celu usztywnienia całości struktury, wykorzystano motyw tzw. kąta prostego, pobrany ze zdeponowanej w bazie PDB struktury krystalicznej dużej podjednostki rybosomu z *Haloarcula marismortui*, 1FFK [Ban *et al.* 2000].

Dokładna analiza struktury tego 11-nukleotydowego fragmentu, wskazuje na obecność szeregu niekanonicznych wiązań wodorowych, występujących pomiędzy zasadami

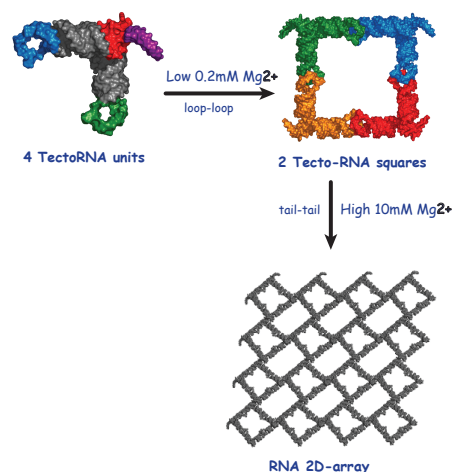


Rys. 1 Projektowanie fragmentów tecto-RNA

nukleinowymi. Cztery oddziaływania typu SG:SG *trans*, z dodatkowymi oddziaływaniami interkalującymi [Grabow *et al.* 2012], zapewniają znaczącą stabilizację struktury tego motywu [Batey *et al.* 1999]. Motyw kąta prostego, 'right-angle' (RA) (czerwone fragmenty, Rys. 1), ułożeniem helis przypomina konstrukcję wieńcową obecną w motywie skrzyżowaniu Hollidaya DNA, tzn. jedna z helis sąsiadujących z motywem ułożona jest przestrzennie nad drugą, w taki sposób, że przedłużenia helis krzyżują się w przestrzeni.

Celem uzyskania zamkniętej formy tetrameru, motywy RA zostały połączone za pomocą innego strukturalnego fragmentu RNA, stanowiącego miejsce startu dimeryzacji, 'dimerization initiation site' (DIS) w strukturze ludzkiego wirusa niedoboru odporności, 'human immunodeficiency virus' (HIV) [Lodmell *et al.* 2000]. Ten stabilny motyw, zbudowany z 6 kanonicznych par zasad, opiera się na oddziaływaniu typu pętla-pętla, które umożliwia usytuowanie, w bliskim sąsiedztwie, dwóch helikalnych fragmentów (niebiesko-zielone elementy, Rys. 1). Trwałość termodynamiczna takiego niekowalencyjnego połączenia, w obecności jonów dwuwartościowych, jest znacznie większa, niż w przypadku występowania wyłącznie parowania zasad typu WC [Woodson 2005]. Wyselekcjonowane motywy (motyw RA i DIS *kissing complex*) zostały połączone za pomocą odpowiedniej długości fragmentów kanonicznej podwójnej helisy RNA (szary fragment, Rys. 1). Odległość pomiędzy motywami nie pozostawała przypadkowa, natomiast została zaprojektowana w taki sposób aby tetramer RNA tworzył formę zamkniętą (Rys. 2). Zgodnie z modelem, w przypadku motywu RA, przestrzeń pomiędzy motywami powinna być wielokrotnością 5 lub 11 par zasad RNA. Trójwymiarowy wirtualny model nanocząsteczki RNA zbudowano wykorzystując oprogramowanie [Swiss-PDB](#). Jest to jeden z niewielu napisanych dotąd programów, pozwalający na relatywne ułożenie fragmentów w przestrzeni trójwymiarowej (dokowanie) w sposób manualny, ich edytowanie na poziomie atomowym, a dodatkowo wykonywanie prostych obliczeń potencjałów elektronowych [Guex and Peitsch 1997]. W oparciu o trójwymiarowy wzorzec (matrycę), możliwe było określenie obecnych struktur drugorzędowych oraz odczytanie zmiennych i stałych (konserwatywnych) fragmentów sekwencji [H1, H4].

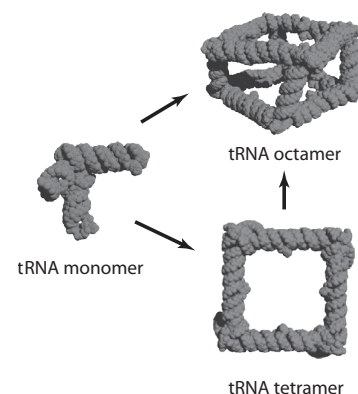
Jednostki RNA posiadające kształt litery L (Rys. 2) zostały zaprojektowane w taki sposób, aby możliwe było łączenie się monomerów poprzez oddziaływania pętla-pętla 'kissing complex' i tworzenie stabilnej struktury kwadratu RNA. W kolejnych etapach otrzymany tetrametr został rozbudowany do dwu i trójwymiarowych obiektów RNA. Do tego wykorzystano jednoniciowe fragmenty motywu kąta prostego (oznaczone kolorem fioletowym, Rys.1) posiadające sekwencyjną specyficzność, co pozwalało na kontrolowanie oddziaływań pomiędzy dwiema jednostkami pod względem kierunku, wielkości i orientacji powstającej struktury. Wykorzystując poszczególne opcje geometrycznego ułożenia jednoniciowego fragmentu stworzyliśmy bibliotekę jednostek tecto-RNA, które, po wymieszaniu, same się organizowały do programowalnych układów nano-siatek 2D różnego typu (Rys. 2 i 4). Metodologia otrzymywania nanocząstek i nano-siatek RNA została opisana w pracach [H1-H2, H4-H5]. Tego typu struktury RNA zostały również wykorzystane do pozycjonowania na nich nanocząstek złota [H3].



Rys. 2 Schemat łączenia się cząsteczek tecto-RNA

W celu poprawy stabilności nano-struktury kwadratu i poszerzenia palety motywów, które mogą być wykorzystywane do projektowania strukturalnych RNA przeszukiwaliśmy wśród dostępnych danych krystalograficznych zdeponowanych w bazie PDB płaskich motywów RNA, z układem trzech helis ułożonych w kształt litery T. Wynikiem było wyselekcjonowanie tzw. motywu 3WJ (*3-way junction*), należącego do rodziny opartej na platformie niekanonicznego oddziaływania U:A, zwanego *UA_handle* [Jaeger *et al.* 2009]. Wybrany motyw, pochodzi ze struktury 23S rRNA, z *Haloarcula marismortui* [Ban *et al.* 2000], a zbudowany jest z trzech helis - dwie ułożone są współosiowo, a trzecia usytuowana pod kątem 90° do pozostałych [H6].

Kolejnym, niezwykle stabilnym, strukturalnym motywem RNA, stosowanym do konstruowania nanocząstek tecto-RNA [H6], a później trójwymiarowego prostopadłościanu [H7], był motyw tRNA. Należący do rodziny motywów wielokierunkowych, motyw tRNA pochodzi z licznie występujących w komórkach cząsteczek tRNA. Motyw ten jest stabilizowany poprzez wewnątrzcząsteczkowe oddziaływania dalekiego zasięgu, typu pętla-pętla (D-T), prowadzące do zwartego upakowania cząsteczki tRNA (Rys. 3).



Rys. 3 Antygraniastosłup tRNA

Ad. 2 Zastosowanie technik mikroskopii skaningowej do badania nano-objektów zbudowanych z kwasów nukleinowych

Kluczowym w badaniach nad samo-organizacją RNA było wybranie odpowiedniej techniki pozwalającej na badanie struktury przestrzennej oraz stabilności motywów RNA, jak również analizy kształtu i integralności konstruowanych nanocząsteczek i nano-siatek RNA. W związku z faktem, że większość spośród badanych struktur jest transparentna dla wiązki elektronowej wykorzystywanej m.in. w elektronowej mikroskopii skaningowej – SEM (*Scanning Electron Microscopy*) oraz transmisyjnej mikroskopii elektronowej – TEM (*Transmission Electron Microscopy*), stosowanie tych metod, bez dodatkowego napyłania cząstek metali, lub redukcji soli metali na powierzchni biomolekuł jest niemożliwe. Natomiast niskoenergetyczna analiza elektronowa Cryo-EM, połączona z rekonstrukcją pojedynczej nanocząstki, nie była w tym czasie wystarczająco dokładna. Co więcej metodyka cryo-EM, podobnie jak krystalografia rentgenowska wymaga pozyskania znacznych ilości materii. W tej sytuacji jedyną właściwą metodą pomiarową okazała się mikroskopia sił atomowych AFM (*Atomic Force Microscopy*). Wprowadzona w latach 80-tych przez Gerda Binniga i Heinricha Rohrera, mikroskopia AFM jest metodą powszechnie stosowaną w analizie topologii powierzchni relatywnie twardych, takich jak powierzchnie krzemowe, polimerowe czy krystaliczne. W pierwszym etapie technikę AFM należało dostosować do badania relatywnie miękkich powierzchni zbudowanych z materiałów pochodzenia biologicznego. Dodatkowo, badania miały być prowadzone w naturalnym środowisku buforowym w przeciwieństwie do typowej analizy powierzchni ciał stałych.

Ówczesnie opracowany tryb *'tapping-mode'* (badanie powierzchni za pomocą igły pomiarowej oscylującej w pobliżu częstotliwości rezonansowej i zmiany tej częstotliwości w zetknięciu z powierzchnią), okazał się najwłaściwszy do badania biomateriałów.

Płaska powierzchnia kryształów miki jest najczęściej stosowanym materiałem do deponowania i analizy próbek biologicznych, jednak procedura osadzania nanocząstek RNA wymagała optymalizacji. Odrębna procedura została zastosowana w przypadku nano-siatek RNA (Rys. 2), w których proces samo-organizacji nanocząstek na powierzchni miki jest ściśle kontrolowany przez dwuwartościowe jony metali, odpowiedzialne za stabilizację struktury, ale również za wiązanie ujemnie naładowanych obiektów zbudowanych z RNA z powierzchnią miki.

Opracowana przez nas metodologia **racjonalnego projektowania nanocząstek tecto-RNA** została zaadaptowana do wytwarzania i badania różnych obiektów zbudowanych z nanocząstek RNA [H6], w tym zamkniętych i otwartych dwuwymiarowych 'nano-siatek' [H1], trójwymiarowych 'nano-pudełek' RNA [H7], jednostek heksagonalnych [Grabow *et al.* 2011, Afonin *et al.* 2012] itp. Aktualnie jest to uniwersalna metoda (*architectonics RNA*), jaką można zastosować do projektowania dowolnych kształtów przestrzennych RNA.

Szczegółowy opis wybranych prac naukowych:

H1. Building Programmable Jigsaw Puzzles with RNA

Arkadiusz Chworos, Isil Severcan, Alexey Y. Koyfman, Patrick Weinkam, Emin Oroudjev, Helen G. Hansma, Luc Jaeger, *Science*, 306, 2004, 2068-72. (IF2011: 31.201, cited: 224)

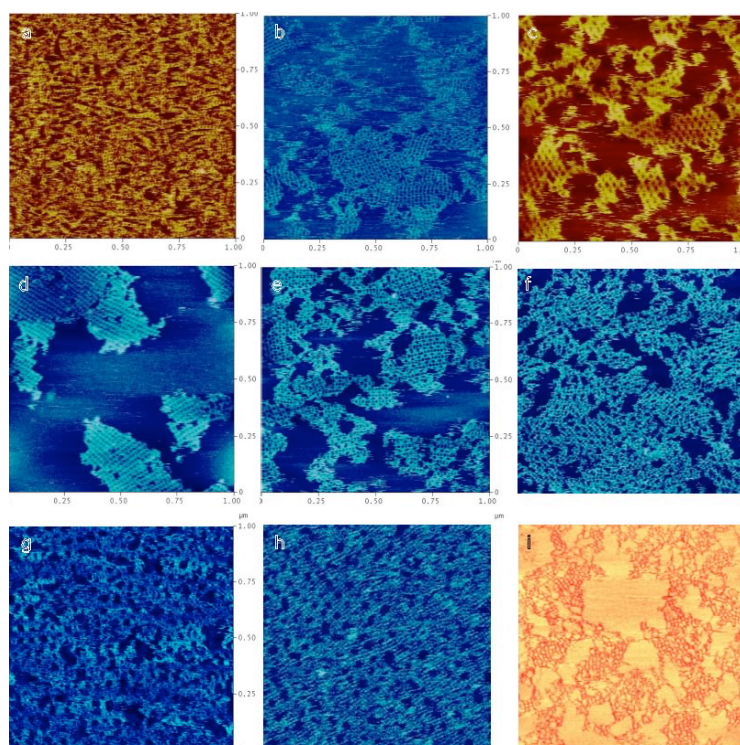
Praca ta była pierwszym komunikatem opisującym proces projektowania i syntezy sztucznych, stabilnych nanocząstek RNA, przyjmujących zaplanowany kształt geometryczny. Pracę rozpoczęliśmy od zaprojektowania tetrameru RNA o kształcie kwadratu. Celem osiągnięcia właściwego sfałdowania i usytuowania monomerów tecto-RNA zastosowaliśmy motyw kąta prostego, *'right angle'* (RA), w skład którego wchodzi 11 wysoce konserwatywnych nukleotydów [Gagnon and Steinberg 2002], co powoduje ułożenie sąsiadujących helis pod kątem 90° (Rys. 1). Ten kompaktowy motyw, przedłużony za pomocą kanonicznych podwójnych helis RNA, był połączony z sąsiadującym fragmentem RNA za pomocą kolejnego oddziaływującego współliniowo motywu strukturalnego typu pętla-pętla, *'kissing loops'* (KL) [Lodmell *et al.* 2000]. Modelowanie było prowadzone w wirtualnej przestrzeni trójwymiarowej, przy użyciu oprogramowania SwissPDBviewer [Guex and Peitsch 1997], które pozwala na wyizolowanie motywów z większych strukturalnych fragmentów RNA i ich względne ułożenie (Rys. 1). Tak otrzymane trójwymiarowe modele były następnie wykorzystywane do zaprojektowania sekwencji poszczególnych monomerów. Cząsteczki RNA otrzymano w warunkach *in-vitro*, w procesie transkrypcji na matrycy dwuniciowego DNA (dsDNA). Dwuniciowe DNA zawierające sekwencję promotorową dla polimerazy T7 otrzymywane były na syntetycznej matrycy oligonukleotydu w reakcji PCR, co zapewniało dużą 'czystość sekwencyjną'

końców dupleksu. Jednostki tecto-RNA, po oczyszczeniu i wyizolowaniu, były poddane fałdowaniu i samo-organizacji do form 'kwadratów'. Proces prowadzono w układach buforowych (TBE) z dodatkiem jonów dwuwartościowych (Mg^{2+}). Jony dwuwartościowe metali są niezbędne do prawidłowego fałdowania RNA, i stabilizacji struktury przestrzennej nanocząstek. Otrzymano „kwadraty” RNA, które okazały się wystarczająco stabilne i mogły być wyizolowane, za pomocą technik żelowych (agaroza, natywny PAGE). W kolejnym etapie odpowiednio zaprogramowane (w części jednoniciowej) „kwadraty” RNA były wzajemnie łączone tak, aby mogły tworzyć nieskończone szeregi i siatki dwuwymiarowe (Rys. 2 i 4) lub całkowicie programowalne zamknięte „klatki” [H2]. Procedury samoistnego organizowania się RNA nie były w tym czasie dostępne, co wymagało opracowania odpowiednich protokołów, łącznie ze składem buforu i metodyką fałdowania. Do tego celu należało zaprojektować i zbudować niewielką, hermetycznie zamkniętą kapsułę do przygotowywania próbek w warunkach kontrolowanej wilgotności i temperatury. Kapsuła ta pozwalała na otrzymywanie nano-struktur RNA na ułożonych horyzontalnie krążkach z miki w gradiencie temperatury, w czasie 48-72h.

W pracy tej zbadano także wpływ ukierunkowania i orientacji fragmentów jednoniciowych usytuowanych na narożach tetrameru, na geometrię powstających kompleksów. Precyzyjna kontrola oddziaływań (na podstawie swoistości sekwencji), pozwoliła zaprojektować zróżnicowane nanoukłady RNA, otrzymywane w wyniku mieszania odpowiednich komponentów, małych (10 nm) i dużych (13 nm) jednostek kwadratów tecto-RNA (Rys. 4).

Wykorzystując różny poziom stabilności pomiędzy wiązaniem pętla-pętla w obrębie tetrameru, a 6-nukleotydowymi jednoniciowymi

oddziaływaniami pomiędzy kwadratami, płaskie kompleksy RNA mogły być otrzymywane etapowo. Na początku zamknięte tetramery formowano w niskim stężeniu (0.2 mM) jonów magnezowych, koniecznych jedynie do stabilizacji motywów RA i oddziaływań typu pętla-pętla. Następnie, kwadraty były mieszane w 1 mM stężeniu jonów magnezowych i składane w większe układy.



Rys. 4 Płaskie nano-siatki zbudowane z tecto-RNA .

Prezentowane w tej publikacji wysokorozdzielcze obrazy, otrzymane metodą mikroskopii sił atomowych, pokazują jednoznacznie założony kwadratowy kształt obiektu. Warty uwagi jest jednak fakt, iż zdjęcia te są rezultatem szeregu badań wstępnych poświęconych na opracowanie właściwej procedury otrzymywania i

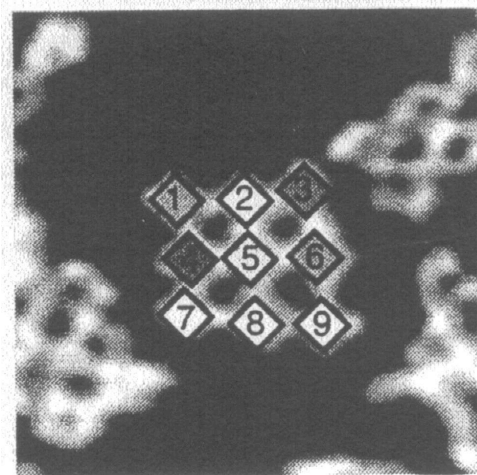
osadzania próbek na powierzchni mineralnej miki oraz analizę za pomocą AFM. Dzięki współpracy z laboratorium Prof. Paula i Helen Hansma, mieliśmy dostęp do najnowszych instrumentów mikroskopii skaningowej.

Motyw kata prostego, główny element strukturalny wykorzystany w tej pracy był ostatnio przedmiotem dokładnych badań znaczenia konserwatywności sekwencyjnej, jego stabilności oraz procesu fałdowania [Grabow *et al.* 2012]. W kilku miejscach krystalicznej struktury rRNA odnaleziono modułowy komponent, składający się z dwóch motywów 'GA-minor' (G:A SG:SG *trans*), występujących w obu helisach motywu RA.

H2. From RNA Tectonics to Programmable Jigsaw Puzzles Made of RNA

Arkadiusz Chworos, Luc Jaeger, *Proceedings Foundations of Nanoscience*, 2005, 157-162

Praca ta omawia ogólną procedurę projektowania, syntezy i analizy nanocząstek RNA. Kluczowym w tym komunikacie było jednak zaprezentowanie po raz pierwszy wyników pokazujących otrzymanie całkowicie kontrolowanych nano-siatek zbudowanych z RNA. Struktura '3x3', zbudowana z 9 różnych tetramerów organizuje się samoistnie przy udziale 12 specyficznych oddziaływań typu ogon-ogon, 'tail-tail' (Rys. 5). Do tego celu wyselekcjonowane zostało kilkanaście specyficznych sekwencji dupleksów RNA (o długości 6-ciu par zasad). Uzyskano to przy pomocy programu, napisanego w języku programowania Java, który to pozwalał na wyszukiwanie termodynamicznie specyficznych sekwencji RNA w oparciu o algorytm najbliższego sąsiada, 'nearest-neighbor' [Mathews 2006]. Program ten generował bazę danych wszystkich możliwych 6-nukleotydowych sekwencji RNA, następnie odrzucał te komplementarne ($\Delta\Delta G > 2.5\text{kcal}$) do sekwencji w obrębie pętli wewnętrznych i, ostatecznie, wyszukiwał 12 specyficznych sekwencji tworzących najbardziej trwałe dupleksy RNA.



Rys. 5 W pełni programowalna nano-siatka zbudowana z RNA.

Odkrycie w pełni adresowalnych nano-siatek RNA okazało się ważnym krokiem z punktu widzenia kontrolowanego pozycjonowania funkcjonalnych nanocząstek, czy też białek na powierzchni takich siatek [Yan *et al.* 2003]. Na przykład, możemy sobie wyobrazić kowalencyjne połączenie metalicznych nanocząstek z jedną z cząsteczek RNA wchodzących w skład sieci, po złożeniu których będzie możliwe wygenerowanie obrazu i analiza pojedynczej nanocząstki 'single particle analysis' [Liu *et al.* 2005]. Strategię podobną do tej stosowano w przypadku nanotechnologii DNA [Feng *et al.* 2003], jednak w prezentowanej pracy po raz pierwszy pokazaliśmy całkowicie adresowalną strukturę zbudowaną z RNA.

H3. Controlled Spacing of Cationic Gold Nanoparticles by Nanocrown RNA

Alexey Y. Koyfman, Gary Braun, Sergei Magonov, Arkadiusz Chworos, Norbert O. Reich, Luc Jaeger

Journal of the American Chemical Society, 127, **2005**, 11886 -11887 (IF2011:9.907, cited:40)

Tematyka tej pracy pokazuje zastosowanie, opracowanej wcześniej metodologii racjonalnego projektowania ustrukturyzowanych fragmentów RNA do otrzymania zdefiniowanych przestrzennie nano-drabinek RNA i osadzania na nich nanocząstek złota. Projektowanie, synteza i analiza spektroskopowa nanocząstek tecto-RNA i struktur liniowych drabinek RNA wykonana została przeze mnie lub bezpośrednio pod moim nadzorem. Sprawowałem opiekę nad ówczesnym studentem Alexeyem Koyfmanem, który jest pierwszym autorem pracy. Głównym celem badań było precyzyjne pozycjonowanie nanocząstek złota (AuNP) za pomocą ich oddziaływań elektrostatycznych z grupami fosforanowymi w zagłębieniach kwadratów RNA. Projekt ten inspirowany był chęcią zbadania mechanizmu tunelowania elektronowego na nanocząstkach złota, wymagający precyzyjnego umiejscowienia AuNP pomiędzy dwoma elektrodami [Mirkin *et al.* 1996, Bates *et al.* 2006]. Efekt ten zależy od wielkości nanocząstek metalu szlachetnego (4-10 nm) i niewielkiej odległości pomiędzy cząstkami (1-4 nm). Zakładając możliwość kontroli wielkości jednostek tecto-RNA oraz odległości pomiędzy nimi, za pomocą długości połączeń dwuniciowych RNA, usytuowanie AuNP w zagłębieniach jest przewidywalne i na tej podstawie kontrolowane mogą być odstępy pomiędzy nanocząstkami złota. W naszym przypadku zakładana odległość pomiędzy środkami kwadratów była rzędu 11-12 nm. Praca ta pokazuje przewagę stosowania „nano-drabinek” zbudowanych z RNA nad nieustrukturyzowanymi dwuniciowymi DNA, w których odległości pomiędzy przyłączonymi cząstkami złota były zróżnicowane z powodu ich statystycznego rozkładu wzdłuż helisy DNA.

H4. The architectonics of programmable RNA and DNA nanostructures

Luc Jaeger, Arkadiusz Chworos

Current Opinion of Structural Biology, 4, **2006**, 531-543. (IF2011=9.424, cited:100)

Był to pierwszy przegląd, w którym porównaliśmy różne podejścia do bionanotechnologii DNA i RNA. W owym czasie znacznie większym zainteresowaniem oraz wsparciem finansowym cieszyła się bionanotechnologia oparta o DNA (niż znacznie młodsza tecto-RNA). W tym artykule pokazaliśmy przewagę stosowania RNA, jako budulca do konstrukcji biologicznych nanomateriałów, a także metody samoorganizacji nanocząsteczek RNA w biokompatybilne układy strukturalne. Ponadto, omówione zostały w tej pracy metody wizualizacji bionanocząstek, procesy łączenia motywów DNA i RNA, zasady tworzenia układów stabilnych (*tensegrity*) dla sztywnych elementów strukturalnych oraz metodologia oparta na tecto-RNA.

H5. Nucleic acid foldamers: design, engineering and selection of programmable biomaterials with recognition, catalytic and self-assembly properties

Arkadiusz Chworos, Luc Jaeger

Foldamers, by Wiley, Chapter 10, 2007, (book chapter)

W oparciu o wcześniej opisany przegląd przygotowany został również rozdział do książki, wydawnictwa Wiley, pod tytułem „*Foldamers*”. W rozdziale tym przedstawione zostały zasady obowiązujące przy projektowaniu pierwszo-, drugo- i trzeciorzędowych struktur zbudowanych z kwasów nukleinowych; a więc zasady kierujące wzorcem fałdowania i samoorganizacji nanocząsteczek DNA i RNA. Opisane zostały również „czwartorzędowe” oddziaływania dla wieloelementowych układów supramolekularnych, które mogą być generowane w sposób przewidywalny co do kształtu, orientacji i liczby tworzonych sprzężeń/połączeń.

Modularność strukturalnych fragmentów RNA dostarcza zbioru funkcjonalnych motywów, takich jak ryboprzełączniki, rybozomy, aptazymy i aptamery. Rozpatrywane są tu także metody selekcji oraz chemicznych modyfikacji, które potencjalnie mogą zostać wykorzystane w projektowaniu nowych funkcjonalnych nanocząsteczek, z kontrolowaną strukturalną i chemiczną stabilnością.

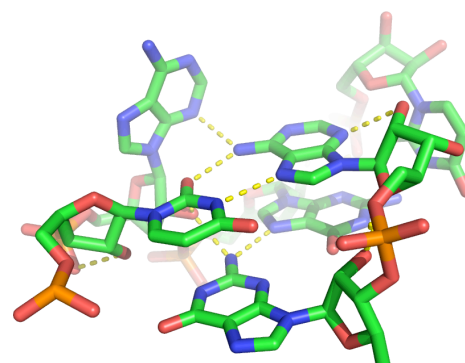
H6. Square-Shaped RNA Particles from Different RNA Folds

Isil Severcan, Cody Geary, Erik Verzemnieks, Arkadiusz Chworos, Luc Jaeger

Nano Letters, 2009, vol 9, issue 3, 1270-1277. (IF2011=13.198, cited:29)

Badania opisane w omawianej pracy stanowiły rozwinięcie opracowanej metody projektowania nanocząsteczek RNA, w oparciu o motyw kąta prostego RA [H1]. W pracy tej dokonaliśmy porównania znanego już motywu strukturalnego z motywami nowo wyselekcjonowanymi, takimi jak motyw trójramienny, ‘three way-junction’ (3WJ) oraz motyw całego tRNA.

Motyw 3WJ fałduje się do struktury przypominającej kształt litery T, z dwiema helisami leżącymi wzdłuż jednej osi oraz trzecią usytuowaną pod kątem 90° do pierwszych dwóch. Motyw 3WJ jest połączeniem submotywu G/AR (R - zasada purynowa A, G), z platformą A-mniejszą ‘A-minor’ oraz ostrym zagięciem nici, ‘U-turn’. Motyw 3WJ tworzy rekurencyjne i stabilne upakowanie należące do rodziny UA-handle (Rys. 6), dokładniej opisanej w pracy Jaegera i wsp. [Jaeger *et al.* 2009].



Rys. 6 Motyw 3WJ należący do rodziny UA_handle

Kolejnym motywem wykorzystanym w tej pracy był motyw tRNA. Transferowy RNA naturalnie odpowiedzialny jest za dostarczanie pojedynczych aminokwasów podczas procesu biosyntezy białek, zgodnie ze specyficzną sekwencją kodu genetycznego zawartego w mRNA. Ostatnie doniesienia literaturowe pokazują, że

tRNA zaangażowany jest również w inne procesy wewnątrzkomórkowe. Przykładowo, fragmenty pochodzące z degradacji tRNA (tRFs), produkowane w czasie stresu oksydacyjnego, mogą być odpowiedzialne za regulację ekspresji genów oraz proliferację komórek [Lee *et al.* 2009, Nawrot *et al.* 2011]. Ostatnio zaobserwowano również, że mitochondrialne tRNA oddziałuje z cytochromem C, z większym powinowactwem od pozostałych typów RNA, a powstały kompleks może odgrywać istotną rolę w wewnątrzkomórkowym procesie programowalnej śmierci komórki [Mei *et al.* 2010].

Pomimo, że tRNA jest jedną z najlepiej poznanych cząsteczek RNA, jego potencjał strukturalny nie został jeszcze całkowicie wykorzystany. W naszych badaniach zastosowaliśmy motyw tRNA, znany z charakterystycznego ufałdowania w kształt litery L, w którym ramię aminoacylowe i ramię antykodonowe usytuowane są pod kątem 90°. W omawianej pracy dokonaliśmy metodycznego porównania tworzenia zamkniętych tetramerów RNA, opartych o motywy RA, 3WJ i tRNA. Okazało się, że przestrzenny kształt tetramery uzależniony jest od użytego motywu, warunkując w ten sposób właściwości struktur tecto-RNA w kontekście energii ich oddziaływania z powierzchnią minerałów. Tetramer zbudowany z jednostek zawierających motyw kąta prostego (opisany w **H1**) okazał się być stosunkowo elastyczny, jednakże w strukturze o konstrukcji wieńcowej, 'cabin-log', powierzchnia oddziaływania z powierzchnią miki jest ograniczona. Skutkowało to niewielką ilością materii obserwowaną na powierzchni płytki metodą AFM. Tetramer 3WJ jest obiektem relatywnie płaskim i wykazuje największe powinowactwo do powierzchni mineralnych. Potwierdziła to duża liczba cząstek RNA, opartych na 3WJ, widocznych w obrazach AFM. Nanocząstka oparta na motywie tRNA posiada na każdym rogu dodatkową pętlę 'variable loop', co powoduje osłabienie oddziaływania z płytką: podczas analizy obserwowano na powierzchni miki mniejszą ilość materii.

W pracach nad motywem tRNA usiłowaliśmy także otrzymać trójwymiarowe nanocząsteczki, składające się z 3 kwadratów tecto-RNA. Udało się zebrać wystarczające dowody potwierdzające tę strukturę, a szersza analiza wielowymiarowych obiektów RNA przedstawiona jest w kolejnym artykule [**H7**].

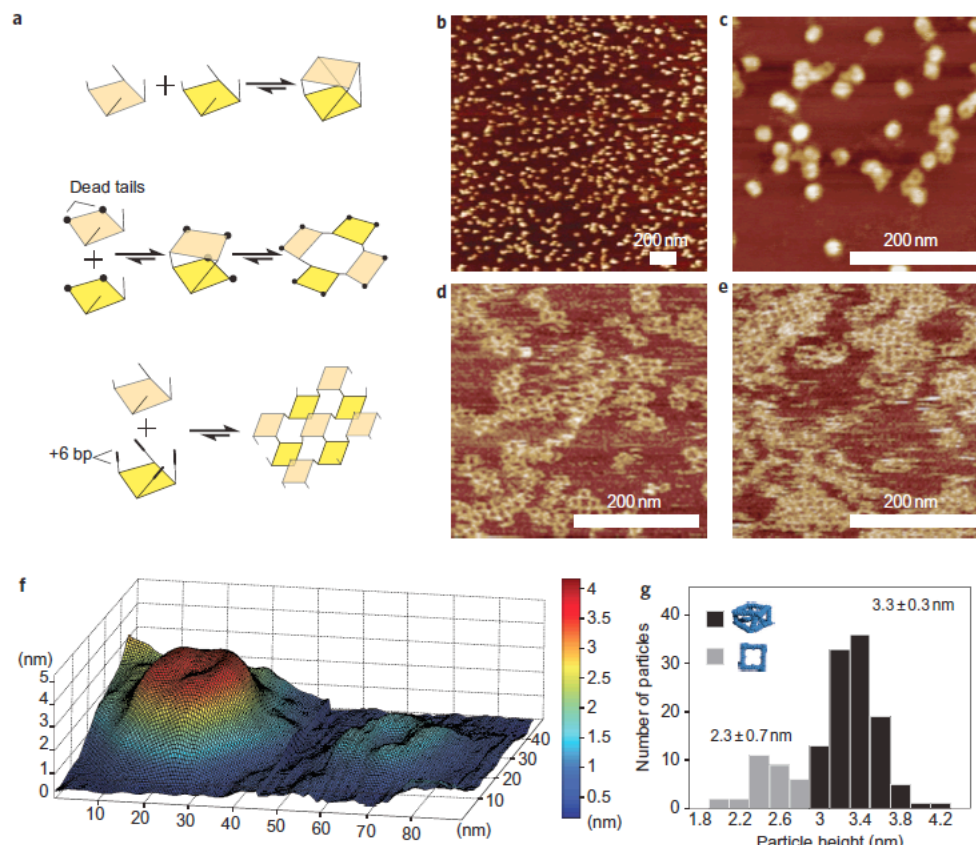
H7. A polyhedron made of tRNAs

Isil Severcan, Cody Geary, Arkadiusz Chworos, Neil Voss, Erica Jacovetty, Luc Jaeger
Nature Chemistry, 2010, 2, 772 – 779 (IF2011=20.524, cited:28)

Zdobyte doświadczenia w dziedzinie racjonalnego projektowania nanocząstek RNA i analizy struktury za pomocą opracowanych przez nas technik biochemicznych i spektroskopowych pozwoliły na podjęcie prób zbudowania wielowymiarowych funkcjonalnych nanocząstek RNA. Budowa sześciennych obiektów, złożonych z kwasów nukleinowych została po raz pierwszy przedstawiona przez Nadriana C. Seemana, inicjatora nanotechnologii opartej o DNA [Seeman 1982 i 2005]. Pomysł utworzenia nano-sześcianu zbudowanego z DNA był ambitny, ale na tyle trudny, że udowodnienie tworzenia się stabilnych 'DNA scaffolds' udało się dopiero po 10

latach. Zainspirowani tymi pracami zastosowaliśmy metodykę racjonalnego projektowania RNA, wykorzystując poznany wcześniej motyw tRNA, do budowy stabilnej struktury nano-sześcianu RNA. Wcześniej opisany projekt [H6], bazujący na cyklicznej permutacji RNA klasy II, zakładał zamianę otwartej helisy z ramienia aminoacylowego tRNA w pętlę, z jednoczesnym otwarciem pętli zmiennej '*variable loop*'. Takie ułożenie przestrzenne motywu pozwoliło na uzyskanie zamkniętej formy tetrameru (podobnie jak z motywem RA i 3WJ), i jednoczesne wykorzystanie części otwartej helisy do połączenia dwóch podjednostek sześcianu (Rys. 7). Dokładna analiza motywu pokazała, iż kąt ustawienia ramienia zmiennego tRNA będzie nadawał nanocząstce RNA raczej kształt antygraniastosłupa, a nie regularnego sześcianu. Alternatywnie, gdy połączenia otwartych helis pomiędzy tetramerami zostaną odwrócone o kąt 180°, kwadraty RNA powinny utworzyć płaską formę nano-siatki RNA (Rys. 7). Właściwa charakterystyka przestrzennych obiektów, występujących w postaci antygraniastosłupa okazała się bardziej wymagającym elementem badań.

W wyniku analizy powierzchni zdeponowanych w roztworach buforowych „nano-sześcianów”, otrzymano niskorozdzielcze obrazy; struktura nano-sześcianów była zbyt giętka i poddawała się naciskom igły AFM. Gdy zastosowano technikę pomiaru w warunkach bezwodnych, dehydratacja powodowała rozpad całej struktury. Ostatecznie, zastosowana mikroskopia cryo-EM dostarczyła niezaprzeczalnych danych strukturalnych, potrzebnych do kompletnej charakterystyki tych nanocząsteczek zbudowanych z RNA. Interesującym uzupełnieniem było badanie zjawiska samo-organizacji prostopadłościanów, które inicjowano w oparciu o oddziaływanie wielodomenowego białka (streptawidyny) jako łącznika. W tym celu dwie z cząsteczek tRNA zostały chemicznie zmodyfikowane w części ramion zmiennych, biotynylowanym łańcuchem alkilowym (na przeciwnych stronach prostopadłościanu). Pozwoliło to na połączenie dwóch nanocząstek RNA z pojedynczą cząsteczką białka, a w konsekwencji utworzenie łańcuchowego 'kopolimeru' RNA-białko (w ilości od 5 do 14 jednostek powtarzalnych). Usytuowanie biotyny w kierunku do wnętrza prostopadłościanu umożliwił, w prawdzie połączenie RNA ze streptawidyną, jednakże w takim układzie proces oligomeryzacji nie mógł zajść i nanocząsteczki pozostawały rozłączone.



Rys. 7 Kwadrat tRNA może być zaprojektowany (a) w taki sposób aby utworzył zamknięty sześcian RNA (b,c), tetramer w kształcie krzyża (d) lub nano-siatkę RNA (e). Zdjęcie przestrzenne pojedynczego sześcianu (z lewej) lub kwadratu (z prawej) przedstawia panel f.

H8. Promoting RNA Helical Stacking via A-minor Junctions

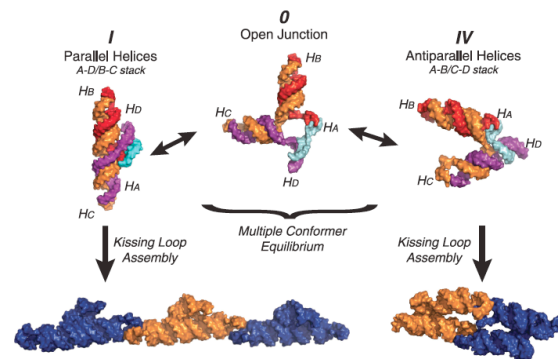
Cody Geary, Arkadiusz Chworos, Luc Jaeger

Nucleic Acids Research, 2011, 39(2), 1066–1080 (IF 2011:8.026, cited:10)

W tej pracy zaprezentowano nowe podejście zastosowania technologii strukturalnych tecto-RNA do projektowania tzw. rybo-przełączników 'riboswitches'. Główna idea polegała na otrzymaniu programowalnych biomolekuł, które posiadają potencjał zmiany struktury pod wpływem czynnika zewnętrznego, np. wiązania się z ligandem niskocząsteczkowym lub białkiem (np. białkiem).

Modelowanie opierało się na wykorzystaniu motywu wieloramiennego '4-way-junction' (4WJ), stanowiącego część platformy A-minor dla helis (H57–H59), pochodzących ze struktury krystalicznej *Haloarcula marismortui* 23S rRNA (PDB ID: [1JJ2](#)). Dwie z helis oddziaływały na zasadzie pętla-pętla, DIS HIV (PDB ID: [2B8R](#), ówczesny 1JJM).

W oparciu o te specyficzne oddziaływania, wieloramienna cząsteczka RNA (Rys. 8) posiadała, w zależności od konformacyjnych zmian motywu centralnego, zdolność



Rys. 8 Nanocząstka tecto-RNA (O) ulega konformacyjnej zmianie do ułożenia równoległego (I) i dalej mutimeryzacji lub przekształceniu do (IV) i utworzeniu dimeru.

tworzenia zamkniętych nanocząstek dimerycznych lub długich, liniowych połączeń multimerycznych. Czynnikiem determinującym było zastosowanie mutacji w przestrzeni oddziaływania pętla-receptor (H_A-H_C). Specyficzne wiązanie pętli GAAA z motywem 11-nt powodowało usztywnienie struktury, a w konsekwencji oligomeryzacja do długich łańcuchów RNA. Praca ta prezentuje szczegóły modelowania i badań strukturalnych cząsteczki RNA reagującej na zmiany w warunkach zewnętrznych (skład roztworu).

H9. Rational design of RNA nanoparticles and nanoarrays

Arkadiusz Chworos

RNA Nanotechnologies, Pan Stanford Publishing 2012, **(book chapter)**

Opracowanie to (opublikowane, jako rozdział do książki) podsumowuje metodologię tecto-RNA oraz aktualną wiedzę w dziedzinie racjonalnego projektowania nanocząsteczek RNA. Zainspirowany różnymi podejściami, zarówno teoretycznymi, jak i eksperymentalnymi (analiza wzorców fałdowania RNA, badanie wyizolowanych motywów, synteza cząsteczek tecto-RNA, oddziaływania RNA-białko) omawiany rozdział prezentuje cel budowy programowalnych, w pełni funkcjonalnych cząsteczek RNA. Cząsteczki te mogą potencjalnie znaleźć rozliczne zastosowania, takie jak nośniki informacji genetycznej o funkcji regulatorów ekspresji genów, indukcji apoptozy czy testy do wykrywania gatunków patogennych. Praca ta odzwierciedla rozwinięcie zainteresowań naukowych, z podstawowych badań oddziaływań RNA, do praktycznego zastosowania bionanotechnologii RNA. Jakkolwiek sam pomysł wykorzystania technologii interferencji racjonalnie modelowanych nanocząsteczek RNA po raz pierwszy został zaprezentowany w roku 2005 [Khaled *et al.* 2005], przez lata nie znalazł rozwinięcia. Metodologia wbudowywania funkcjonalnych sekwencji regulujących ekspresję genów w wielofunkcyjną cząsteczkę, nie jest do końca opracowana. Istotnym jest, aby z jednej strony fragment małego interferującego RNA (siRNA) chroniony był przed szkodliwym wpływem enzymów nukleolitycznych, ale z drugiej by został uwolniony z nanocząstki RNA za pomocą specyficznych endonukleaz typu Ago lub Dicer, a następnie winkorporowany w kompleks wyciszający RISC. Doniesienia z ostatnich 2 lat sugerują znaczne postępy na tym polu [Shu *et al.* 2011, Grabow *et al.* 2011, Afonin *et al.* 2012]. Tematyka ta znajduje się również w centrum zainteresowania naszego laboratorium.

Spis literatury

Afonin KA, Kireeva M, Grabow WW, Kashlev M, Jaeger L, Shapiro BA (2012) Co-transcriptional assembly of chemically modified RNA nanoparticles functionalized with siRNAs. *Nano Lett.* 12, 5192–5195.

Ban N, Nissen P, Hansen J, Moore PB and Steitz TA (2000) The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science*, 289, 905-920.

Bates AD, Callen BP, Cooper JM, Cosstick R, Geary C, Glidle A, Jaeger L, Pearson JL, Proupin-Perez M, Xu C. et al. (2006) Construction and characterization of a gold nanoparticle wire assembled using Mg²⁺-dependent RNA-RNA interactions. *Nano Lett.*, 6, 445-448.

Batey RT, Rambo RP, Doudna JA (1999) Tertiary Motifs in RNA Structure and Folding. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 38, 2326-2343.

Feng L, Park SH, Reif JH, Yan H (2003) A two-state DNA lattice switched by DNA nanoactuator. *Angew Chem Int Ed Engl.* 42, 4342-4346.

Gagnon MG, Steinberg SV (2002) GU receptors of double helices mediate tRNA movement in the ribosome. *RNA* 8, 873-877.

Grabow WW, Zakrevsky P, Afonin KA, Chworos A, Shapiro BA and Jaeger L (2011) Self-assembling RNA nanorings based on RNAI/II inverse kissing complexes. *Nano Lett.*, 11, 878-887.

Grabow WW, Zhuang Z, Swank ZN, Shea JE, Jaeger L (2012) The right angle (RA) motif: a prevalent ribosomal RNA structural pattern found in group I introns. *J. Mol. Biol.* (1-2), 54-67.

Guex N, Peitsch MC (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling. *Electrophoresis* 18, 2714-2723

Jaeger L, and Leontis NB (2000) Tecto-RNA: one-dimensional self-assembly through tertiary interactions. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 39, 2521-2524.

Jaeger L, Verzemnieks EJ and Geary C (2009) The UA₁ handle: a versatile submotif in stable RNA architectures. *Nucleic Acids Res.*, 37, 215-230.

Jaeger L, Westhof E and Leontis NB (2001) TectoRNA: modular assembly units for the construction of RNA nano-objects. *Nucleic Acids Res.*, 29, 455-463.

Khaled A, Guo S, Li F and Guo P (2005) Controllable self-assembly of nanoparticles for specific delivery of multiple therapeutic molecules to cancer cells using RNA nanotechnology. *Nano Lett.*, 5, 1797-1808.

Lescoute A, Leontis NB, Massire C, Westhof E (2005) Recurrent structural RNA motifs, Isostericity Matrices and sequence alignments. *Nucleic Acids Res.*, 33, 2395–2409.

Lee YS, Shibata Y, Malhotra A, Dutta A (2009) A novel class of small RNAs: tRNA-derived RNA fragments (tRFs). *Genes Dev.* 23, 2639-2649.

- Leontis NB and Westhof E (2001) Geometric nomenclature and classification of RNA base pairs. *RNA*, 7, 499-512.
- Leontis NB and Westhof E (2003) Analysis of RNA motifs. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 13, 300-308.
- Leontis NB, Stombaugh J and Westhof E (2002) The non-Watson–Crick base pairs and their associated isostericity matrices. *Nucleic Acids Res.*, 30, 3497–3531.
- Liu Y, Ke Y, Yan H (2005) Self-assembly of symmetric finite-size DNA nanoarrays. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 17140-17141.
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D and Darnell J (2000) *Molecular Cell Biology*. 4th edition, New York: W. H. Freeman.
- Lodmell JS, Ehresmann C, Ehresmann B and Marquet R (2000) Convergence of natural and artificial evolution on an RNA loop-loop interaction: the HIV-1 dimerization initiation site. *RNA*, 6, 1267-1276.
- Mathews DH (2006) RNA secondary structure analysis using RNAstructure. *Current Protocols in Bioinformatics*, 12.6.1-12.6.14.
- Mei Y, Yong J, Liu H, Shi Y, Meinkoth J, Dreyfuss G, Yang X (2010) tRNA binds to cytochrome c and inhibits caspase activation. *Mol Cell*. 37, 668-78.
- Mirkin CA, Letsinger RL, Mucic RC, Storhoff JJ (1996) A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. *Nature* 382, 607 - 609.
- Nawrot B, Sochacka E, Döchler M (2011) tRNA structural and functional changes induced by oxidative stress. *Cell Mol Life Sci.* 68(24):4023-32.
- Seeman NC (1982) Nucleic Acid Junctions and Lattices. *J. Theor. Biol.* 99, 237-247
- Seeman NC (2005) From genes to machines: DNA nanomechanical devices. *Trends Biochem Sci* 30:119-125
- Seeman NC (2005) Structural DNA nanotechnology: an overview. *Methods Mol Biol* 303: 143-166
- Shu D, Shu Y, Haque F, Abdelmawla S and Guo P (2011) Thermodynamically stable RNA three-way junction for constructing multifunctional nanoparticles for delivery of therapeutics. *Nat. Nanotechnol.*, 6, 658-667.
- Woodson SA (2005) Metal ions and RNA folding: a highly charged topic with a dynamic future. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 9, 104-109.
- Yan H, Park SH, Finkelstein G, Reif JH, LaBean TH (2003) DNA-templated self-assembly of protein arrays and highly conductive nanowires. *Science*, 301, 1882-1884.

Perspektywy:

W obecnej chwili nasze badania skupiają się na zastosowaniach nanocząsteczek strukturalnego RNA do regulacji ekspresji genów. Mamy już dowody na to, że nanocząsteczki oparte na motywie 3WJ ulegają kontrolowanemu przecięciu za pomocą enzymu Dicer. Dodatkowo, fragmenty te są w stanie wyciszać ekspresję białek egzogennych winkorporowanych w sekwencję plazmidu kodującego białko zielonej fluorescencji (GFP). Otrzymane wyniki, oparte na badaniach modelowych *in-vitro*, jak również na analizie ilościowej cytometrii przepływowej będą podstawą do opublikowania danych na temat terapeutycznych zastosowań nano-RNA.

Dodatkowo podjęliśmy badania trwałości kompleksu tRNA z hemoproteiną (cytochrom C), odpowiedzialnego za uwalnianie tego białka z przestrzeni mitochondrialnej. Cytochrom C jest kluczowym elementem szlaku kaspazowego prowadzącego do programowanej śmierci komórki. Badania te, obecnie finansowane z funduszu Narodowego Centrum Nauki, mają na celu zrozumienia procesów fałdowania i oddziaływania tRNA z białkami procesu apoptozy.

Podsumowanie osiągnięć naukowych i wkład naukowy:

Liczba wszystkich publikacji: 38, w tym **30 wydanych po uzyskaniu stopnia doktora**, włączając w to publikacje z wysokim IF (*Science, Nature Chemistry, Journal of the American Chemical Society, Langmuir, Nano Letters etc.*), współautorstwo w jednym przeglądzie (*Current Opinion in Structural Biology*), współautorstwo w **3 rozdziałach do książki** (*Foldamers* wydany przez Wiley-VCH, *Misja Nauk Chemicznych i RNA Nanotechnologies* wydany przez Pan Stanford Publishing). Wyniki przedstawiane zostały podczas 58 krajowych i międzynarodowych konferencji naukowych w formie posterów (*ACS, Biophysical, RNA Society Meetings, etc.*) i wykładów na zaproszenie (*DNA-Based MicroNano Integration, Bioinformatics in Torun, MultiPole, Therapeutic Nucleic Acids, etc.*).

Ogólny wkład naukowy: **liczba cytowań 562** (z pominięciem własnych cytowań), **indeks Hirscha – 11** (wartość na czerwiec 2013).

Udział w finansowanych projektach naukowych:

1. 'Synthesis and reactivity of mixed anhydrides methylphosphonate-carboxylate and its applications for synthesis of oligonucleotide analogues' Komitet Badań Naukowych grant no. 3 T09A 061 17 1999-2001, grant promotorski.
2. 'RNA Tectonics and Self-assembling RNA Nano-devices' National Science Foundation (NSF) grant no. 0317154 (Division of Chemistry) 2003-2005, główny wykonawca.
3. 'MRSEC: Materials Research Science and Engineering Center at UCSB' by National Science Foundation grant no. 0520415 (Division of Materials Research) 2005-2006, wykonawca (wraz z Prof. Luc Jaeger).

4. *'New Applications for Probe Microscopy of Biomolecular Materials'* by National Science Foundation grant no. 0236093 (Division of Molecular and Cellular Biosciences) 2007-2008, kierownik projektu (PI).
5. *'Resistance of RNA fragments against nucleases'*, Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego grant no. N302 643740 (grant habilitacyjny) 2011-2013, kierownik projektu - projekt zakończony w roku 2013.
6. *'The tRNA/cytochrome C complex formation and its role in programmed cell death'* Narodowe Centrum Nauki, grant no. 2011/01/B/NZ3/02090, 2012-2014, kierownik projektu - projekt w trakcie realizacji.

Działalność pedagogiczna i edukacyjna:

Zajęcia z bioinformatyki podstawowej (2011-2012r.) na wydziale International Faculty of Engineering (IFE), Politechnika Łódzka, studia I stopnia, VII semestr – jako prowadzący wykłady (15 godz.) i część zajęć praktycznych (15 godz.), zajęcia prowadzone w j. angielskim, liczba studentów około 20.

Zajęcia z bioinformatyki podstawowej (2011-2012r.) na wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności (BiNoŻ), Politechnika Łódzka, studia I stopnia, VII semestr – jako prowadzący wykłady (15 godz.), liczba studentów około 80.

Zajęcia z bioinformatyki zaawansowanej (2012-2013r.) na wydziale International Faculty of Engineering (IFE), Politechnika Łódzka, studia II stopnia, I semestr – jako prowadzący wykłady (15 godz.) i zajęcia praktyczne (30 godz.), zajęcia prowadzone w j. angielskim, liczba studentów około 20.

Zajęcia z bioinformatyki zaawansowanej (2012-2013r.) na wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności (BiNoŻ), Politechnika Łódzka, studia II stopnia, I semestr – jako prowadzący wykłady (15 godz.), liczba studentów około 80.

Opieka nad pracami magisterskich:

Katarzyna Wojcik – praca pt.: *'Enzymatic resistance of RNA tertiary and quaternary structures with three way junctions motif'*, obroniona z wyróżnieniem w 2011r. na wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności (BiNoŻ), Politechnika Łódzka.

Paulina Grzelak - praca pt.: *'Synthesis and biological applications of modified nucleoside triphosphates'*, obroniona w 2012r. na Wydziale Chemii Uniwersytetu Łódzkiego.

Chwoszcz Alcedo