



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

**INSTYTUT KATALIZY I FIZYKOCHEMII POWIERZCHNI
im. Jerzego Habera
POLSKIEJ AKADEMII NAUK w Krakowie**

Patrycja Obara

**Badanie oddziaływania
niekanonicznych form telomerowych
fragmentów DNA z nanorurkami
węglowymi przy zastosowaniu metod
dynamiki molekularnej**

Praca doktorska

Promotor prof. dr hab. Tomasz Pańczyk
Promotor pomocniczy dr. Paweł Wolski

KRAKÓW 2022

Podziękowania

Składam serdeczne podziękowania Promotorowi niniejszej pracy Prof. dr hab. Tomaszowi Pańczykowi za wszelką pomoc, przekazaną wiedzę, okazaną cierpliwość, życzliwość, wyrozumiałość oraz ciągłą mobilizację do pracy.

Dziękuję Dr Pawłowi Wolskiemu za przekazanie niezbędnej wiedzy merytorycznej i udzielenie cennych wskazówek podczas powstawania tej pracy.

Dziękuję mojej Rodzinie i Przyjaciołom, w szczególności mężowi Konradowi za cierpliwość, wyrozumiałość i wsparcie.

Badania naukowe zaprezentowane w niniejszej pracy zostały przeprowadzone w ramach projektu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki pt.: *Badania oddziaływania nanorurek węglowych z telomerowym DNA przy użyciu metod dynamiki molekularnej.*

Numer projektu: 2017/27/B/ST4/00108

Spis treści

Część teoretyczna

Streszczenie	6
Summary	8
Wykaz stosowanych skrótów.....	10
1. Niekanoniczne formy DNA	12
1.1. Wstęp	12
1.2. Struktury dwuniciowe.....	13
1.3. Struktury trójniciowe	17
1.4. Struktury czteroniciowe	21
1.4.1. <i>G-quadrupleks</i>	22
1.4.2. <i>I-motif</i>	28
2. Oddziaływanie niekanonicznych form DNA z ligandami stabilizującymi .	34
3. Nanorurki węglowe	40
3.1. Charakterystyka nanorurek węglowych	41
3.2. Zastosowanie nanorurek a ich toksyczność i funkcjonalizacja	43
3.3. Biologiczne zastosowania nanorurek węglowych.....	47
4. Metodyka.....	56
4.1. Dynamika molekularna	56
4.2. Pola siłowe	58
4.3. Pole siłowe AMBER.....	59
4.4. Potencjał AIREBO	60
4.5. Niektóre techniki rozszerzonego próbkowania stosowane w dynamice molekularnej.....	61
5. Cele pracy.....	65
6. Badanie mechanizmu rozwijania i stabilności niekanonicznych form DNA takich jak G-quadrupleks i i-motif przy użyciu dynamiki molekularnej	67
6.1. Szczegóły dotyczące budowy i symulacji badanych układów.....	67
6.2. Wyniki obliczeń i ich dyskusja	71

6.3. Podsumowanie wyników	81
7. Analiza interakcji i-motifu z jednościenneymi nanorurkami węglowymi....	82
7.1. Szczegóły dotyczące budowy i symulacji badanych układów.....	82
7.2. Wyniki obliczeń i ich dyskusja	86
7.2.1. Położenie i-motifu na powierzchni CNT.....	86
7.2.2. Analiza zmian struktury i-motifu podczas adsorpcji na powierzchni nanorurki węglowej w analizowanych układach.....	90
7.2.3. Interakcje iM z CNT.....	94
7.2.4. Wymuszone odrywanie iM od powierzchni CNT	96
7.3. Podsumowanie wyników	101
8. Badanie dynamiką molekularną oddziaływań pomiędzy nanorurką węglową a fragmentem DNA zawierającym G-quadrupleks i i-motif	103
8.1. Szczegóły dotyczące budowy i symulacji badanych układów.....	103
8.2. Wyniki obliczeń i ich dyskusja	104
8.2.1. Metodyka obliczeń rigid-body replica exchange	104
8.2.2. Optymalne konfiguracje układów fCNT z iG	110
8.2.3. Analiza konfiguracji fCNT i iG po usunięciu grup funkcyjnych	116
8.2.4. Stabilność i-motifu, stanowiącego fragment ugrupowania iG podczas oddziaływania z fCNT.....	119
8.3. Podsumowanie wyników	122
9. Analiza procesu protonacji telomerowych fragmentów DNA przez karboksylowane nanorurki węglowe	125
9.1. Szczegóły dotyczące budowy i symulacji badanych układów.....	125
9.1.1. Nanorurki węglowe	125
9.1.2. Helisa Watsona-Cricka	128
9.1.3. Szczegóły obliczeniowe dotyczące dynamiki molekularnej.....	129
9.1.4. Szczegóły dotyczące obliczeń kwantowo-chemicznych.....	131
9.2. Wyniki obliczeń i ich dyskusja	133
9.2.1. Rezultaty dokowania otrzymane przy użyciu dynamiki molekularnej.....	133
9.2.2. Kwantowo-chemiczna analiza reakcji przenoszenia protonów	138
9.3. Podsumowanie wyników	144
10. Podsumowanie	145
Bibliografia.....	147

Streszczenie

Tytuł pracy doktorskiej: *Badanie oddziaływania niekanonicznych form telomerowych fragmentów DNA z nanorurkami węglowymi przy zastosowaniu metod dynamiki molekularnej*

Autor: Patrycja Obara

Niniejsza praca przedstawia wyniki teoretycznych badań, opartych na symulacjach dynamiką molekularną, układów złożonych z telomerowych fragmentów nici DNA, tworzących niekanoniczne formy, tj. i-motif i G-quadrupleks, oraz z jednościennej nanorurek węglowych. Wykonane badania miały na celu wyjaśnienie jak oddziaływanie wymienionych niekanonicznych struktur DNA z nanorurkami węglowymi może wpływać na stabilność struktury przestrzennej i-motifu, której formowanie obserwuje się *in vitro* w pH kwaśnym. Inicjacją do przeprowadzenia poniższych badań były doniesienia literaturowe, sugerujące indukowanie i stabilizację i-motifu również w pH obojętnym dzięki obecności sfunkcjonalizowanych nanorurek węglowych. Stąd też w poniższych badaniach przeanalizowano możliwości formowania i termodynamicznej stabilności i-motifu w sytuacji bezpośredniego oddziaływania z nanorurkami węglowymi o różnych rozmiarach i funkcjonalizacji. I-motif był badany w wersji sprotonowanej odpowiadającej środowisku kwaśnemu oraz w wersji niesprotonowanej czyli odpowiadającej pH neutralnemu. Dodatkowo i-motif badany był w jego najprostszej formie zawierającej 22 zasady, jak również w sytuacji bardziej zbliżonej do naturalnej czyli w obecności dupleksu DNA, w którym wytworzone zostały obie formy niekanoniczne: i-motif oraz G-quadrupleks.

Z wykonanych w zaprezentowanej poniżej pracy obliczeń wynika, że nanorurki węglowe nie zwiększają stabilności i-motifu, gdy nie zawiera on sprotonowanych cytozyn (pH obojętne). Odwrotnie, zaobserwowano nawet szybsze niszczenie struktury i-motif w wyniku jego adsorpcji na powierzchni nanorurki węglowej. Równocześnie i-motif zarówno w stanie sprotonowanym jak i natywnym dość silnie adsorbuje się na powierzchni sfunkcjonalizowanej nanorurki.

Kolejną obserwacją jest to, że odpowiednio sfunkcjonalizowana nanorurka (guaniną) w sposób specyficzny atakuje strukturę telomerowego DNA, tzn. kieruje się swoim czołem w miejsce tworzenia się G-quadrupleksu i i-motifu. Natomiast inne grupy

funkcyjne powodują, że sfunkcjonalizowana nanorurka węglowa przemieszcza się swobodnie bez specyficznej lokalizacji w obrębie niekanonicznych form DNA. Ta obserwacja może być wykorzystana do ukierunkowanego ataku w te fragmenty DNA.

W pracy zbadano również możliwość bezpośredniej protonacji cytozyn przez nanorurki funkcyjalizowane grupami karboksylowymi. Wyniki tych obliczeń, opartych na kwantowochemicznym wyznaczaniu ścieżek reakcji doprowadziły do stwierdzenia, że taki proces nie jest możliwy. Natomiast jest wysoce prawdopodobne, że nanorurki mogą lokalnie obniżać pH przez dysocjację grup karboksylowych i to może prowadzić do protonacji cytozyn.

W przeprowadzonych badaniach wykazano również, że i-motif jest stabilizowany przez obecność G-quadrupleksu w komplementarnej nici DNA w środowisku pH neutralnego, zaś w pH kwaśnym obie struktury niekanoniczne mogą współistnieć.

Uzyskane w pracy wyniki mają duże znaczenie w poszerzeniu wiedzy o właściwościach niekanonicznych form DNA oraz ich interakcji z nanorurkami węglowymi.

Summary

PhD thesis title: Study of the interaction of non-canonical forms of telomeric DNA fragments with carbon nanotubes using molecular dynamics methods

Author: Patrycja Obara

This work presents the results of theoretical research based on molecular dynamics simulations, systems composed of telomeric DNA strands forming non-canonical forms, i.e. i-motif and G-quadruplex, and of single-wall carbon nanotubes. The conducted research was aimed at explaining how the interaction of the above-mentioned non-canonical DNA structures with carbon nanotubes can influence the stability of the i-motif spatial structure, the formation of which is observed *in vitro* at acidic pH. The following research was initiated by literature reports suggesting the induction and stabilization of i-motif even at neutral pH due to the presence of functionalized carbon nanotubes. Hence, in the following studies, the possibilities of forming and thermodynamic stability of the i-motif in the situation of direct interaction with carbon nanotubes of various sizes and functionalization were analyzed. I-motif was tested in the protonated version corresponding to the acidic environment and in the non-protonated version, i.e. corresponding to the neutral pH, in addition, the i-motif was tested in its simplest form containing 22 bases as well as in a situation more similar to the actual one, i.e. in the presence of a DNA duplex in which they were produced both non-canonical forms: i-motif and G-quadruplex.

The calculations made in the work presented below show that carbon nanotubes do not increase the stability of the i-motif when it does not contain protonated cytosines (neutral pH). Conversely, even faster destruction of the i-motif structure was observed as a result of its adsorption on the surface of the carbon nanotube. At the same time, i-motif, both in protonated and native state, adsorbs quite strongly on the surface of the functionalized nanotube.

Another observation is that a properly functionalized nanotube (guanine) specifically attacks the structure of telomeric DNA, i.e. it directs its tip towards the point of formation of G-quadruplex and i-motif within the duplex. On the other hand, other functional groups cause the functionalized carbon nanotube to move freely without

specific localization within the non-canonical forms of DNA. This observation can be used to target these DNA fragments by functionalized carbon nanotubes.

The study also investigated the possibility of direct protonation of cytosines by nanotubes functionalized with carboxyl groups. The results of these calculations based on quantum chemical determination of reaction pathway led to the conclusion that such a process is not possible. However, it is highly likely that nanotubes can locally lower the pH by dissociating carboxyl groups and this may lead to protonation of cytosines.

The conducted studies also showed that i-motif is stabilized by the presence of G-quadruplex in a complementary DNA strand in a neutral pH environment, and both non-canonical structures can coexist in acidic pH.

The results obtained in the study are of great importance in expanding the knowledge about the properties of non-canonical forms of DNA and their interaction with carbon nanotubes.

Wykaz stosowanych skrótów

- iM – i-motif
- Gq – G-quadrupleks
- iG – i-motif + G-quadrupleks
- Ga – G-quadrupleks w pH kwaśnym
- Gn – G-quadrupleks w pH neutralnym
- Ia – i-motif w pH kwaśnym
- In – i-motif w pH neutralnym
- iMp – i-motif protonowany
- iM – i-motif nieprotonowany
- MD – dynamika molekularna
- SMD – sterowana dynamika molekularna
- REMD – dynamika molekularna z wymianą replik
- rbREM – wymiana replik w dynamice ciała sztywnego
- QM – mechanika kwantowa
- RMSD – pierwiastek ze średniego kwadratowego odchylenia danej struktury od pewnego stanu odniesienia
- NMR – magnetyczny rezonans jądrowy
- CNT – nanorurka węglowa
- SWCNT – jednościenna nanorurka węglowa
- MWCNT – wielościenna nanorurka węglowa
- DWCNT – dwuścienna nanorurka węglowa
- fCNT – funkcjonalizowana nanorurka węglowa
- ssDNA – jednoniciowe DNA
- dsDNA – dwuniciowe DNA
- WC – dupleks Watsona -Cricka

Część teoretyczna

1. Niekanoniczne formy DNA

1.1. Wstęp

Elementem podstawowym budowy organizmów są białka, składające się z dwudziestu różnych aminokwasów. Białka są niezbędne dla funkcjonowania wszystkich procesów komórkowych, pełnią między innymi funkcję budulcową, biorą udział w przekazywaniu impulsów nerwowych, magazynują i transportują mikro- i makroelementy. Informacje potrzebne do syntezy różnych białek zawarte są w DNA. DNA, czyli **kwas deoksyrybonukleinowy** (ang. *deoxyribonucleic acid*) to ważny polimer będący nośnikiem informacji genetycznej, zlokalizowany w jądrze komórkowym każdego żywego organizmu. DNA swym kształtem przypomina nić, składającą się z dużej ilości deoksyrybonukleotydów. Każdy z nich złożony jest z deoksyrybozy – pięciowęglowego cukru, do którego dołączona jest grupa fosforanowa i jedna z czterech zasad azotowych: adenina (A), tymina (T), cytozyna (C), guanina (G). Zasady pełnią rolę nośników informacji genetycznej, natomiast reszty cukrowe i fosforanowe pełnią rolę strukturalną (Gregory Gatto Jeremy M. Berg 2019). Od 1953 roku dzięki J. Watson'owi i F. Crick'owi, którzy na podstawie zdjęć krystalografii rentgenowskiej określili strukturę DNA, jest nam znana specyficzna podwójna helisa. Jest to fragment DNA, składający się z dwóch łańcuchów polinukleotydowych, które biegą antyrównolegle w stosunku do siebie, skręcając się wokół wspólnej osi, tworząc dwuniciową helisę Watsona-Cricka. Zasady azotowe skierowane do wnętrza helisy łączą się ze sobą komplementarnie, tzn. adenina łączy się z tyminą, a cytozyna zawsze łączy się z guaniną. Dzięki temu sekwencja nukleotydów jednej nici DNA określa kolejność nukleotydów w drugiej nici, które następnie oplatają się helikalnie (Allison 2009). Dominująca i najtrwalsza *in vivo* jest struktura prawoskrętna B-DNA, ale w określonych warunkach dwuniciowy DNA może przybierać inne dwuniciowe formy prawo- jak i lewoskrętne, takie jak: A-DNA czy Z-DNA (Bukowiecka-Matusiak i Wozniak 2006).

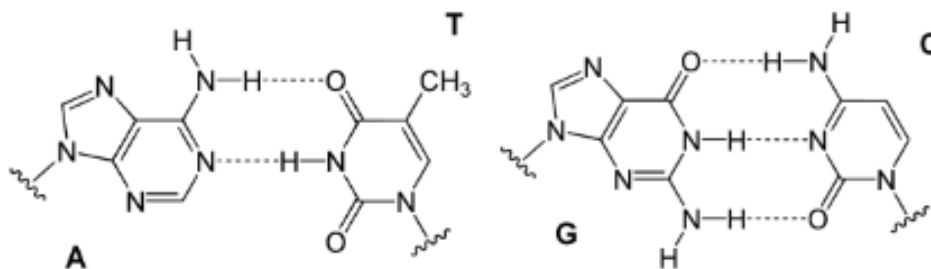
W jądrze komórkowym DNA upakowane jest w chromosomy. Chromosom zaczyna i kończy się fragmentem złożonym z wielokrotnie powtarzalnych sekwencji zasad nukleinowych, tj. telomerem (Turner i in. 2011). Powtórzenia te charakteryzują się asymetrią guanin i cytozyn. W wielu telomerach występuje od dwóch do pięciu powtórzeń, sąsiadujących ze sobą na tej samej nici guanin z odpowiadającymi im cytozynami na drugiej nici. U kręgowców motywem powtarzanym w telomerach jest

sekwencja (TTAGGG) : (CCCTAA). W ten sposób możemy wyróżnić bogate w guaninę i bogate w cytozynę nici w dwuniciowym telomerowym odcinku DNA. Nici bogata w guaninę jest dłuższa i tworzy zwis 3' w końcowej części telomeru (Phan i Mergny 2002). Biologiczną rolą telomeru jest ochrona chromosomu przed zniszczeniem lub fuzją z sąsiednimi chromosomami, a także regulacja starzenia się komórek. Biorąc pod uwagę rezultaty badań, telomery także mogą być postrzegane jako markery prognostyczne procesu nowotworzenia zachodzącego na bardzo wczesnym etapie kancerogenezy (Barczak i Rubiś 2012). Telomery mają unikalny sposób replikacji, oparty na enzymie zwanym telomerazą. W przeciwieństwie do komórek nowotworowych, które często wyrażają wysoki poziom telomerazy, aktywność ta jest ściśle regulowana w normalnych ludzkich komórkach somatycznych. Oczywiście większość telomerycznego DNA jest dwuniciowa z wyjątkiem części końcowej, w której zwis 3' nici bogatej w guaninę jest jednoniciowy i tworzy tak zwaną pętlę T (Chen i Chen 2011). Te fragmenty DNA sprawiają, że w warunkach *in vitro* i *in vivo* w zależności od sekwencji nici oraz od właściwości środowiska takich jak siła jonowa roztworu, pH, obecność jonów metali czy innych małych cząsteczek organicznych, możemy zaobserwować istnienie innych mniej poznanych niekanonicznych form DNA wyższego rzędu. Biologiczna rola struktur innych niż popularna i znana prawoskrętna struktura B-DNA jest obszarem aktywnych badań. Celem wyżej wspomnianych badań jest określenie, które alternatywne konformacje DNA również te wieloniciowe jak trypleksy czy tertapleksy istnieją *in vivo*. Ważne jest również określenie jak regulowane jest ich tworzenie i jakie informacje przekazują (Makarov, Hirose, i Langmore 1997).

1.2. Struktury dwuniciowe

Wyróżniamy trzy różne formy dupleksu kwasu deoksyrybonukleinowego. Najbardziej rozpowszechnioną formą w obojętnym pH i fizjologicznych stężeniach soli jest model podwójnej, prawoskrętnej helisy B-DNA zaproponowany przez Watsona i Cricka. W strukturze tej dwa polinukleotydowe łańcuchy oddziałują ze sobą poprzez wiązania wodorowe Watsona-Cricka pomiędzy odpowiednimi zasadami azotowymi, tworzącymi komplementarne pary. Zasady pasują do modelu podwójnej helisy, gdy pirymidyna (C lub T) na jednej nici jest zawsze sparowana z puryną (A lub G) na nici drugiej. Adenina i guanina mają budowę dwupierścieniową. Cytosyna i tymina mają tylko jeden pierścień. Gdyby adenina wiązała się z guaniną, a cytosyna z tyminą, odległości między dwoma łańcuchami DNA byłyby zmienne. Jednak, gdy cząsteczka

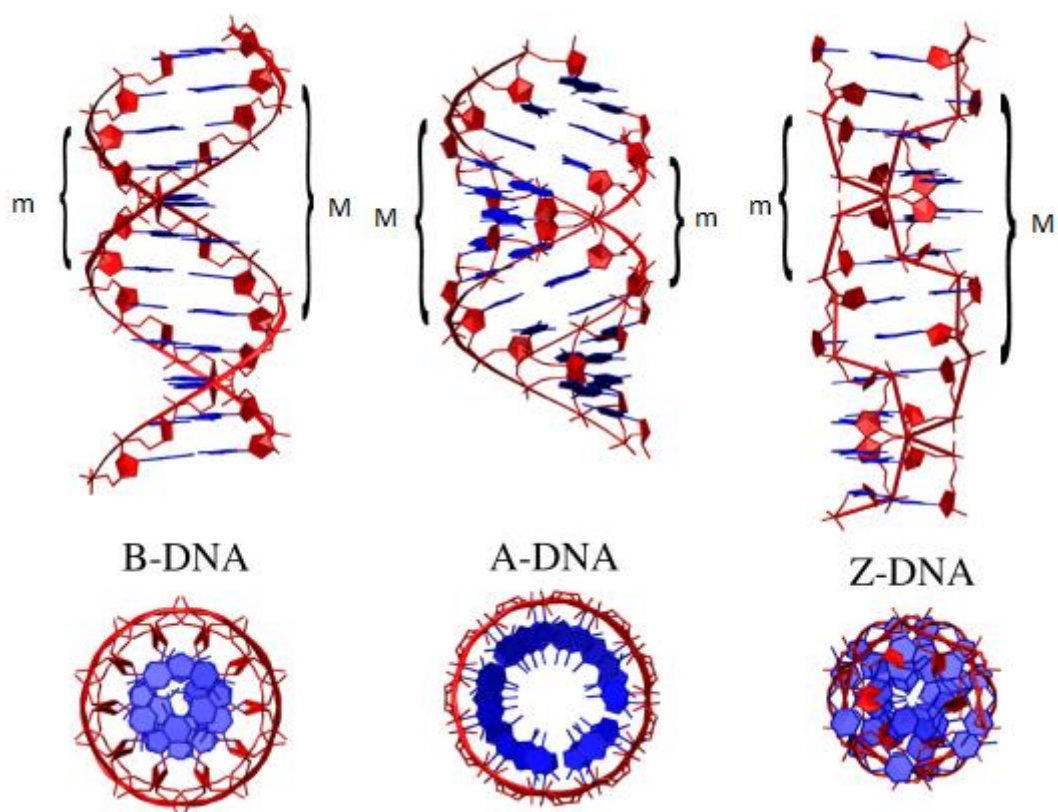
jednopierscieniowa wiąże się z cząsteczką dwupierscieniową, odległość między dwoma łańcuchami jest stała. Pozwala to zachować jednolity kształt podwójnej helisy DNA. Specyficzność ta jest charakterystyczna dla rozpoznania molekularnego w obszarze kwasów nukleinowych. Adenina wiąże się ze swoją komplementarną zasadą tyminą, poprzez dwa wiązania wodorowe typu Watsona-Cricka. Guanina wiąże się z komplementarną cytozyną poprzez trzy wiązania wodorowe (Rys. 1.1.). Dwuniciowe struktury DNA są obecnie dobrze poznane i opisane w literaturze (Neidle 1999).



Rys. 1.1. Oddziaływania wodorowe Watsona-Cricka pomiędzy komplementarnymi zasadami azotowymi: A:T, G:C.

Poza popularną prawoskrętną strukturą B-DNA znana jest również prawoskrętna forma A-DNA oraz lewoskrętna forma Z-DNA (Ghosh i Bansal 2003). Rysunek 1.2. przedstawia te struktury DNA i pozwala na prześledzenie podobieństw i najważniejszych różnic pomiędzy nimi. We wszystkich tych strukturach dwa polinukleotydowe łańcuchy oplatają helikalnie wspólną oś. Łańcuchy zwrócone są antyrównoległe, w przeciwnych kierunkach. Koniec 5' jednego łańcucha łączy się z końcem 3' komplementarnego drugiego łańcucha DNA. W podwójnej helisie B-DNA i A-DNA zasady pirymidynowe i purynowe zlokalizowane są wewnątrz helisy, zajmując jej rdzeń, a reszty deoksyrybozy i grupy fosforanowe znajdują się na zewnątrz. W strukturze B-DNA płaszczyzny pierścieni cukrów otaczają zasady i ułożone są wokół osi helisy, z kolei płaszczyzny zasad są do niej prostopadłe. Struktura B-DNA jest dominującym typem strukturalnej konformacji DNA w komórkach (Richmond i Davey 2003). Rzadszą konformacją strukturalną jest forma A-DNA, którą DNA może przyjąć w warunkach odwodnienia (Gregory Gatto Jeremy M. Berg 2019). Ta helikalna struktura mimo, że podobna do B-DNA, jest znacznie szersza i bardziej płaska. Główną różnicą pomiędzy strukturami A-DNA i B-DNA jest różna konformacja reszt cukrowych. W strukturze A-DNA węgiel C3' deoksyrybozy występuje poza płaszczyzną pierścienia furanozowego, przyjmując konformację C3'-endo (typu N), co w konsekwencji prowadzi do odchylenia par zasad od położenia prostopadłego względem osi cząsteczki i różnych

odległości pomiędzy sąsiadującymi resztami fosforanowymi. W związku z odchyleniem zasad od prostopadłego ułożenia względem osi helisy, struktura A-DNA ma pusty rdzeń środkowy. Kolejną różnicą pomiędzy tymi strukturami DNA jest wielkość małego rowka (*m*; ang. *minor grooves*) w pętli helisy. W B-DNA jest on wąski i głęboki, a w helisie A-DNA obserwuje się niemalże całkowity zanik małego rowka, który jest tutaj szeroki lecz płytki. Jest to wynikiem wiązania mniejszej ilości cząsteczek wody przez grupy fosforanowe niż ma to miejsce w helisie B-DNA (Bukowiecka-Matusiak i Wozniak 2006).



Rys. 1.2. Modele kanonicznych form B-DNA, A-DNA i Z-DNA. Widok wzdłuż osi helisy z wyraźnymi rowkami: dużym (*M*; ang. *major groove*) i małym (*m*; ang. *minor groove*) oraz widok z góry, w środku widoczne układające się zasady otoczone szkieletem fosforanowo-cukrowym (Gregory Gatto Jeremy M. Berg 2019)

Jednym z istotnych pytań w dziedzinie biologii molekularnej jest pytanie o możliwość występowania *in vivo* równocześnie kilku form helikalnych DNA. W przeprowadzonych badaniach opisanych w literaturze istnieją informacje o możliwości interkonwersji A- i B-DNA w warunkach *in vitro*. Zwiększenie stężenia organicznej lub nieorganicznej soli czy też obniżenie liczby cząsteczek wody wokół B-DNA może prowadzić *in vivo* do przejścia B-DNA w formę A-DNA (Ghosh i Bansal 2003). W końcu lat siedemdziesiątych XX wieku odkryto *in vitro* istnienie jeszcze jednej

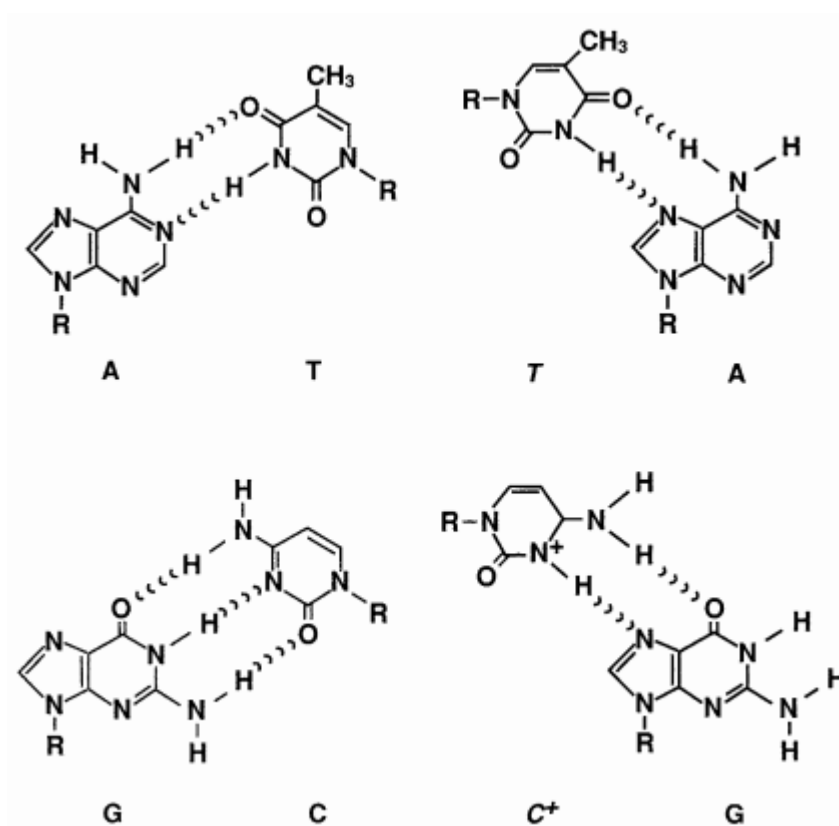
tym razem lewoskrętnej, dwuniciowej struktury DNA, którą nazwano: Z-DNA. Jest to radykalnie inna struktura dupleksu z dwiema nićmi, zwiniętymi w lewoskrętną helisę i wyraźnym zygzakiem (stąd nazwa struktury: Z-DNA) w szkielecie. Pojawienie się struktury Z-DNA wymaga odpowiednio wysokiego stężenia soli organicznej i/lub nieorganicznej, obecności odpowiedniego stężenia jonów dwuwartościowych (Mg^{2+} , Zn^{2+}) lub jednowartościowych (Na^+), których obecność pozwala na zminimalizowanie odpychających oddziaływań elektrostatycznych pomiędzy fosforanami szkieletu tej helisy. Warunkiem koniecznym i równocześnie cechą charakterystyczną dla utworzenia tej formy DNA jest występowanie naprzemiennych, powtarzalnych w odróżnieniu do innych struktur DNA sekwencji dinukleotydowych purynowo-pirymidynowych, takich jak GC, CG. Powtarzalność takich traktów dinukleotydowych wymusza lewoskrętność oraz powoduje zróżnicowanie konformacyjne pierścieni cukrowych w zależności od tego czy są one połączone z purynami czy pirymidynami (Chen i in. 2014; Yang i in. 2012). W strukturach A- i B-DNA każda z par zasad jest zorientowana w helisie podobnie w odniesieniu do jej sąsiadujących par zasad, więc wszystkie pary są strukturalnie do siebie podobne. W Z-DNA dinukleotydy CG i GC mają inne kąty skręcania, co powoduje różnice w ułożeniu zasad w podwójnej helisie. Formy A- i B-DNA mają połączone ze sobą wiązania wodorowymi zasady, umiejscowione wewnątrz podwójnej helisy, a pierścienie cukrowe i reszty fosforanowe na zewnątrz. Ponieważ wszystkie pary zasad są ustawione podobnie w odniesieniu do innych par zasad w tej samej helisie, formy A- czy B-DNA mają powtarzalną jednostkę składającą się z jednego nukleotydu. W Z-DNA powtarzająca się jednostka pary zasad wynosi dwa. Dinukleotyd CpG różni się od dinukleotydu GpC. Konformacja Z-DNA jest dość trudna w analizie, ponieważ *in vivo* nie istnieje jako stabilna cecha podwójnej helisy. Jest to przejściowa struktura, która jest czasami wywoływana przez aktywność biologiczną, a następnie szybko zanika (Zhang i in. 2006). Biologiczne znaczenie Z-DNA jest kontrowersyjne od czasu jego odkrycia, a wiele wczesnych badań wzbudziło tyle samo pytań, na ile udzielono odpowiedzi (Marx 1985). Jednak dostępna literatura wskazuje, że struktury kwasu deoksyrybonukleinowego inne niż B- lub A-DNA mają istotne (wciąż odkrywane) znaczenie w procesach biochemicznych (Choi i Majima 2011; Chou, Chin, i Wang 2003; Lee i in. 2018).

1.3. Struktury trójniciowe

Łańcuchy DNA to dynamiczne struktury, które *in vivo* ulegają różnym przemianom topologicznym. Podczas biologicznych procesów zachodzących w jądrze komórkowym, dwuniciowa struktura DNA ulega m.in. w procesach replikacji rozplataniu, a następnie ponownemu odtworzeniu dwuniciowej helisy. W tym czasie w strukturze nici DNA zachodzą lokalne zmiany, które w późniejszym czasie mogą okazać się znaczące. Są to zmiany związane m.in. z odwracalnym skręcaniem, zginaniem i rozciąganiem helisy. W wyniku wzajemnego oddziaływania łańcuchów poprzez tworzenie wiązań wodorowych może dochodzić do tworzenia form DNA innych niż opisane powyżej. W utworzenie tych form mogą być zaangażowane fragmenty tego samego DNA, ale o ściśle określonej sekwencji lub nowe, kolejne nici kwasów nukleinowych. W taki sposób mogą utworzyć się zarówno struktury trójniciowe, tzw. trypleksy oraz struktury czteroniciowe, tzw. tetrapleksy (Bukowiecka-Matusiak i Wozniak 2006; Felsenfeld, Davies, i Rich 1957).

Powstawanie struktur trójniciowych DNA może być związane ze zmianami konformacyjnymi zachodzącymi w podwójnej helisie, polegającymi na zdolności zasocjowania trzeciej nici DNA w rowku większym struktury dupleksowej. Trypleksy złożone są więc w pierwszej kolejności z dwóch nici biegnących antyrównolegle w stosunku do siebie, połączonych wiązaniami wodorowymi typu Watsona-Cricka niczym w strukturze B-DNA. Różnicą w porównaniu do powszechnej dwuniciowej helisy jest tutaj odchylenie od osi i pewne rozwinięcie helisy, wywołane zawadą przestrzenną związaną z asocjacją trzeciej nici DNA. Potrójne struktury kwasu nukleinowego zostały odkryte w 1956 roku przez Daviesa i Richa. Dla utworzenia trypleksu warunkiem koniecznym jest występowanie dwuniciowych komplementarnych traktów polipurynowo-polipirymidynowych. Trzecia nić pojawiająca się w tych strukturach może być ułożona względem nici z dupleksu, z którą oddziałuje w sposób równoległy, tzn. koniec 3' nici trzeciej oddziałuje z końcem 3' nici dupleksowego fragmentu DNA dzięki utworzeniu **wiązań wodorowych typu Hoogsteena** lub w sposób antyrównoległy, tj. koniec 3' nici trzeciej tworzy odwrotne wiązania wodorowe typu Hoogsteena z końcem 5' fragmentu DNA. (Frank-Kamenetskii i Mirkin 1995). Uzupełniające się interakcje związane z tworzeniem wiązań wodorowych są odpowiedzialne za specyficzne połączenie dupleksu z trzecią nicią DNA. Ponieważ miejsca parowania zasad Watsona-Cricka są już zaangażowane w wiązania wodorowe

w podwójnej helisie, trzecia nić musi wiązać się poprzez parowanie zasad Hoogsteena z innymi miejscami w duplekście. Środkowa nić trypleksu musi być bogata w purynę, ponieważ pirymidyna nie ma dwóch powierzchni z możliwością utworzenia więcej niż jednego wiązania wodorowego. Zatem potrójne DNA wymaga regionu homopurynowo-homopirymidynowego DNA. Jeśli trzecia nić jest bogata w purynę, tworzy odwrotne wiązania wodorowe Hoogsteena w orientacji antyrównoległej z nicią purynową helisy Watsona-Cricka. Gdy trzecia nić jest bogata w pirymidyny, tworzy wiązania Hoogsteena w układzie równoległym z nicią purynową sparowaną z dupleksem Watsona-Cricka (Sinden 2012).

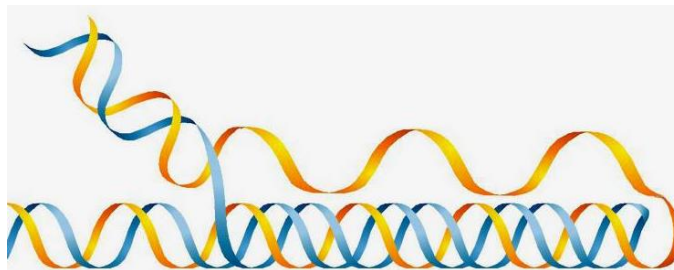


Rys. 1.3. Pary zasad Watsona-Cricka i Hoogsteena. Po lewej tradycyjne pary zasad AT i GC Watsona-Cricka. Po prawej Hoogsteena TA i C⁺G. Aby cytozyna utworzyła parę z guaniną w wiązaniu Hoogsteena, pozycja N³ cytozyny w trzeciej nici musi być protonowana. Miejsca parowania zasad wiązaniami Hoogsteena w cząsteczce puryny różnią się od miejsc związanych w parze wiązaniami typu Watsona-Cricka (parowanie zasad Hoogsteena obejmuje pozycję N⁷ w pierścieniu imidazolowym) (Sinden 2012).

Utworzenie wodorowego wiązania typu Hoogsteena z cytozyną, zaangażowaną już w wiązanie wodorowe Watsona-Cricka, wymaga uprotonowania azotu N³ cytozyny w trzeciej nici, co ma miejsce wyłącznie w środowisku kwaśnym przy pH poniżej 4,5 (Rys. 1.3.) (Bukowiecka-Matusiak i Wozniak 2006; Sinden 2012). Karst Hoogsteen odkrył tworzenie wiązań wodorowych tego typu po obserwacji struktury krystalicznej

kompleksu kwasu nukleinowego, w którym analogi adeniny i tyminy tworzyły motywy par zasad o innej geometrii niż motyw Watsona-Cricka. Pary zasad Hoogsteena mają znacznie inną geometrię niż pary zasad Watsona-Cricka, a co za tym idzie odmienne zachowanie. Pary Hoogsteena istnieją przejściowo w niektórych formach DNA w równowadze termicznej ze standardowymi parami zasad Watsona-Cricka. Są również obserwowane w kompleksach białko-DNA czy strukturach G-quadrupleksu (Nikolova i in. 2011; Sinden 2012).

Dla stabilizacji struktur trójniciowych DNA wymagana jest obecność jonów metali: Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} oraz poliamin, które odpowiedzialne są za neutralizację ujemnych ładunków grup fosforanowych. Wymagana jest również we wszystkich trzech łańcuchach pełna komplementarność zasad, ponieważ nawet pojedyncze niesparowanie może powodować znaczną destabilizację takiej struktury. Frank-Kamenetskii i współpracownicy wykazali w latach osiemdziesiątych, że oprócz wymaganej komplementarności zasad, region homopurynowo-homopirymidynowy musi zawierać symetrię powtórzeń lustrzanych (Frank-Kamenetskii i Mirkin 1995). Powtórzenia lustrzane występują, gdy fragment DNA jednej nici ma ten sam odczyt sekwencji zasad zarówno w kierunku 3' jak i 5', zaczynając od ustalonego punktu centralnego dla tego odcinka (sekwencja GAA AAG reprezentuje powtórzenia lustrzane). Trójniciowe, naturalnie występujące struktury wewnątrzcząsteczkowe, określane jako H-DNA tworzą się, gdy część lustrzanej sekwencji dysocjuje na pojedyncze, oddzielne łańcuchy pirymidynowy i purynowy, po czym następuje ponowne przyłączenie łańcucha homopirymidynowego do pozostałej mieszanej części dupleksu, co prowadzi do utworzenia w rowku większym struktury trypleksu równoległego. Druga połowa nici homopurynowej pozostaje jednoniciowa (Rys. 1.4.). Istnieją również przypadki, w których nić homopurynowa ponownie asocjuje tworząc *H-DNA, tj. trypleks antyrównoległy (Jain, Wang, i Vasquez 2008).



Rys. 1.4. H-DNA, wewnątrzcząsteczkowe potrójne DNA. W helisie polipurynowo-polipirymidynowej z lustrzaną symetrią powtórzeń jedna z pojedynczych nici (zaznaczona na niebiesko) zagina się i tworzy strukturę potrójną, a druga nić (żółta) pozostaje niesparowana (Jain i in. 2008).

Trójniciowe struktury są opisane w wielu pracach przeglądowych i monografiach. H-DNA odgrywa *in vivo* ważną rolę i jest z natury mutageny i rekombinogeny, tak więc elementy struktury H-DNA mogą być wykorzystywane farmakologicznie. Występowanie H-DNA zostało m.in. potwierdzone podczas badań genu promotorowego hsp26 muszki owocówki. W przeprowadzonych badaniach określono znaczenie fragmentu purunowo-pirymidynowego dla prawidłowej aktywacji genu i tworzenia chromatyny (Besch, Giovannangeli, i Degitz 2004; Lu i in. 2003). Do tworzenia się struktur trójniciowych *in vivo* nie jest konieczna obecność specyficznych białek, ale uwarunkowane jest to występowaniem odpowiednio długich traktów purynowo-pirymidynowych. W organizmach eukariotycznych DNA ma postać superhelikalną, ściśle upakowaną w nukleosomach, gdzie związane jest z białkami histonowymi, utrudniającymi powstawanie naturalnie występujących stabilnych struktur wyższego rzędu. Struktury trójniciowe można także otrzymać w sposób wymuszony, poprzez wprowadzenie do komórki komplementarnych oligonukleotydów. Oligonukleotydy tworzące trypleks TFO (TFO, ang. triplex forming oligonucleotides) wiążą się z określonymi sekwencjami w podwójnej helisie DNA poprzez interakcje wiązań wodorowych. Wykazano, że TFO zmniejszają ekspresję genów, indukują ukierunkowane modyfikacje genomowego DNA i stymulują rekombinację DNA. Dodatkowo mogą być używane jako nośniki do pozycjonowania środków modyfikujących DNA w wybranych sekwencjach. Efekty, w których pośredniczy TFO, opisano głównie w hodowli komórkowej, ale jedno badanie wykazało aktywność TFO w modelu mysim. Wykazano, że w komórkach somatycznych dorosłych myszy wprowadzone TFO może indukować mutacje genomu w określonych obszarach. Pozwoliło to potwierdzić, że modyfikacje genomu wywołane utworzeniem struktur trypleksowych, mogą być przeprowadzane w organizmach zwierzęcych. Wynik ten był istotnym krokiem w stronę rozwoju terapii genowej i wykorzystania tworzenia trypleksów w zastosowaniach medycznych (Vasquez, Narayanan, i Glazer 2000). Krytycznymi kwestiami dotyczącymi technologii opartych na TFO jest opracowanie nowych analogów oligonukleotydów o ulepszonym powinowactwie wiązania, lepszej selektywności docelowej i wystarczającej stabilności w środowisku wewnątrzkomórkowym. Wymuszenie tworzenia takich struktur trójniciowych TFO znalazło zastosowanie w biochemii i biologii molekularnej. Wykazano m.in., że tworzenie w regionach promotorowych struktur trypleksowych blokuje dostęp czynników transkrypcyjnych i powoduje inhibicję aktywacji genów *in vitro*. Wprowadzenie do komórki komplementarnych oligonukleotydów, tworzących

struktury trypleksowe TFO, umożliwia korekcję i wyciszenie genów w wyniku wywołania trwałych zmian w ich sekwencjach (Besch i in. 2004). Tworzenie naturalnych wewnątrzcząsteczkowych struktur potrójnej helisy DNA, jak również ich powstawanie poprzez wprowadzenie komplementarnych oligonukleotydów jest wciąż interesującym tematem badawczym ze względu na ich intrygujące funkcje biologiczne i potencjał farmakologiczny w terapii genowej oraz zdolność do precyzyjnej inżynierii funkcjonalnych nanomateriałów opartych na DNA (Guerrini i Alvarez-Puebla 2021). W różnych badaniach zastosowano tworzenie trypleksów w celu zahamowania ekspresji genów (Hu i in. 2017), do wykrywania miejsc uszkodzeń DNA w wyniku niedopasowania pojedynczych zasad (Moser i Dervan 1987) oraz do hamowania wiązania białek z DNA (Datta i in. 2001). Struktury trypleksowe są również wykorzystywane do rozwoju obszarów nanotechnologii DNA i materiałów funkcjonalnych opartych na kwasach nukleinowych. Potrójne struktury kwasów nukleinowych są ważnymi elementami przy projektowaniu materiałów reagujących na bodźce. Integracja potrójnych struktur DNA z polimerami akryloamidowymi doprowadziła do syntezy hydrożeli reagujących na pH, które podlegają odwracalnym przemianom hydrożel-roztwór i wykazują właściwości pamięci kształtu. Te nowe materiały są bardzo obiecujące jako nośniki kontrolowanego dostarczania leków lub do zamieszczania informacji i tworzenia inteligentnych materiałów do zastosowań inżynierskich (Vázquez-González i Willner 2021; Yang, Liu, i Wang 2019). Przeprowadzono również badania, wykorzystujące funkcjonalizowanie nanocząstek dendrymerów potrójnymi kwasami nukleinowymi, które aktywnie uczestniczyły w wyciszaniu onkogenu i zmniejszaniu guza w mysim modelu raka. Te badania podkreślają znaczenie trypleksów DNA w przyszłych zastosowaniach nanomedycyny (Conde i in. 2016; Hu i in. 2017).

1.4. Struktury czteroniciowe

Chromosom eukariotyczny, stanowiący zwartą formę DNA nawiniętą na białka histonowe, zlokalizowany w jądrze komórkowym zaczyna i kończy się specyficzną strukturą nukleoproteinową zwaną telomerem. Telomery chronią końce chromosomów przed zniszczeniem lub fuzją z sąsiednimi chromosomami podczas podziałów komórek i procesu regeneracji oraz są odpowiedzialne za integralność genomu. Długość telomerów skraca się z wiekiem i jest to związane z tzw. starzeniem replikacyjnym – powolnym traceniem przez komórki zdolności do podziału. Postępujące skracanie telomerów prowadzi do starzenia lub apoptozy komórek. Krótsze telomery mogą mieć

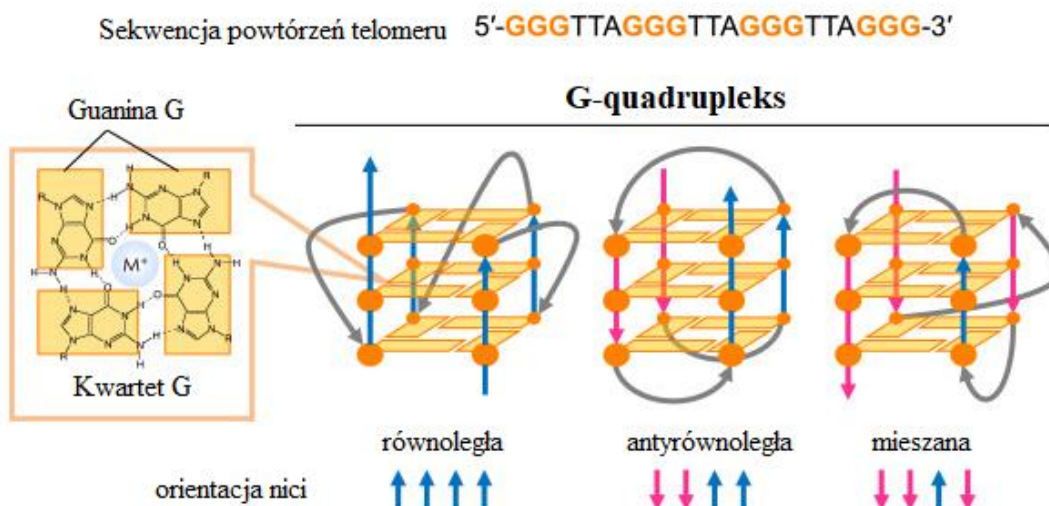
również wpływ na niestabilność genomu i onkogenezę. Tempo skracania telomerów ma kluczowe znaczenie dla zdrowia, tempa starzenia się danej osoby, a także być może jest odpowiedzialne za raka. Telomery mają unikalny tryb replikacji, oparty na enzymie zwanym telomerazą. Aktywność telomerazy w związku ze starzeniem komórek zmniejsza się z wiekiem. W komórkach nowotworowych obserwuje się podwyższoną aktywność telomerazy co umożliwia nieograniczoną ilość podziałów jednej komórki. Niekontrolowany podział komórek nowotworowych może skutkować powstaniem guza nowotworowego (Celtikci, Erkmen, i Dikmen 2021; Phan i Mergny 2002; Shammas 2011).

Telomerowy odcinek DNA charakteryzuje się powtarzalnością sekwencji zasad nukleinowych (TTAGGG):(CCCTAA), tworzącą podwójną helisę DNA. Większość telomerowego odcinka DNA jest dwuniciowa z wyjątkiem części końcowej, gdzie region nici 3' bogatej w guaninę jest dłuższy i jednoniciowy. Telomerowe sekwencje zasad połączone są szeregiem białek warunkujących ich odpowiedni kształt i stabilność. Obecność białkowego kompleksu ochronnego sprawia, że w telomerze tworzą się wewnętrzne wiązania, które powodują formowanie dwóch pętli: T (T-loop) i D (D-loop), które odpowiadają za stabilizację struktury telomerów. Dwuniciowa część telomerowa dzięki aktywności kompleksu białek ochronnych ulega zawinięciu i zamknięciu w większą pętlę T. Z kolei wolna nieć 3' na końcu chromosomu wewnątrz pętli T łączy się z dwuniciowym fragmentem DNA telomeru tworząc mniejszą pętlę D (Blasco 2007; Lu i in. 2013). Telomerowe odcinki DNA charakteryzują się asymetrią guanin i cytozyn. W powtórzeniach zasad nukleinowych w telomerach może występować od dwóch do pięciu powtórzeń sąsiadujących ze sobą guanin na tej samej nici DNA z odpowiadającymi im cytozynami na nici drugiej. (Makarov i in. 1997; Phan i Mergny 2002; Russo Krauss i in. 2016). Nici telomerowe bogate w guaninę i cytozynę mogą tworzyć struktury DNA wyższego rzędu. Nieć bogata w guaninę może przyjąć czteroniciową strukturę G-quadrupleksu, podczas gdy nieć bogata w cytozynę może tworzyć tak zwany i-motif (Choi i in. 2011; Debnath i in. 2017; Russo Krauss i in. 2016; Sen i Gilbert 1988).

1.4.1. G-quadrupleks

G-quadrupleks (Gq) jest niekanoniczną drugorzędową strukturą DNA, biologicznie istotną dla replikacji DNA, transkrypcji i stabilności telomerów co sprawia, że stał się on obecnie potencjalnym celem w nowych metodach leczenia chorób. Struktura

ta powstaje samoczynnie w wyniku oddziaływania sekwencji, zawierającej ciągle powtórzenia guaninowe i charakteryzuje się obecnością dwóch lub więcej stosów czterech guanin, tworzących kwartet ułożonych współpłaszczyznowo. G-quadrupleks stabilizowany jest poprzez wiązania wodorowe Hoogsteena oraz dodatkowo przez jednowartościowy jon o odpowiedniej wielkości tj. Na^+ lub K^+ , zlokalizowany w centralnym rdzeniu kwartetu guaninowego, który neutralizuje elektrostatyczne odpychanie ujemnego ładunku tlenu w guaninie (Rys. 1.5.) (Gellert, Lipsett, i Davies 1962; Kudlicki 2016; Sen i Gilbert 1988). Cenne dla wytłumaczenia roli i lokalizacji jonów metali jednowartościowych w stabilizacji struktur G-quadrupleksów okazały się badania krystalograficzne. Lane i wsp. analizując sekwencję d(TGGGGT) stwierdzili, że jony K^+ umiejscowione pomiędzy płaszczyznami utworzonymi przez kwartety guanin, wiążą się z nimi przez osiem wiązań koordynacyjnych stabilizując tę strukturę. Na podstawie badań krystalograficznych wykazano również, że występująca u ludzi sekwencja telomerowa (TTAGGG) tworzy intramolekularne G-quadrupleksy w roztworach w obecności jonów Na^+ w stężeniach zbliżonych do fizjologicznych (Lane i in. 2008). Chociaż G-quadrupleksy po raz pierwszy odkryto *in vitro*, coraz więcej dowodów wskazuje, że ta unikalna struktura kwasu nukleinowego jest również tworzona w żywych komórkach. Gavathiotis i wsp. potwierdzili tworzenie się struktur G-quadrupleksu w ludzkiej sekwencji zasad nukleinowych, występujących w telomerowych częściach DNA za pomocą badań NMR i symulacji dynamiką molekularną (Gavathiotis i Searle 2003). Kilka grup naukowców przeprowadziło analizy obliczeniowe w celu znalezienia również nietelomerowych przypuszczalnych sekwencji, tworzących G-quadrupleks w genomie. Huppert i Balasubramanian odkryli, że w ludzkim genomie znajduje się ponad 300 000 przypuszczalnych sekwencji mogących tworzyć G-quadrupleks. Te sekwencje nie są zlokalizowane losowo, znajdują się w funkcjonalnych regionach genomowych, takich jak promotory, introny i regiony niepodlegające translacji genów (Huppert i Balasubramanian 2007). Struktury G-quadrupleksów są zróżnicowane. Konformacja G-quadrupleksu jest określana przez orientację wiązań glikozydowych guanin w kwartetach równoległą, antyrównoległą lub mieszaną orientację nici wnoszących zasady guaninowe do kwarterów oraz przez długości i sekwencję pętli łączących serie guanin. G-quadrupleksy wykazują znaczną stabilność termodynamiczną, w dużej mierze wywodzącą się z ułożenia hydrofobowych kwartetów i modulowaną przez długość i sekwencję pętli (Patel, Phan, i Kuryavyi 2007).



Rys. 1.5. Schematyczne struktury G-quadrupleksów. Struktury te reprezentowane są przez trzy stosy kwartetów guaninowych i podzielone są na trzy typy: równoległe, antyrownoległe i mieszane, zgodnie z orientacją nici. W kwartecie umieszczonym po lewej stronie wskazano poprzez symbol M^+ umiejscowienie jednowartościowego jonu metalu oraz linią wykropkowaną wiązania wodorowe Hoogsteena pomiędzy guaninami (Nakanishi i Seimiya 2020).

Tworzenie G-quadrupleksów zachodzi w regionach jednoniciowych, gdzie powstają podczas replikacji i transkrypcji w wyniku zwijania. Powstała struktura posiadająca dużą średnicę i cztery rowki definiuje unikalność G-quadrupleksu, który różni się od dupleksowego DNA. Utworzenie G-quadrupleksu w końcowym zwisie 3' ludzkiego telomeru może przyczyniać się do hamownia nadekspresji telomerazy, charakterystycznej dla komórek nowotworowych. Stąd też stabilizacja oraz działania, mające na celu formowanie tej niekanonicznej formy DNA, stanowią obiecującą strategię do opracowywania nowych terapii walki z rakiem (Hirashima i Seimiya 2015; Hurley 2002; Pendino i in. 2006). Temat G-quadrupleksów jest z tego względu szeroko omawiany w piśmiennictwie, gdzie naukowcy skupiają się na poznaniu charakterystyki struktury topologii G-quadrupleksu, czynników sprzyjających jego stabilizacji oraz terapeutycznym i diagnostycznym potencjale tej wyjątkowej struktury kwasu nukleinowego (Tseng i in. 2013).

Naukowcy prowadzą również badania nad aptamerami, stanowiących krótkie fragmenty DNA bogate w guaninę, mające zdolność do formowania się w stabilne struktury G-quadrupleksów w warunkach fizjologicznych i rozpoznawania różnych białek (Rohloff i in. 2014). Aptamery są małymi oligonukleotydami opartymi na DNA lub RNA, które są zazwyczaj wytwarzane przez systematyczną ewolucję ligandów za pomocą technologii wykładniczego wzbogacania (SELEX). Jest to metoda uzyskiwania oligonukleotydów o wysokim powinowactwie do sekwencji docelowej, oparta na

początkowym uzyskiwaniu wstępnego panelu aptamerów, a następnie przeprowadzeniu sekwencjonowania nowej generacji w różnych cyklach w celu otrzymania szeregu potencjalnie użytecznych aptamerów. Termin aptamer pochodzi od łacińskiego słowa *aptus* oznaczającego *pasować* oraz greckiego słowa *meros*, oznaczającego *część*. Struktury aptamerów zapewniają specyficzne miejsca wiązania dla małych cząsteczek lub związków wielkocząsteczkowych kilku typów, w tym komórek, białek powierzchniowych komórek, bakterii i wirusów. Ponadto aptamery oddziałują z celami z wysokim powinowactwem i selektywnością (Gatto, Palumbo, i Sissi 2009).

W ciągu ostatnich kilku lat opracowano szereg aptamerów formujących struktury G-quadrupleksów, których potencjał został wykorzystany na wiele sposobów, takich jak antykoagulanty, środki terapeutyczne do leczenia chorób oraz jako nanourządzenia. Badania z udziałem aptamerów wykazały, że G-quadrupleksy są silną i użyteczną alternatywą dla przeciwciał w terapii celowanej, a także w diagnostyce *in vitro* i *in vivo* lub wykrywania biomarkerów. Wpływ na to ma między innymi ich wysoka stabilność, zwiększony wychwyty komórkowy, łatwość modyfikacji chemicznej, niewielkie koszty produkcji i wygodne przechowywanie. Jednym z przykładowych aptamerów opartych na strukturze G-quadrupleksu jest aptamer AS1411, formalnie nazywany jako ACT-GRO-777 (Bates i in. 2009). Jest to odkryty przez przypadek, nie przez konwencjonalne podejście SELEX, najbardziej zaawansowany i pierwszy w swojej klasie aptamer przeciwnowotworowy, który wszedł do badań klinicznych. AS1411 to tworzący G-quadrupleks 26-merowy aptamer DNA, wysoce stabilny i odporny na degradację nukleazą (enzym przecinający wiązania fosfodiesterowe w kwasach nukleinowych), ukierunkowany na nukleolinę. Nukleolina jest wszechobecnym i wielofunkcyjnym białkiem, odgrywającym zasadniczą rolę w przeżyciu, wzroście i proliferacji komórek (Yu i in. 2016). AS1411 wiąże się z zewnętrzną domeną nukleoliny, która ulega nadekspresji na powierzchni komórek nowotworowych. Dlatego ten aptamer jest w stanie specyficznie rozpoznawać, a następnie być pobierany przez komórki nowotworowe (Soundararajan i in. 2009). Zinternalizowany kompleks aptamer-nukleolina hamuje replikację DNA, powodując akumulację komórek w fazie S i cytotoksyczność wobec komórek nowotworowych (Wu i in. 2015). Badacze zaproponowali również inny mechanizm działania tego aptameru: AS1411 jest internalizowany przez makropinocytozę, w której pośredniczy nukleolina. Zinternalizowany kompleks aptamer-nukleolina powoduje hiperstymulację makropinocytozy, która następnie powoduje nieapoptyczną śmierć komórek, znaną

jako metuoza (Reyes-Reyes i in. 2015). W badaniach przedklinicznych AS1411 wykazał działanie antyproliferacyjne w kilku liniach komórek, w tym w komórkach raka płuc, prostaty i piersi. W badaniach klinicznych fazy I AS1411 był dobrze tolerowany przez pacjentów z zaawansowanymi guzami litymi bez poważnej toksyczności (Bates i in. 2009). W II fazie badań klinicznych AS1411 wykazał obiecującą aktywność przeciwko przerzutowemu rakowi nerkowokomórkowemu i ostrej białaczce szpikowej przy minimalnej toksyczności (Rosenberg i in. 2014).

Biorąc pod uwagę, że większość leków przeciwnowotworowych, przeciwwirusowych wiąże się z ciężkimi skutkami ubocznymi ze względu na ich słabą selektywność, pilnie potrzebne są skuteczne systemy dostarczania leków. Z pomocą mogą przyjść aptamery, które mają zdolność szybkiego rozpoznawania celów białkowych, co może pomóc w uzyskaniu leków o celowaniu specyficznym. Aptamery mogą być sprzężone z lekiem w celu dostarczenia go do specyficznych receptorów, którymi zwykle są białka powierzchniowe komórek, ulegających nadekspresji na komórkach docelowych i niedostatecznej ekspresji na zdrowych komórkach niedocelowych (Platella i in. 2017). Ciekawym przypadkiem jest omówiony powyżej aptamer AS1411, który działa zarówno jako potencjalny lek o obiecującej aktywności przeciwnowotworowej i przeciw HIV (Perrone i in. 2016), jak i jako system dostarczania leków, który jest wydajny i selektywnie internalizowany przez nukleolinę, nadekspymowany na komórkach nowotworowych przez makropinocytozę (Reyes-Reyes, Teng, i Bates 2010).

Chociaż aptamery bogate w guaninę mają szeroki zakres zastosowań, cząsteczki nadal napotykać pewne przeszkody, takie jak degradacja nukleazy lub wydalanie przez nerki czy też pewnego rodzaju wahania przed przejściem na nowy rodzaj produktów (Roxo, Kotkowiak, i Pasternak 2019). Dlatego wymagane są dodatkowe badania, szczególnie na poziomie przedklinicznym i klinicznym, aby aptamery bogate w guaninę były szeroko stosowane w przyszłości, zwłaszcza w dziedzinach terapeutycznych i diagnostycznych.

Wraz ze wzrostem badań i wiedzy, naukowcy odkryli, że również RNA może związać się w struktury G-quadruplexowe (Gq). Gq-RNA dzieli główne cechy strukturalne z Gq-DNA, jednak jedną z różnic na podstawie obserwacji w przeprowadzonych badaniach jest wyższa termodynamiczna i termiczna stabilność Gq-RNA w porównaniu z jego odpowiednikiem utworzonym w DNA. Różnice te są uważane za spowodowane lepszym układaniem się tetraed guaninowych i występującą

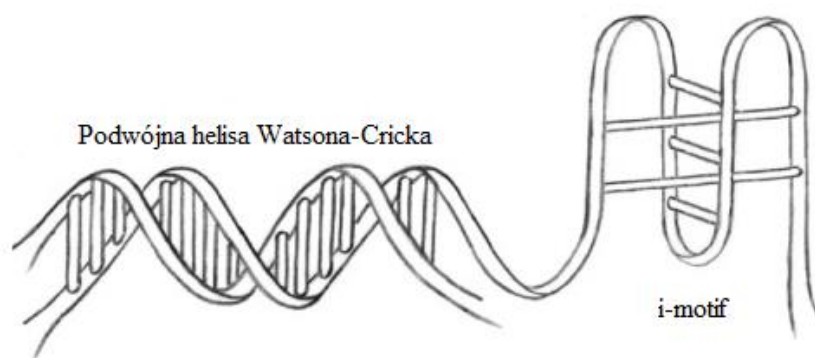
dotatkową siecią wiązań wodorowych, obejmujących dodatkowe grupy OH w rybozie RNA. Dodatkowo G-quadrupleksy utworzone w rejonach RNA bogatych w guaninę są bardziej zwarte i mniej uwodnione, co także przyczyniło się do tego, że te struktury weszły do trendów badawczych w ciągu ostatnich kilku lat. (Joachimi, Benz, i Hartig 2009; Pagano i in. 2008; Zaccaria i Fonseca Guerra 2018). Badania nad warunkami sprzyjającymi tworzeniu struktur G-quadrupleksów zarówno w DNA jak i w RNA oraz nad stabilizującymi je ligandami, cieszą się wielkim zainteresowaniem wśród naukowców i są źródłem ożywionej debaty, gdyż uznawane są za realną strategię terapeutyczną przeciwko nowotworom i zaburzeniom neurologicznym (Maizels 2015).

G-quadrupleksy obecne w gatunkach eukariotycznych były i są nadal szeroko badane, ich obecność w bakteriach i wirusach przyciągnęła uwagę dopiero w ciągu ostatnich kilku lat (Abiri i in. 2021; Ruggiero i Richter 2020; Saranathan i Vivekanandan 2019; Yadav i in. 2021). U bakterii G-quadrupleksy znajdują się w regionach regulatorowych, które pełnią ważne funkcje w replikacji, odporności na promieniowanie, zmienności antygenowej i latencji (Saranathan i Vivekanandan 2019). W wirusach odgrywają ważną rolę regulacyjną w kluczowych etapach wirusowych (Métifiot i in. 2014). Ostatnie badania wykazały powstawanie i funkcję G-quadrupleksów w patogenach odpowiedzialnych za poważne choroby. Wśród nich są *Pseudomonas aeruginosa* (Shao i in. 2020), ludzki wirus brodawczaka (HPV) (Tlučková i in. 2013), ludzki wirus niedoboru odporności (HIV) (Métifiot i in. 2014) i SARS-CoV-2 (Zhao i in. 2021).

Strukturę tetraed guaninowych określono na początku lat 60-tych, w latach 90-tych G-quadrupleksy były intrygującym, mało znanym odstępstwem od kanonicznej struktury Watsona-Cricka. Jednak w ciągu ostatnich dwóch dekad uzyskano niezwykłą ilość informacji, które umożliwiły rozwój wiedzy dotyczącej tej struktury kwasu nukleinowego od podstawowej wiedzy na temat jej budowy do zastosowań klinicznych. Pomimo to tematyka badawcza związana z G-quadrupleksem nadal wymaga dalszych badań nad jego strukturą, funkcją biologiczną i nad znalezieniem małocząsteczkowych ligandów, które mogłyby ułatwić tworzenie i stabilizację struktur G-quadrupleksów, ponieważ jest to potrzebne dla zrozumienia i opracowania nowych metod leczenia m.in. nowotworów, kontrolowania infekcji wirusowych i kontrolowanego dostarczania leków.

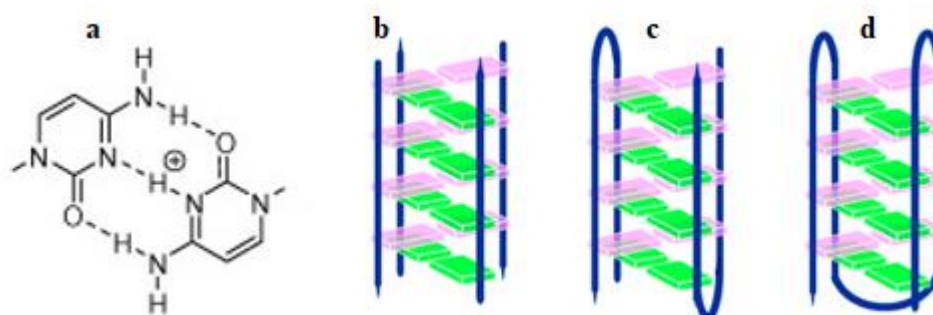
1.4.2. I-motif

W genomowym DNA, gdziekolwiek występuje sekwencja bogata w guaninę, zawsze znajdują się sekwencje komplementarne bogate w cytozynę. Takie sekwencje mogą również tworzyć struktury czteroniciowe znane jako **i-motif (iM)**. Dotychczas mniej wiadomo na temat występowania tych struktur *in vivo* i ich potencjału jako celów dla chemicznej interwencji biologii komórki w porównaniu do struktur G-quadrupleksu. Nazwa i-motif (z ang. *intercalated motif*) nawiązuje do zjawiska interkalacji, prowadzącego do charakterystycznego skręcania DNA (Rys. 1.6.) oraz schematu czy wzoru na to, w jaki sposób do tego dochodzi (od ang. *motif*) (Day, Pavlou, i Waller 2014).



Rys. 1.6. Schematyczne porównanie podwójnej helisy Watsona-Cricka ze strukturą i-motif (Day i in. 2014)

Pierwszy i-motif DNA został scharakteryzowany przez Gehringa i wsp. dla sekwencji heksamery d(TCCCCC), tworzącej interkalowaną cztero-helikalną strukturę tetramolekularną w warunkach kwasowych (Gehring, Leroy, i Guéron 1993). I-motif składa się z dwóch równoległych dupleksów DNA, utrzymywanych razem w orientacji antyrównoległej przez interkalację par zasad cytozyna- cytozyna protonowana (C-C⁺). Struktura ta może być utworzona w wyniku przestrzennego ułożenia par zasad C-C⁺, obejmujących powtórzenia cytozynowe obecne w jednej nici kwasu nukleinowego, tworząc tzw. wewnątrzcząsteczkowy i-motif. Z drugiej strony i-motif może być utworzony w wyniku oddziaływania powtórzeń cytozynowych obecnych w dwóch (dimerach) lub czterech (tetramerach) niezależnych niciach kwasu nukleinowego, tworzących międzycząsteczkowe struktury i-motif (Rys. 1.7.) (Benabou i in. 2014; Dong, Yang, i Liu 2014).



Rys. 1.7. Schematyczna ilustracja konformacji i-motif: (a) pół-protonowana para zasad cytozyna-cytozyna⁺; (b) struktura tetrameru i-motif; (c) dimerowa struktura i-motif; (d) wewnątrzcząsteczkowa struktura i-motif (Dong i in. 2014).

Interkalacja par zasad dwóch równoległych dupleksów prowadzi do struktury z dwoma głównymi szerokimi rowkami i dwoma mniejszymi, wąskimi. Dwa mniejsze rowki są bardzo wąskie, co powoduje powstanie wielu krótkich odległości między niemi wzdłuż szkieletów fosforanowych. Prowadzi to do pojawienia się oddziaływań destabilizujących ze względu na bliskie odległości pomiędzy sąsiednimi, ujemnie naładowanymi szkieletami fosforanowymi, które wyznaczają mniejszy rowek. Musi to być zrównoważone, aby i-motif był stabilny. Do zbadania wpływu odpychania fosforanów na stabilność tetramerycznego i-motifu utworzonego z sekwencji d(CCCC) wykorzystano symulacje dynamiki molekularnej. Symulacje te wykazały, że siły van der Waalsa i wiązania wodorowe między cukrami są odpowiedzialne za stabilizację wąskich rowków w strukturze i-motifu (Malliavin i in. 2003). Pół-protonowane pary zasad C-C⁺ również są ważne dla stabilności i-motifu. Trzy wiązania wodorowe pary zasad C-C⁺ nadają wysoką stabilność. Obliczenia komputerowe wskazują, że energia parowania zasad (BPE) dla pary C-C⁺ wynosi 169.7 kJ/mol i jest wyższa niż BPE kanonicznej pary zasad Watsona-Cricka pomiędzy guaniną i cytozyną (96.6 kJ/mol) oraz od energii neutralnej pary zasad C-C (68,0 kJ/mol) (Yang i Rodgers 2014). Podobnie jak inne struktury kwasów nukleinowych, stabilność i-motifu zależy od wielu czynników, w tym natury sekwencji, temperatury i siły jonowej. Istotne dla zrozumienia czynników wpływających na stabilność tej struktury są badania dotyczące chemicznie zmodyfikowanych struktur i-motif. Pół-protonowane pary zasad C-C⁺ są kluczowymi interakcjami dla stabilności i-motifu. Wpływ modyfikacji chemicznych w tych parach zasad był badany w różnych kontekstach. Wadkins i wsp. wykazali, że modyfikacja cytozyny może mieć różny wpływ na stabilność i-motifu w zależności od warunków środowiskowych (Bhavsar-Jog i in. 2014). Na przykład zastąpienie cytozyny jej fluorowcowymi analogami takimi jak

5-fluoro, 5-bromo i 5-jodocytozyną, zwiększając stabilność i-motifu w warunkach kwasowych (Lannes i in. 2015). Te modyfikacje zapewniają pewną kontrolę nad stabilnością i-motifu w eksperymentach laboratoryjnych i zapewniają wgląd w strukturę i proces formowania się i-motifu. Z kolei w laboratorium Wallera zbadano szereg modyfikacji cytozyny i ustalono, że i-motyfy stabilne w fizjologicznym pH częściej składały się z metylowanych cytozyn. Odkrycie to wskazuje, że metylacja może przyczyniać się do tworzenia i-motifu w żywych komórkach (Wright i in. 2020). Prowadzono również badania obejmujące modyfikacje szkieletu cukrowego i fosforanowego. Modyfikacje cukru w większości destabilizowały struktury i-motifu. Dodatkowe podstawniki w pierścieniu cukru, zorientowane w kierunku zwartego mniejszego rowka struktury i-motifu, powodują zderzenia steryczne, które dodatkowo destabilizują strukturę (Abou Assi i in. 2018). Ułożenie szkieletu cukrowo-fosforanowego w fałdowaniu i-motifu powoduje niezwykle krótkie odległości między sąsiednimi fosforanami. Próbuąc stłumić odpychanie między ujemnie naładowanymi szkieletami fosforanowymi, zbadano kilka modyfikacji szkieletów. Mergny i Lacroix zbadali wpływ tiofosforanu i metylofosfonianu w przeciwieństwie do szkieletu fosfodiestrowego. Ich badania pokazują, że tylko szkielety wykazujące wiązania fosfodiestrowe i tiofosforanowe umożliwiają tworzenie i-motifu. Postawili hipotezę, że chociaż szkielet metylofosfonianowy jest obojętny, masywność grupy metylowej zapobiega powstawaniu i-motifu. Włączenie tiofosforanów do kilku sekwencji DNA bogatych w cytozynę prowadzi do powstania stabilnych struktur i-motif przy neutralnym pH i są one tylko o kilka stopni mniej stabilne niż struktury niezmodyfikowane (Abou Assi i in. 2018; Mergny i Lacroix 1998). Inna zbadana modyfikacja szkieletu polegała na zastąpieniu ujemnie naładowanego szkieletu cukrowo-fosforanowego neutralnym szkieletem poliamidowym, tj. kwasem peptydonukleinowym (PNA). Balasubramanian i wsp. badali wpływ PNA na modelową sekwencję heksanukleotydomą p(TCCCCC) przy użyciu spektrometrii masowej z jonizacją i jonizacją przez nanoelektrozpylanie. Wykazano, że PNA tworzy stabilne struktury i-motif, jednak zwijanie i-motifu występuje w węższym zakresie pH (4,1–4,5) w porównaniu z jego odpowiednikiem DNA (4,5–6,5) (Krishnan-Ghosh, Stephens, i Balasubramanian 2005). Grupa Wallera i grupa Burrowsa badały również wpływ długości sekwencji DNA bogatych w cytozynę na zwijanie wewnątrzcząsteczkowych struktur i-motif w warunkach fizjologicznych. Tworzenie i-motifu oceniano za pomocą spektroskopii w ultrafiolecie i dichroizmu kołowego. Ogólny wniosek

z przeprowadzonych badań jest taki, że w tych samych warunkach eksperymentalnych struktura i-motifu posiadająca większą liczbę par zasad C-C⁺ jest bardziej stabilna. Naukowcy twierdzą, że możliwe jest osiągnięcie stabilności i-motifu przy fizjologicznym pH bez użycia modyfikacji pod warunkiem, że minimalna długość odcinka bogatego w cytozynę zawiera minimum pięć sąsiadujących ze sobą cytozyn (Fleming i in. 2017; Wright, Huppert, i Waller 2017). W celu poznania i otrzymania stabilnej struktury i-motifu badano również wpływ siły jonowej i stłoczenia molekularnego. Okazało się, że na struktury i-motifu wpływa siła jonowa roztworu. Mergny i wsp. wykazali, że zwiększenie stężenia NaCl od 0 do 100 mM destabilizuje struktury i-motifu. Wyższe stężenia NaCl (300 mM) nie powodowały dalszej destabilizacji. Ten sam trend zmniejszania stabilności i-motifu wraz ze wzrostem siły jonowej zaobserwowano w sekwencjach obecnych w promotorze genu n-MYC (Abou Assi i in. 2018; Day i in. 2014). Jeżeli chodzi o stłoczenie molekularne to czynniki zagęszczania cząsteczkowego, takie jak glikole polietylenowe o dużej masie cząsteczkowej (PEG), są szeroko stosowane do naśladowania zatłoczonego środowiska, jakie kwas nukleinowy miałby wewnątrz komórki. Warunki stłoczenia preferencyjnie stabilizują zarówno struktury i-motif, jak i G-quadrupleksu nad dupleksami i jednoniciowym DNA. Na przykład, w mieszaninie 1:1 sekwencji bogatych w guaninę i cytozynę, warunki zagęszczenia molekularnego przesuwają równowagę w kierunku struktur G-quadrupleksu i i-motifu oraz zapobiegają tworzeniu dupleksu Watsona-Cricka (Cui i in. 2013; Miyoshi i in. 2004).

Pomimo wielu potencjalnych czynników sprzyjających formowaniu się i-motifu, kwasowe pH środowiska pozostaje jednym z głównych wymogów w tworzeniu tej struktury DNA. Wymóg protonowania połowy cytozyn tworzących pary dla utworzenia struktury i-motif *in vitro* sprawił, że ta forma DNA ma szeroką gamę zastosowań w nanotechnologii. Podczas zmian pH, i-motif może odwracalnie związać się i rozwijać do struktury przypominającej wsuwkę do włosów, co daje potencjalne zastosowania w nanotechnologii, na przykład w projektowaniu nanomaszyn do celów analitycznych i biomedycznych (Alba, Sadurní, i Gargallo 2016; Liu i Balasubramanian 2003; Wang, Elbaz, i Willner 2011; Zhao i in. 2020); jako przełączniki do operacji logicznych (Li i in. 2012; Yang i in. 2010) oraz jako czujniki do mapowania zmian pH w żywych komórkach (Modi i in. 2009). Pomiar wewnątrzkomórkowego pH jest podstawowym celem w naukach biologicznych, biorąc pod uwagę kluczowy wpływ pH na procesy komórkowe i konsekwencje rozregulowanego wewnątrzkomórkowego pH w niektórych chorobach, takich jak nowotwory (Webb i in. 2011). Te przykłady zastosowań struktur i-motif

podkreślają jej potencjał jako elementu budulcowego w układach do zastosowań nanobiotechnologicznych (Zhou i in. 2010).

Sekwencje DNA bogate w cytozynę wykazują skłonność do zwijania się w konformację i-motifu przy pH od lekko kwaśnego do prawie neutralnego. Ponieważ protonowanie cytozyny bierze udział w tworzeniu i-motifu, stabilność tej struktury jest silnie zależna od pH, przy czym i-motifom sprzyja lekko kwaśne środowisko. Maksimum stabilności i-motif osiąga zazwyczaj przy pH 4 i 5, co sprzyja protonowaniu połowy cytozyn. Dalszy spadek pH prowadzi do protonowania pozostałych cytozyn z późniejszym zaburzeniem struktury i-motifu w okolicach pH ~ 3 (Benabou i in. 2014; Kim i Chalikian 2016). Ze względu na wymóg pół-protonowanych par zasad sądzono, że struktury i-motif mogą powstawać tylko przy kwasowych wartościach pH, jednak kilka badań wykazało, że stabilne struktury i-motif mogą tworzyć się również przy neutralnym pH w zależności od długości ciągu cytozyn, sekwencji pętli, temperatury, stężenia soli (Fleming i in. 2017; Wright i in. 2017). Struktury i-motif są znacznie bardziej stabilne w kwaśnym pH, ze względu na wymóg pół-protonowanych par cytozyn, ale były one również obserwowane w obojętnym pH i niskich temperaturach (4°C) (Zhou i in. 2010), w warunkach zagęszczenia molekularnego (Rajendran, Nakano, i Sugimoto 2010), przy ujemnej superhelikalności (Sun i Hurley 2009), w obecności kationów srebra lub miedzi (I) (Abdelhamid i in. 2018; Day, Huguin, i Waller 2013) oraz wewnątrz nanokanałów krzemionkowych (Satpathi, Das, i Hazra 2018). Z drugiej strony wydaje się, że wymóg kwaśnego pH dla otrzymania stabilnej struktury i-motif bez modyfikacji środowiska jest barierą nie do pokonania. Wiadomo, że rozregulowane pH jest cechą adaptacyjną większości nowotworów, niezależnie od ich pochodzenia tkankowego lub genetycznego. W normalnych dorosłych komórkach pH wewnątrzkomórkowe jest na ogół niższe (około 7,2) niż pH zewnątrzkomórkowe (około 7,4). Jednak komórki rakowe mają wyższe wewnątrzkomórkowe (około 7,4) i niższe zewnątrzkomórkowe pH (6,7-7,1). W tych warunkach sekwencje nici DNA bogate w cytozynę mogą przyjmować struktury i-motif *in vivo* i modulować tworzenie innych struktur kwasu nukleinowego. Kwaśne pH mikrośrodowiska guza w wyniku aktywnego metabolizmu komórek rakowych, zwiększyło zainteresowanie systemami reagującymi na pH do selektywnego dostarczania opartych na strukturze i-motif, który stanowi interesujący szkielet DNA wrażliwy na zmiany pH (Benabou i in. 2014; Webb i in. 2011). Pomimo to jednak nadal istnieją ograniczone opublikowane badania nad biologiczną funkcją, powstawaniem struktur i-motifu i jego stabilnością *in vivo*. Ostatnio Zeraati i wsp. udało się wytworzyć

i scharakteryzować fragment przeciwciała (iMab), które rozpoznaje struktury i-motif z wysoką selektywnością i powinowactwem, umożliwiając wykrywanie i-motifu w jądrach komórek ludzkich. Na podstawie swoich badań stwierdzili, że tworzenie tej struktury *in vivo* jest zależne od cyklu komórkowego i pH oraz że powstaje ona w regionach regulatorowych ludzkiego genomu, w tym w promotorach i regionach telomerycznych. Naukowcy podejrzewają, że struktury G-quadrupleksu i i-motifu mogą odgrywać uzupełniające się role w regulacji ekspresji genów (Zeraati i in. 2018).

Pomimo ogromnych postępów w badaniach nad biologią strukturalną i-motifu, wiele aspektów nadal wymaga dalszych, bardziej szczegółowych badań. Obecne badania sugerują, że i-motif tworzy się przejściowo w komórce. Jednak zdecydowanie potrzebne są dalsze badania zarówno *in vivo* jak i *in vitro*, aby potwierdzić powstawanie tej struktury w różnych fazach cyklu komórkowego i odkryć oraz wyjaśnić jej rolę w różnych procesach biologicznych, ponieważ rola i-motifu wydaje się być coraz ważniejsza w miarę kontynuowania badań. W celu ułatwienia badań nad i-motifami, zarówno w ludzkim genomie, jak i w zastosowaniach biotechnologicznych, potrzeba więcej informacji o tym, jakie zmienne wpływają na ich powstawanie oraz jakie ligandy mogą wpływać na ich stabilizację. Jest jeszcze wiele do poznania na temat tej struktury DNA.

2. Oddziaływanie niekanonicznych form DNA z ligandami stabilizującymi

Struktury kwasu nukleinowego w postaci G-quadrupleksu i i-motifu są badane pod różnymi względami i są obecnie uważane za ważnych uczestników wydarzeń w dziedzinie farmakologii, biologii i medycyny. Struktury te mają szanse być wykorzystane w kontrolowanym dostarczaniu leków, np. przy nowych technikach walki z nowotworami. Leki ukierunkowane na białka napotykaają na drodze do celu liczne podobne struktury, dlatego początkowo badane leki mające oddziaływać ze strukturami G-quadrupleksu wykazywały niską selektywność względem docelowej struktury. Ta niska selektywność często powodowała nieoczekiwane efekty, które były powodem zatrzymania procesu dalszego opracowywania danego leku. Dlatego też sporo uwagi poświęca się obecnie poszukiwaniu coraz to nowszych ligandów oddziałujących selektywnie z określonymi strukturami DNA. Małe cząsteczki zdolne do rozpoznawania i selektywnej interakcji z G-quadrupleksem czy i-motifem mają ogromny potencjał terapeutyczny, jako narzędzia w odkrywaniu celów leków oraz diagnostyce medycznej (Asamitsu, Obata, i in. 2019).

Ponieważ telomeraza, stanowiąca kompleks białkowy wydłużający sekwencje telomerowe, jest silnie aktywna w wielu komórkach nowotworowych, co może prowadzić do nieśmiertelności takiej komórki i powstawania guza nowotworowego, tworzenie się struktury G-quadrupleksu w takim odcinku telomeru stanowi potencjalny cel biomedyczny dla małych cząsteczek, które hamują tę aktywność telomerazy w komórkach nowotworowych. Dzięki tworzeniu struktury G-quadrupleksu stwierdzono, że pochodne 2,6-diaminoantrachinonu i telomestatina są inhibitorami telomerazy poprzez indukowanie tworzenia struktur G-quadrupleksu, po utworzeniu której następuje spadek aktywności telomerazy komórek nowotworowych, w wyniku czego komórka umiera z powodu starzenia się. Warto zaznaczyć, że telomestatina jest produktem naturalnym, wyizolowanym z bakterii glebowej *Streptomyces anulatus* i stanowi pierwszy naturalny inhibitor telomerazy, ze względu na jej zdolność do ułatwienia tworzenia lub stabilizację struktur G-quadrupleksu w związku ze strukturalnym podobieństwem pomiędzy tymi dwoma strukturami (Asamitsu, Obata, i in. 2019; Kim i in. 2002; Shin-ya i in. 2001). Kationowa porfiryra, TMPyP4, której płaski szkielet i skłonność do kationów ułatwia tworzenie G-quadrupleksu, również została

zidentyfikowana jako jeden z pierwszych ligandów tej struktury DNA (Anantha, Azam, i Sheardy 1998). Te pionierskie prace przyspieszyły selektywny rozwój wobec technik, metod i cząsteczek stanowiących ligandy G-quadrupleksu. Do dziś z listy dostępnych ligandów G-quadrupleksu, kilka z początkowo odkrytych takich jak BRACO19 (Burger i in. 2005), pirydostatyna (Rodriguez i in. 2008), Phen-DC3 (De Cian i in. 2007), L1H1-7OTD (Tera i in. 2009), z których wszystkie mają pomijalne powinowactwo wiązania z dupleksowym DNA, dzięki czemu stanowią selektywne ligandy dla G-quadrupleksu, są do dziś niezbędne w badaniach biochemicznych, biofizycznych i chemicznych biologii G-quadrupleksu. Ligandy G-quadrupleksu są związkami chemicznymi, które specyficznie wiążą i stabilizują struktury G-quadrupleksu. Do tej pory opisano już ponad 800 rodzajów ligandów tej niekanonicznej struktury DNA (Nakanishi i Seimiya 2020; Santos i in. 2021).

Poza strukturami G-quadrupleksu i ich ligandami we fragmentach telomerowych DNA, także ligandy i sekwencje tworzące G-quadrupleks obserwowane w promotorze genów związanych z rakiem, również zyskały dużą uwagę jako potencjalne cele biomedyczne w terapii przeciwnowotworowej (Balasubramanian, Hurley, i Neidle 2011; Wang i in. 2020). Quarfloxin, ligand oddziałujący z G-quadrupleksem, zakończył badania II fazy jako kandydat na środek terapeutyczny przeciwko kilku nowotworom, w tym nowotworom neuroendokrynnym, rakowiakom i chłoniakom. Uważa się, że kwarfloksyna zaburza kompleksy G-quadrupleks-nukleolina rybosomalnego DNA w jąderku, co z kolei powoduje redystrybucję nukleoliny do nukleoplazmy, gdzie wiąże się z G-quadrupleksem w regionie promotorowym protoonkogenu c-MYC w celu zahamowania ekspresji genów. Ligandy oddziałujące z G-quadrupleksem mogą przyczyniać się do tłumienia dalszej ekspresji c-MYC przez stabilizację G-quadrupleksu za pośrednictwem ligandu. W tym kontekście ligandy oddziałujące z G-quadrupleksem ukierunkowane na c-MYC były badane w ciągu ostatnich dwóch dekad w celu zastosowania leków w terapii przeciwnowotworowej. Badania III fazy, dotyczące kwarfloksyny nie są obecnie prowadzone ze względu na wysokie wiązanie albumin (Asamitsu, Obata, i in. 2019). Dash i wsp. donieśli, że peptyd tiazolowy w kształcie księżycy, TH3, preferencyjnie stabilizuje c-MYC-G-quadrupleks w porównaniu do struktury G-quadrupleksu w innych promotorach, przez co jest specyficznym ligandem (Dutta i in. 2018). Oprócz tego doniesienia, inne geny związane z nowotworem, w tym hTERT (Palumbo, Ebbinghaus, i Hurley 2009), c-kit (Rankin i in. 2005), KRAS (Morgan i in. 2016) i BCL2 (Dexheimer, Sun, i Hurley 2006) zostały zidentyfikowane jako geny,

w których tworzenie G-quadrupleksu było zaangażowane w regulację transkrypcji, a jego stabilizacja przez ligandy osłabiała aktywność promotora, ostatecznie indukując apoptozę guza.

Szeroko zakrojone badania nad ligandami G-quadrupleksu prowadzą do przekonania, że G-quadrupleksy są zdolne do licznego tworzenia się w bogatych w guaninę regionach DNA czy RNA. Chociaż liczni badacze podjęli ogromne wysiłki w celu uzyskania wysoce aktywnych ligandów G-quadrupleksu, a niektórzy z nich osiągnęli wielki sukces w opracowaniu leków wykorzystujących te ligandy *in vivo*, jednak leki te są wciąż dopiero w połowie drogi do zatwierdzenia ich do użytku klinicznego. Jedną z przeszkód utrudniających kliniczne zastosowanie określonych cząsteczek oddziałujących ze strukturami G-quadrupleksu jest wymagana określona selektywność (Asamitsu, Bando, i Sugiyama 2019; Tian i in. 2018). Stąd też do dnia dzisiejszego prowadzone są badania nad projektowaniem ligandów G-quadrupleksu i ich zastosowaniem w tworzeniu terapii przeciwnowotworowych czy także przeciwwirusowych oraz nad identyfikacją G-quadrupleksów w żywych komórkach. Tak długo, jak opracowywane będą nowe ligandy, technologie i teorie, struktura G-quadrupleksu będzie miała szerokie i znaczące zastosowanie biomedyczne (Zhao i in. 2021).

Jeżeli chodzi o ligandy oddziałujące selektywnie ze strukturami DNA w postaci i-motifu to w porównaniu do G-quadrupleksów zarówno skuteczność takich ligandów jak i ich ilość są stanowczo mniej zbadane i jest ich mniej niż dla struktur G-quadrupleks. Opracowanie selektywnych ligandów i-motifu za pomocą konwencjonalnych metod jest trudne ze względu na złożoność strukturalną i-motifu oraz preferencyjne powstawanie tej struktury przy pH kwasowym. Pierwszy przykład związku wiążącego i-motif został opublikowany przez Hurleya i wsp. w 2000 roku. Stosując ludzkie sekwencje telomeryczne d(CCCAAT)₄ i d(AATCCC)₄ zbadali właściwości wiążące kationowej porfiryny, TMPyP4, która jak stwierdzono wiąże się z daną sekwencją nukleotydów i promuje tworzenie i-motifu przy pH 4,5. Jednak ten ligand posłużył jedynie jako wskazówka do dalszych prac rozwojowych w celu poprawy selektywności kolejnych ligandów i-motifu, ponieważ ułatwia on również tworzenie G-quadrupleksu, przez co nie kwalifikuje się jako ligand selektywny dla konkretnej formy DNA (Fedoroff i in. 2000). Innymi opisanymi ligandami badanymi pod względem ich selektywności na struktury i-motifu są pochodne fenantroliny (Wang i in. 2013), koniugaty neomycyny z perylenem (Xue, Ranjan, i Arya 2011), fiolet krystaliczny (Ma i in. 2011), tioflawina T (Gao i in.

2016) i berberyny (Xu i in. 2016). Jednak również te ligandy nie wykazują znaczącej selektywności dla struktur i-motif w stosunku do struktur dupleksowych i G-quadrupleksów. W kolejnych latach Hurley i współpracownicy zidentyfikowali pochodną cholestanu jako silny i specyficzny związek wiążący i-motif, który może zapewnić podejście do regulacji transkrypcji BCL2 w komórkach rakowych (Kendrick i in. 2014). Obecnie tylko kilka specyficznych ligandów i-motifu, np. inhibitor topoisomerazy typu II, mitoksantron (Wright i in. 2016), ligandy peptydomimetyczne (Debnath i in. 2017), pochodne benzotiofenu (Brown i in. 2017) i pochodne akrydonu (Shu i in. 2018) zostały przetestowane w układzie komórkowym. Dzatko i wsp. przeprowadzili eksperymenty w komórkach wykorzystując NMR, aby ustalić czy i-motify pozostają stabilne w złożonym środowisku komórkowym żywych komórek ssaków (Dzatko i in. 2018). Zainteresowanie terapeutycznym potencjałem struktur i-motif wzrosło po odkryciu istnienia *in vivo* tej struktury w jądrach ludzkich komórek przez grupę Christa i Dingera. Było to możliwe dzięki odkryciu przeciwciała, które jest w stanie wiązać i-motif specyficznie w jądrze komórkowym żywych organizmów. Te badania potwierdziły, że i-motif może występować w regulatorowych regionach genomu żywych komórek w warunkach fizjologicznych (Zeraati i in. 2018). Jednak do dziś opracowanie selektywnych ligandów dla i-motifu jest trudne, ponieważ i-motif ma podobną czteroniciową topologię strukturalną z G-quadrupleksami.

Przełomem w poszukiwaniu ligandów dla i-motifu było opisane przez Chen i wsp. odkrycie, że karboksylowane jednościenne nanorurki węglowe mogą być uznane za wiodącego kandydata na pierwszy ligand, mogący selektywnie stabilizować ludzki, telomeryczny i-motif DNA. Mechanizm tego procesu, jak zaproponowali Chen i wsp., obejmował kilka dość złożonych mechanizmów biologicznych, prowadzących ostatecznie do wygenerowania odpowiedzi na uszkodzenie DNA na poziomie telomerycznym. Naukowcy stwierdzili późniejsze zahamowanie aktywności telomerazy w badanych żywych komórkach. Zasugerowali, że stabilizacja struktury i-motif i towarzyszące jej tworzenie G-quadrupleksów prowadzą do odsłonięcia telomerów i przemieszczania białek wiążących telomery, generując odpowiedź na uszkodzenie DNA na poziomie telomerycznym, a następnie zatrzymanie wzrostu komórek nowotworowych (Chen i in. 2012). Możliwość selektywnej indukcji tworzenia telomerowego i-motifu przez karboksylowane jednościenne nanorurki węglowe po raz pierwszy została zgłoszona przez Li i wsp. (Li i in. 2006). Naukowcy ci odkryli, że jednościenne nanorurki węglowe hamują asocjację dupleksu DNA i wiążą się z głównym rowkiem na końcu nici

5' przy obojętnym lub nawet lekko zasadowym pH=8 (Sun, Ren, i Qu 2016). Wiązanie jest stabilizowane m.in. przez oddziaływania elektrostatyczne między nanorurką modyfikowaną grupami karboksylowymi a parami zasad C:C⁺. Jednak w wymienionych warunkach półprotonowane pary cytozyn nie powinny istnieć. Inną hipotezą zaproponowaną przez Li i wsp. jest to, że nanorurki służą jako jądra kondensacji, aby zwiększyć skłonność do agregacji DNA, a efekt ten powinien ułatwić protonację C:C⁺. Kolejną interesującą obserwacją było to, że niekarboksylowane nanorurki mogą indukować tworzenie i-motifu przy obojętnym pH w warunkach zagęszczenia molekularnego, wywołanego obecnością poli(glikolu) etylenowego. Co ciekawe te warunki zagęszczenia molekularnego nie były w stanie wywołać tworzenia i-motifu bez obecności nanorurek (Zhao, Ren, i Qu 2008). Sugeruje to, że tworzenie i-motifu jest ułatwione przez specyficzny kształt nanorurek, a nie ich ładunek czy przyłączoną grupę funkcyjną. Jednak w dostępnej literaturze brakuje dokładnych raportów, dotyczących szczegółowego mechanizmu oddziaływania elementów układów składających się z telomerycznego odcinka DNA zawierającego niekanoniczne formy DNA, tj. i-motif czy G-quadrupleks oraz nanorurek węglowych. Powyższe interakcje wciąż nie są w pełni zrozumiałe. Należy poświęcić wiele uwagi wyjaśnieniu tych mechanizmów interakcji molekularnych, indukowanych skutków biologicznych i długoterminowego bezpieczeństwa biologicznego. To pozwoli ukierunkować właściwe metody i zastosowanie odpowiednich układów w różnych okolicznościach.

Pomimo odkryć dotyczących ligandów i-motifu, liczba znanych specyficznych substancji wiążących tę formę DNA jest bardzo ograniczona w porównaniu do ligandów G-quadrupleksu. Od wielu lat struktura G-quadrupleksu zyskała duże zainteresowanie badawcze, głównie ze względu na jej stabilność termodynamiczną w warunkach fizjologicznych. Jednak strukturę i-motif można określić poprzez jeden z potocznych frazeologizmów - brzydkim kaczątkiem, ponieważ przez wiele lat nie należała do grupy szeroko badanych niekanonicznych struktur DNA. Jednak badania z ostatnich lat dostarczają kolejnych ważnych informacji, dzięki którym rzucają nowe światło na tę strukturę DNA, dzięki czemu rola biologiczna struktury i-motifu, jej interakcje z nanorurkami oraz samo zainteresowanie tą strukturą rozkwitnie w nadchodzących latach (Saha i in. 2020; Satpathi i in. 2019). Do chwili obecnej chociaż pojawiło się kilka obiecujących zastosowań, które zaprojektowano w oparciu o specyficzne interakcje nanorurek z DNA, niewiele zastosowań można wykorzystać *in vivo*. Wiele interakcji pomiędzy nanorurkami a DNA zostało zbadanych i zwizualizowanych *in vitro*. Należy

sprawdzić, czy mogą one działać *in vivo*. Zdobyte informacje pomogą w odnajdowaniu nowych, dalszych zastosowań połączeń nanorurek ze strukturami DNA, w tym ze strukturą i-motifu w terapiach genowych, dostarczaniu leków czy nanotechnologii.

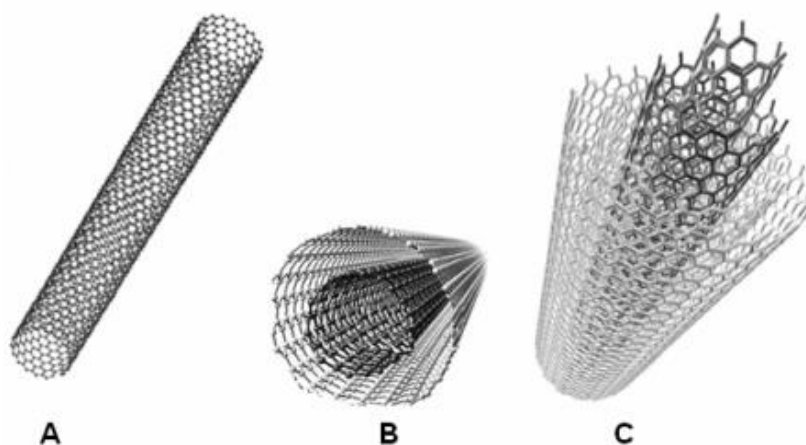
3. Nanorurki węglowe

W ciągu ostatniej dekady termin „nano” jest istotnym sformułowaniem w wielu profesjonalnych i popularnych dziedzinach życia. Istnieje wiele różnych opinii na temat tego, dokąd zaprowadzi nas to nowe i szybko rozwijające się globalne, interdyscyplinarne zainteresowanie produktami „nano”. Wiele osób zgodzi się, że termin „nano” i powiązane z nim odkrycia i eksperymenty mają niezwykły potencjał, aby zmienić nasze życie poprzez ulepszanie istniejących technologii oraz umożliwić rozwój nowych produktów. Zdolność do wytwarzania, charakteryzowania i wykorzystywania struktur materiałowych w skali 1–100 nm ma głęboki wpływ na przyszłe badania i rozwój w dziedzinie fizyki, chemii i biologii, a także może zrewolucjonizować komputerową, mechaniczną i elektryczną inżynierię, elektronikę, medycynę oraz transport poprzez tworzenie nowych materiałów, czujników i urządzeń. Jednym z odkryć wnoszącym duże zmiany w dziedzinie nauki, związanym z produktami „nano” są odkryte na początku lat 90. XX wieku nanorurki węglowe, które do dziś są tematem licznych badań i stanowią jeden z najbardziej obiecujących nanomateriałów do różnych zastosowań, w tym w dziedzinie biologii, a ściślej nanomedycynie (Cheung i in. 2010; Hudecki i in. 2019; Rode, Sharma, i Mishra 2018; Zare i in. 2021).

Nanorurki węglowe (*ang.*: *Carbon Nanotubes*, CNTs) wzbudziły ogromne zainteresowanie w dziedzinie biomedycyny ze względu na swoje obiecujące właściwości takie jak: duża powierzchnia, struktura przypominająca igłę, znaczna wytrzymałość, wysoką zdolność przenoszenia leków, wybitne cechy elektryczne i optyczne, wysoką stabilność, biokompatybilność i zdolność do uwalniania środków terapeutycznych w docelowych miejscach; ale także ze względu na swoje negatywne właściwości jak przede wszystkim brak biodegradowalności i toksyczność. Nanorurki węglowe w medycynie są często badane pod kątem kontrolowanego uwalniania leków w sprecyzowanych miejscach ich działania lub dostarczania materiału genetycznego, tj. DNA, genów lub przeciwciał. Dostarczane biocząsteczki lub substancje aktywne mogą być transportowane na zewnętrznych ściankach nanorurki lub wewnątrz pustej przestrzeni tej nanostruktury (Azqhandi, Farahani, i Dehghani 2017; Costa i in. 2016; Foo i Gopinath 2017).

3.1. Charakterystyka nanorurek węglowych

Nanorurki węglowe to struktury, które często uważane są za alotropową formę węgla. Struktura CNT składa się ze zwiniętej cylindrycznie warstwy grafenowej, zawierającej wyłącznie atomy węgla, ułożone w sześciokąty tworzące strukturę plastra miodu i wykazujące hybrydyzację typu sp^2 . Nanorurki węglowe można podzielić na dwie grupy: jednościenne nanorurki węglowe (ang.: Single-Walled Carbon Nanotubes, SWCNTs) i wielościenne nanorurki węglowe (ang.: Multi-Walled Carbon Nanotubes, MWCNTs), których złożony sposób budowy porównywany jest to zasady Matrioszki (Rys. 3.1.).

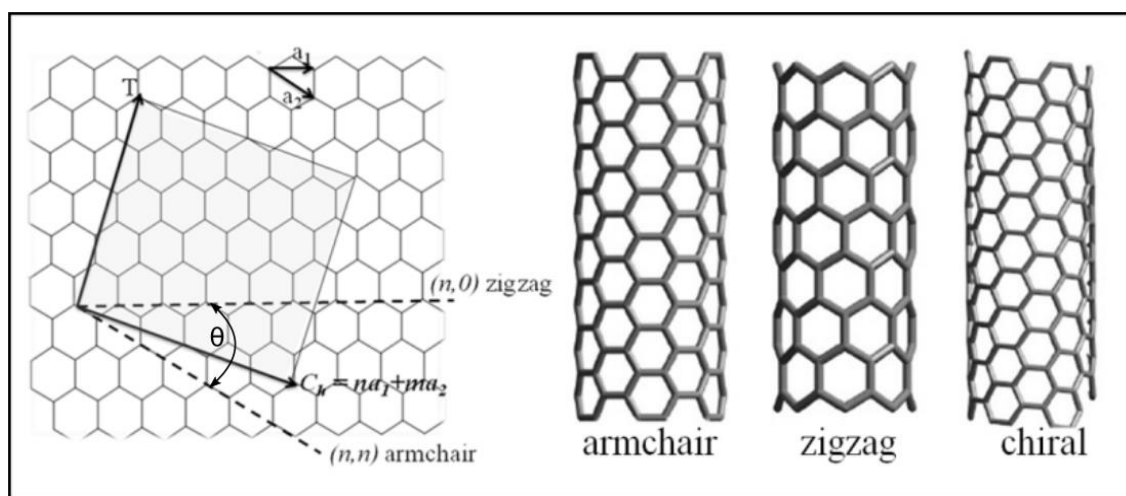


Rys. 3.1. Struktury nanorurek węglowych (A) jednościenne nanorurka SWCNT, (B) dwuścienne nanorurka węglowa DWCNT, (C) wielościenne nanorurka MWCNT (Terranova, Sessa, i Rossi 2006)

SWCNTs składają się z pojedynczego arkusza grafenu zwiniętego w rurkę, a z kolei MWCNTs powstają przez zwinięcie wielu współosiowo ułożonych warstw grafenu ze stałą separacją kolejnych, sąsiednich powłok wynoszącą $\sim 0,34$ nm. Wzajemne uporządkowanie kolejnych cylindrów zapewnia obecność sił van der Waalsa pomiędzy warstwami grafenowymi. Oba rodzaje nanorurek na ich końcach mogą być otwarte lub zamknięte czapczkami fulerenowymi (Eatemadi i in. 2014; Vidu i in. 2014). Nanorurki stanowią puste w środku cylindryczne molekuly, które mają średnice wyrażone w skali nanometrowej i długości w skali nano, mikro, a nawet milimetrów czy centymetrów, co daje im bardzo duże proporcje długości do średnicy, które czasami są większe niż 10^4 (Basu-Dutt i in. 2012). Średnice SWCNTs i MWCNTs wynoszą zwykle odpowiednio od 0,4 do 2 nm i od 2 do 20 nm, chociaż średnice MWCNTs mogą przekraczać 100 nm. Długości CNTs wahają się od mniej niż 100 nm do kilku centymetrów, łącząc w ten

sposób skalę molekularną i makroskopową. Cechą charakterystyczną nanorurek jest ich duża powierzchnia właściwa wynosząca od 10 do 200m²/g w zależności od ich rodzaju i średnicy. Nanorurki węglowe dzięki posiadaniu pustego wnętrza mają małą gęstość. Inną cechą przypisywaną tym strukturom są świetne właściwości mechaniczne, w tym sprężystość i elastyczność, dzięki czemu posiadają one niezwykłą wytrzymałość na rozciąganie, która jest 50-100-krotnie większa od stali (Popov 2004).

Kolejnym parametrem charakteryzującym nanorurki jest chiralność, która określa sposób w jaki zwinięto pojedynczą płaszczyznę grafenu wokół osi nanorurki, która wyrażona jest za pomocą indeksów chiralnych. Parametry określające chiralność danej nanorurki to: wektor chiralny C_h , indeksy chiralne (n,m) i kąt chiralny θ . Indeksy n oraz m w postaci liczb całkowitych oznaczają współrzędne sześciokąta na płaszczyźnie grafenowej i służą do określenia wektora chiralnego, który łączy dwie równoważne strony krystalograficzne płaszczyzny grafenowej i określa kierunek walcowania arkusza grafenowego. Każda para indeksów (n,m) odpowiada innemu sposobowi zwijania płaszczyzny grafenowej w nanorurkę i określa jej geometrię. Kąt chiralny to kąt zawarty pomiędzy osią symetrii a wektorem chiralnym. Klasyfikując nanorurki pod względem parametrów chiralności, wyróżnia się trzy typy konfiguracji strukturalnych nanorurek, których nazwy nawiązują do przekroju poprzecznego pojedynczego pierścienia struktury heksagonalnej: nanorurki zygzak (zigzag), dla których kąt chiralny $\theta = 0^\circ$, $C_h=(n,0)$, nanorurki fotelowe (armchair) $\theta = 30^\circ$, $C_h=(n,n)$ oraz nanorurki chiralne (chiral) $0^\circ < \theta < 30^\circ$, $C_h=(n,m)$ (Rys. 3.2.) (Sato i in. 2008).



Rys. 3.2. Zastosowanie notacji wektorowej do opisu struktury CNT. Arkusz grafenu zwija się w taki sposób, aby dwa punkty końcowe wektora C_h nakładały się na siebie (Prasek i in. 2011)

Im wyższa wartość indeksu n tym większa średnica utworzonej nanorurki. Kombinacje indeksów $(n,0)$ i (n,n) tworzą struktury nanorurek achiralnych, optycznie nieczynnych o wysokiej symetryczności, które wykazują lustrzaną symetrię względem osi nanorurki. Pozostałe nanorurki mające wektory (n,m) tj. nanorurki chiralne wykazują aktywność optyczną, tj. uginają światło spolaryzowane (Prasek i in. 2011). Wartości wskaźników wektora chiralnego oraz rozmiary średnic jednościennych nanorurek węglowych mają wpływ na ich właściwości elektryczne i decydują o charakterze metalicznym lub półprzewodnikowym nanorurek, co jest unikalną właściwością tych nanostuktur. Dzięki właściwościom elektrycznym czy optycznym, nanorurki są często wykorzystywane w zastosowaniach terapeutycznych i obrazowaniu (Fujisawa i in. 2016).

3.2. Zastosowanie nanorurek a ich toksyczność i funkcjonalizacja

Nanorurki węglowe, dzięki swoim właściwościom oraz nanometrycznym wielkościom, znalazły wiele potencjalnych jak i już zrealizowanych zastosowań w różnych dziedzinach nauki i życia. Wśród obszarów zastosowań CNTs wymienić można technologie komputerowe, materiały elektrodowe czy wielofunkcyjne materiały kompozytowe (Garg i in. 2021; Ni i Li 2016; Peng, Zhang, i Qiu 2019). Wysoka przepuszczalność wody i selektywność jonowa przez wewnętrzny kanał CNT otwiera możliwości zastosowania CNTs w separacji membranowej (Tunuguntla i in. 2017). Dzięki właściwościom mechanicznym, małej gęstości i przewodnictwu cieplnemu, nanorurki badane są również w roli wypełniaczy kompozytów (Menezes i in. 2019; Yang i in. 2020). Materiały na bazie nanorurek węglowych cieszą się także dużym zainteresowaniem jako nowatorskie materiały przetwarzania i przechowywania energii odnawialnej (Kumar i in. 2018). Jak opisali Mohajeri i wsp., CNTs są coraz częściej wykorzystywane do celów biomedycznych zarówno w diagnostyce jak i leczeniu różnych chorób m.in. ze względu na ich dość dobrą biokompatybilność z ważnymi cząsteczkami (jak np. DNA, białka), małe rozmiary, dużą powierzchnię właściwą, właściwości chemiczne czy fizyczne i korzyści wynikające z tych właściwości (Mohajeri, Behnam, i Sahebkar 2018).

Zastosowanie nanorurek w dziedzinie biomedycyny i nie tylko wymaga jednak sprostania kilku wyzwaniom. Pierwsze związane jest z bezpieczeństwem i zakłada stosowanie CNTs o bardzo wysokiej czystości w celu ograniczenia potencjalnego uwalniania toksycznych jonów podczas pracy w dowolnym środowisku biologicznym.

Jest to dość skomplikowane wyzwanie, ponieważ próbek CNTs o wysokiej czystości zwykle nie można przygotować na bardzo dużą skalę i często trzeba szukać kompromisu między jakością a ilością. Jednym z bezpośrednich czynników wpływających na szkodliwe działanie nanorurek jest obecność w nich zanieczyszczeń, zwłaszcza resztek katalizatorów takich jak metale przejściowe Fe, Y, Ni, Mo i Co, które wprowadzane są podczas procedur wytwarzania CNTs. Te metaliczne zanieczyszczenia w warunkach komórkowych mogą wytwarzać reaktywne formy tlenu, które z kolei mogą powodować występowanie objawów zapalnych, obejmujących wzrost biomarkerów zapalnych, degradację błony mitochondrialnej czy ubytek przeciwutleniaczy (Du i in. 2013). Stosowanym sposobem usuwania wyżej wymienionych zanieczyszczeń jest obróbka stężonymi kwasami tlenowymi. Sposób ten jednak często prowadzi do zwiększenia efektu toksyczności CNTs w porównaniu do sytuacji wyjściowej. Prawdopodobnym wytłumaczeniem jest to, że niemożliwe jest całkowite usunięcie zanieczyszczeń metalowych bez naruszenia integralności strukturalnej CNT, który powoduje wzrost reaktywności jej powierzchni (Ge i in. 2008; Liu i in. 2013). Dodatkowo ilości zanieczyszczeń metalicznych w CNT są dość różne w materiałach otrzymanych od różnych dostawców, co sprawia, że ocena toksyczności CNTs pod wpływem zanieczyszczeń jest bardziej skomplikowana.

Na toksyczność nanorurek wpływ mają także właściwości fizyczne, takie jak rodzaj, a przede wszystkim długość nanorurek węglowych. Przeprowadzone dotychczas badania wykazały, że dłuższe nanorurki są zatrzymywane w organizmie i wykazują większą biotrwałość niż krótsze CNTs, które z kolei ze względu na swój rozmiar (często poniżej 1 μ m) łatwiej przenikają przez błonę komórkową. Włóknisty kształt nanorurek węglowych budzi obawy, że mogą one stwarzać podobne do azbestu zagrożenie inhalacyjne, prowadzące do rozwoju chorób, zwłaszcza międzybłoniaka. Wpływ długości i obecności w organizmie CNTs badali m. in. Murph i wsp. którzy umieścili jednocześnie w jamie opłucnej krótkie i długie nanorurki węglowe. Naukowcy ci stwierdzili, że długie CNTs były zatrzymane w opłucnej i wywoływały ostry stan zapalny, prowadzący do postępującego zwłóknienia ścian opłucnej, podczas gdy krótkie nanorurki były z niej usuwane (Murphy i in. 2011). Również Kavosi i wsp. badali toksyczność i skuteczność nanorurek węglowych jedno- i wielościennych na podstawie raka piersi u myszy. Na podstawie swych badań zasugerowali, że MWCNTs w mniejszym rozmiarze są bardziej toksyczne niż większe oraz że toksyczność SWCNTs jest bardziej wyraźna niż MWCNTs (Kavosi i in. 2018). Jak dotąd, toksyczność

nanorurek opisano już w wielu publikacjach naukowych, w których odnoszono się do prowadzonych badań zarówno *in vitro* jak i *in vivo*, ale otrzymane wyniki są często rozbieżne (Ahamed i in. 2021; Kavosi i in. 2018; Muller i in. 2008; Patlolla, Knighten, i Tchounwou 2010). Obecnie istnieją również technologie komputerowe i metody symulacyjne, pozwalające badać oddziaływania nanorurek węglowych z biomolekułami (Madannejad i in. 2019).

Kolejnym wyzwaniem, związanym ze stosowaniem nanorurek, jest uzyskanie dobrych dyspersji CNTs w rozpuszczalnikach, a zwłaszcza w wodzie. Silna hydrofobowość CNTs czyni je nie tylko trudnymi do oddzielenia w rozpuszczalniku, ale także do stabilizacji zawiesiny. Same nanorurki są nierozpuszczalne w wodnych roztworach i chemicznie obojętne, dlatego w takiej formie nie nadają się do wykorzystania w zastosowaniach biologicznych lub medycznych. Naukowcy, aby przezwyciężyć ten problem modyfikują powierzchnię nanorurek przez funkcjonalizację za pomocą różnych cząsteczek hydrofilowych i substancji chemicznych, które poprawiają rozpuszczalność w wodzie, biokompatybilność CNTs i także wpływają na zmniejszenie ich toksyczności (He i in. 2013).

Procedurę funkcjonalizacji nanorurek węglowych można podzielić na dwa główne podejścia, w zależności od charakteru biocząsteczki połączonej z nanorurką węglową, tj. wiązanie kowalencyjne (tworzenie wiązania chemicznego) i wiązanie niekowalencyjne (fizjoadsorpcja) (Zhou, Fang, i Ramasamy 2019). Kowalencyjną funkcjonalizację CNTs na ogół uzyskuje się przez utlenianie mocnymi kwasami (np. HNO_3). Podczas tego procesu na otwartych bokach (końcówkach) oraz w defektach na ściankach bocznych SWCNTs lub MWCNTs tworzą się grupy karboksylowe ($-\text{COOH}$), po czym następuje dalsze kowalencyjne sprzężanie z aminokwasem. Do tworzenia ($-\text{COOH}$) na ściankach bocznych CNTs stosuje się zwykle cykloaddycję nitrenową, arylowanie solami diazoniowymi lub 1,3-dipolarną cykloaddycję (Zhang, Bai, i Yan 2010). Funkcjonalizację niekowalencyjną CNTs można przeprowadzić przez powlekanie CNTs cząsteczkami amfifilowego środka powierzchniowo czynnego lub polimerami (glikolem polietylenowym). Duża aromatyczna hydrofobowa powierzchnia nanorurek węglowych czyni je idealnymi partnerami dla niekowalencyjnych oddziaływań z odpowiednimi cząsteczkami komplementarnymi i makrobiocząsteczkami (DNA). Te interakcje mogą mieć miejsce zarówno wewnątrz, jak i na zewnątrz CNT. Po funkcjonalizacji CNTs stają się hydrofilowe i gotowe do połączenia z lekami lub biocząsteczkami (genami, DNA, białkami, enzymami, bioczynnikami itp.) w celu

dostarczenia ich do docelowych komórek lub narządów (He i in. 2013; Schroeder i in. 2019; Sireesha i in. 2018).

Kolejnym czynnikiem rozpatrywanym pod względem wpływu na toksyczność nanorurek węglowych jest ich stan agregacji. Wick i wsp. na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzili, że im bardziej zaglomerowane CNTs tym silniejszy efekt ich toksyczności. W swych badaniach toksyczne działanie dobrze zdyspergowanych CNTs porównywali z konwencjonalnie oczyszczonymi, podobnymi do liny aglomerowanymi CNTs i azbestem jako odniesieniem. Podczas gdy zawieszona wiązka CNTs była mniej toksyczna niż azbest, aglomeraty przypominające sznury wywoływały bardziej wyraźne efekty toksyczne niż włókna azbestu w tych samych stężeniach. (Wick i in. 2007). Funkcjonalizacja nanorurek może modyfikować tendencję nanorurek do aglomeracji (Jang i Hwang 2018). Kilka badań wykazało, że funkcjonalizowanie CNTs zwiększa ich stabilność w środowisku wodnym i zmniejsza ich aglomerację. Lee i współpracownicy zmierzili stabilność dyspersji czystych i powierzchniowo zmodyfikowanych CNTs, a wyniki wykazały, że CNTs zmodyfikowane grupami karboksylowymi znacznie zwiększyły dyspergowalność w rozpuszczalnikach polarnych (Lee i in. 2007). Uo i wsp. wykazali, że funkcjonalizacja CNTs zapobiega aglomeracji i zmienia toksyczne działanie na różne organizmy (Uo i in. 2011). Przeprowadzone *in vivo* badania wykazały, że MWCNTs przy wysokim stopniu aglomeracji, akumulują się w takich narządach jak płuca czy wątroba i przyczyniają się do powstania reakcji zapalnych (Qu i in. 2009). Z kolei badania przeprowadzone przez Liu i wsp. zaprzeczyły powyższemu wnioskowi. Naukowcy ci dowiedli, że właściwości toksyczne nanorurek są tym silniejsze im mniejsza ich agregacja. Według nich zwiększenie rozproszenia nanorurek powoduje ułatwienie i zwiększenie kontaktu z komórkami (Liu i in. 2014).

Toksyczność nanorurek węglowych jest głównym problemem związanym z ich zastosowaniem przede wszystkim w obszarach diagnostycznych czy terapeutycznych, ale także w pozostałych dziedzinach ich wykorzystania. Toksyczność nanorurek jak już wspomniano jest determinowana różnymi czynnikami, w tym czystością, ugrupowaniami funkcyjnymi, wymiarem, a także stężeniem. Zarówno badania *in vivo* jak i *in vitro* potwierdziły, że CNTs mogą wywoływać efekty toksyczne. Jest wiele badań dotyczących toksyczności CNTs z wykorzystaniem modeli zwierzęcych. W zależności od dawek CNTs, niektóre badania wykazały przewlekłe zapalenie płuc (Delorme i in. 2012; Murray i in. 2012), przemijające zapalenie (Han, Andrews, i Gairola 2010) i brak zapalenia (Morimoto, Hirohashi, i Kobayashi 2012). Potwierdzono, że CNTs mogą powodować

toksyczność sercowo-naczyniową (Helfenstein i in. 2008) i zwiększać podatność na choroby sercowo-naczyniowe, takie jak niedokrwienie (Urankar i in. 2012), a także wzrost częstości akcji serca w spoczynku (Hosseinpour i in. 2016). Bardzo niską neurotoksyczność CNTs zaobserwowali Chen i wsp. (Chen i Hsiue 2013), podczas gdy Gholamine i wsp. stwierdzili, że w zależności od rodzaju CNTs, mogą one powodować neurotoksyczność wraz z depresją lub lękiem (Gholamine i in. 2017). Wykazano, że wysokie dawki CNTs powodują zapalenie wątroby i śledziony, ale są one stosunkowo bezpieczne w niższych dawkach (Liang, Yin, i Zhang 2010). Badano również toksyczność MWCNTs dla śledziony *in vivo* i nie zaobserwowano żadnych oznak toksyczności w śledzionie nawet przy wysokich dawkach CNTs (Deng i in. 2009).

Chociaż CNTs są wysoce obiecującymi nanomateriałami, ich wpływ na zdrowie ludzi jest słabo poznane. Ponadto zauważono sprzeczne wyniki z powodu stosowania różnych typów CNTs, różnych metod oceny, a nawet różnych warunków ekspozycji. Chociaż opublikowano liczne dane eksperymentalne związane z toksycznością CNTs na poziomie molekularnym, komórkowym i całych zwierząt, wyniki są często sprzeczne. Dlatego potrzebne są kolejne badania w celu dogłębnego zrozumienia kinetyki toksykologicznej CNTs, oceny ryzyka i minimalizowania niepożądanego wpływu na zdrowie ludzkie i środowisko (Chen i in. 2018; Mohanta i in. 2019).

3.3. Biologiczne zastosowania nanorurek węglowych

Pierwsze doniesienia o biologicznym zastosowaniu nanorurek węglowych miały miejsce początkiem XXI wieku. Po tym nastąpił boom w zainteresowaniach naukowych związanych z wykorzystaniem CNTs w biomedycynie, w szczególności biodetekcji, diagnostyce i terapii. Było to ułatwione dzięki doskonałej zdolności CNTs do działania jako nośniki cząsteczek różnego pochodzenia, w tym białek, DNA/RNA, enzymów i leków (Guo i in. 2017). Oprócz udowodnionych zdolności dostarczania wykazano również, że CNTs są zdolne do skutecznego omijania bariery krwi-tkanki i penetracji komórek (He i in. 2013). Odkrycia te skłoniły do badań poświęconych rozwojowi platform dostarczania leków opartych na CNTs (Li i in. 2019; Yu i in. 2018). Poniżej omówiono postępy i główne dziedziny biomedycznego zastosowania CNTs w oparciu o opublikowane publikacje naukowe.

Głównym i początkowym celem badawczym zastosowania nanorurek węglowych w biologii jest biodetekcja. Ponieważ wczesna diagnostyka jest kluczowym punktem

skutecznego leczenia, doskonalenie metod wykrywania jest szczególnie istotne. Analiza biomarkerów *in vitro* jest już możliwa z dużą dokładnością dzięki wykrywającym kompleksom immunologicznym, ale może być czasochłonna, a także wymagać dużych ilości próbek biologicznych przy stosowaniu klasycznych strategii dawkowania. Takie badania wymagają często również drogiego sprzętu i dedykowanych laboratoriów o długim czasie realizacji. Dlatego czujniki oparte na CNTs oferują atrakcyjne cechy mobilności i opłacalności w diagnostyce. Ze względu na ich właściwości elektroniczne kilka zespołów przebadło wykorzystanie CNT jako kluczowego elementu czujników elektrochemicznych i opracowało różnego rodzaju bioczujniki na bazie nanorurek. Zaproponowano CNTs jako element wykrywający do wykrywania i monitorowania kilku chorób, zwłaszcza cukrzycy, ale także infekcji bakteryjnych. Na przykład Punbusayakul i wsp. zastosowali nanorurki do elektrochemicznego monitorowania kompleksów immunologicznych do wykrywania salmonelli, skracając tym samym czas wykrywania i ułatwiając przygotowanie próbki w porównaniu z istniejącymi metodami (Punbusayakul i in. 2013).

Zribi i wsp. zbudowali platformę zmultipleksowaną mikroprzepływowo z czujnikami elektrochemicznymi, opartymi na nanorurkach węglowych do wykrywania patogennego wirusowego DNA wirusa zapalenia wątroby typu C i genomowego DNA *Mycobacterium tuberculosis*. Takie urządzenie może służyć jako punkt do wielocelowej diagnostyki różnych infekcji w szpitalach. (Zribi i in. 2016).

Palisoc i wsp. opracowali wysoce czuły nanoczujnik z zakotwiczonymi nanokompozytami jako interfejs do przenoszenia elektronów. Zastosowane tu nanokompozyty to nanocząstki srebra i MWCNTs. Czujnik został wykorzystany do wykrywania metali ciężkich, takich jak ołów i kadm, w próbkach roślinnych. Opracowany czujnik ma możliwość wykrywania śladowych ilości metali ciężkich w rzeczywistych próbkach (Palisoc i in. 2018).

Shahrokhian i współpracownicy opracowali prostą platformę opartą na przełączniku oligonukleotydowym typu spinka do włosów i wielościennych nanorurkach węglowych do ultraczułego wykrywania określonych sekwencji DNA. Autorzy zastosowali oddziaływanie jednoniciowego DNA z MWCNT w celu wytworzenia elektrochemicznego bioczujnika DNA. Bioczujnik wykazał dobry zakres korelacji liniowej dla modelowego docelowego DNA, umożliwiając w ten sposób stabilne i czułe wykrywanie specyficznego dla sekwencji, niekomplementarnego i niedopasowanego

DNA we wczesnej diagnostyce nowotworów i w celu wykrywania mutacji genów (Shahrokhian, Salimian, i Reza Kalhor 2016).

Systemy czujników opartych na nanorurkach węglowych były również aktywnie badane pod kątem innych możliwych zastosowań (Anzar i in. 2020; Joshi, Mishra, i Narayan 2021; Schroeder i in. 2019), w tym między innymi wykrywania glukozy (Taguchi i in. 2014), pestycydów (Deo i in. 2005), cholesterolu (Narwal i in. 2019) czy do zastosowań w przemyśle spożywczym w celu monitorowania dojrzałości żywności i zapobiegania jej psuciu (Zhu i in. 2017).

Nanorurki węglowe są również wykorzystywane do określonego, celowego dostarczania leku, jego kontrolowanego uwalniania i przy leczeniu nowotworów. Ukierunkowane dostarczanie leku polega na podawaniu terapeutycznego środka leczniczego do określonego miejsca przez dłuższy czas. Nanorurki węglowe zaczęto testować w tym celu ze względu na ich hydrofobowy charakter, który pozwala na dłuższe pozostawanie CNTs w układzie krążenia. CNTs są wykorzystywane do ukierunkowanego i kontrolowanego dostarczania leków dzięki zmiennym bodźcom, które można kontrolować za pomocą nanorurek węglowych, takich jak bodźce magnetyczne, bodźce elektryczne, zmiana temperatury i kilka innych. Nanorurki węglowe pełnią rolę nośnika różnych biomolekuł, także takich jak białka, DNA, RNA, lektyny. Transport leków przy wykorzystaniu CNTs jest szeroko analizowany w badaniach dotyczących nowych metod walki z nowotworami (Anzar i in. 2020).

Badania nad CNT jako nośnikiem leków badano m.in. przy użyciu mangiferyny (MF), stanowiącej związek fitochemiczny, który może pozytywnie wpływać na leczenie takich chorób jak cukrzyca, infekcje wirusowe i nowotwory. Przebadano układy złożone z nanorurek funkcjonalizowanych glikolem polietylenowym (PEG), sprzężonych z MF pod kątem ich skuteczności przeciwko komórkom ludzkiego raka mózgu. Podczas, gdy uwalnianie zwykłego leku MF przy pH 5,6 i 7,4 odnotowano jako 74% i 59%, te wartości dla sprzężonego MF z CNT-PEG zostały zmniejszone odpowiednio do 59% i 50%. Ponieważ ilość uwalnianego leku była rejestrowana przy wyższych wartościach dla pH 5,6 niż 7,4, strategia zależna od pH może celować w komórki rakowe, które mają wewnątrz kwasową naturę. Dane z cytometrii przepływowej wykazały również około 55% apoptozę dla sprzężonego MF z CNT-PEG w porównaniu z 21% dla zwykłego MF wobec komórek (Harsha i in. 2019).

Kolejne badania z wykorzystaniem CNT obejmowały wykorzystanie doksorubicyny (DOX), która jest szeroko stosowana jako lek chemioterapeutyczny. DOX

ma jednak liczne wady jak nieodwracalne skutki uboczne, niska zdolność do przekraczania barier biologicznych i nieodwracalna toksyczność (Pugazhendhi i in. 2018). Stąd też pomysł na wykorzystanie CNT jako sposobu transportu tego leku. Yan i wsp. podczas swych badań opracowali nowy system aktywnego celowania, reagujący na zmiany pH do dostarczania DOX oparty na nanorurkach zmodyfikowanych kwasem foliowym i zawierających DOX, który wykazywał wysokie „obciążenie” lekiem oraz wydajność enkapsulacji sięgającą 70.4%. W swych badaniach wykazali silniejsze działanie przeciwnowotworowe zastosowanych koniugatów niż wolna DOX, a badania *in vivo* potwierdziły, że skutki uboczne DOX takie jak kardiotoxyczność i akumulacja w nerkach zostały znacznie zmniejszone w obecności nanokompleksów DOX/CNT (Yan i in. 2018).

Jeyamohan i wsp. wykorzystali efekt fototermiczny jednościennych nanorurek węglowych w połączeniu z doksorubicyną do eliminacji komórek raka piersi. Naukowcy wyprodukowali jednościenne CNTs (sprężone z kwasem foliowym), które zostały poddane biofunkcjonalizacji glikolem polietylenowym i załadowane doksorubicyną. Dane z badań wykazały, że doksorubicyna wiąże się przy pH fizjologicznym (pH 7.4) i uwalniana jest tylko przy niższym pH (pH 4.0-5.0), które jest typowe dla środowiska guza. Pod wpływem naświetlania laserem zaobserwowano śmierć komórek rakowych w wyniku ablacji termicznej wywołanej przez CNTs. Autorzy doszli do wniosku, że proponowany nanosystem łączący laser, lek i CNT jest obiecującą metodą terapeutyczną o wysokiej skuteczności i bezpieczeństwie leczenia nowotworów (Jeyamohan i in. 2013). Podobne badania i wnioski postawili Karimi i wsp., którzy w swych badaniach wykorzystali inny lek przeciwnowotworowy, metotreksat (Karimi i in. 2019). Zhang i wsp. również skonstruowali nanosystem z wykorzystaniem CNT i gemcytabiny do zbadania możliwości leczenia raka za pomocą chemio- i fototermoterapii. Zaproponowany układ był w stanie skutecznie penetrować komórki rakowe i tłumić ich żywotność przy wykorzystaniu promieniowania laserowego w bliskiej podczerwieni (Zhang i in. 2018).

Saeednia i wsp. stworzyli nowy termoczuły i wstrzykiwalny hybrydowy hydrożel z nanorurek węglowych do kontrolowanego uwalniania metotreksatu (MTX), stosowanego do leczenia nowotworów złośliwych. Obecność CNTs w tym hydrożelu miała kilka istotnych zalet. Hydrożel zawierający CNTs nie wykazywał toksyczności wobec komórek. CNTs w hydrożelach skutecznie zwiększały działanie przeciwnowotworowe MTX i hamowały wzrost guza. Kolejną zaletą było to, że CNTs

odgrywały ważną rolę w zwiększaniu szybkości pęcznienia i degradacji hydrożelu. MTX był uwalniany z hydrożelu-CNT wolniej i w sposób bardziej zrównoważony dzięki dodaniu CNTs do hydrożeli (Saeednia i in. 2019).

Cennym źródłem informacji na temat procesu uwalniania i dostarczania leku za pomocą nanorurek węglowych są także teoretyczne badania oparte na symulacjach dynamiki molekularnej. Grupa badawcza Pańczyka sprawdziła między innymi zastosowanie koabsorpcji dokсорubicyny z różnymi cząsteczkami barwników na lub w nanorurkach węglowych jako systemu dostarczania leków. Główną ideą było wykorzystanie zmiany rozkładu zaadsorbowanych cząsteczek w zależności od zmiany pH z środowiska obojętnego na kwaśne, odpowiadające typowemu pH dla komórek nowotworowych (pH~5.5). Stwierdzono, że układ z wykorzystaniem czerwieni obojętnej może służyć do kontrolowanego uwalniania dokсорubicyny z wykorzystaniem zmian pH i dostarczania jej do kwaśnego środowiska tkanek nowotworowych (Panczyk, Wolski, i Łajtar 2016). Przebadano również podobne układy do powyższych, ale z sfunekjonalizowanymi nanorurkami za pomocą łańcuchów glikolu polietylenowego. Na podstawie tych badań stwierdzono, że takie układy nadają się jako nośniki dokсорubicyny, jednakże jej uwalnianie z nanorurki było blokowane kinetycznie (Wolski, Nieszporek, i Panczyk 2017). Badano także kompleks złożony z nanorurek węglowych, dokсорubicyny i czerwieni Kongo. Przedstawione wyniki wskazują, że obniżenie pH wpłynęło na strukturę i stabilność analizowanych układów i zapewniło skuteczne uwalnianie leku. Zastosowany kompleks spełnia wymagania do potencjalnego zastosowania jako nośnika leków, dzięki zastosowaniu którego można ograniczyć skutki uboczne rozpraszania leku po całym organizmie i zwiększyć farmakologiczną skuteczność leków (Jagusiak i in. 2020). Analizowano także układy dostarczania i uwalniania DOX za pomocą platform utworzonych z połączenia funkcjonalizowanych guaniną nanorurek węglowych i krótkich fragmentów DNA bogatych w cytozynę, formujących się w odpowiednich warunkach w struktury i-motifu. Obecność struktur i-motifu badano pod kątem ich wykorzystania jako mechanizmu zamykania i otwierania pojemnika na cząsteczki leku tj. nanorurki. Wykorzystanie nici DNA zakładało również modulowanie przez ich obecność właściwości interkalacji leku w funkcji pH. Stwierdzono, że dokсорubicyna nie jest skutecznie blokowana we wnętrzu nanorurek przez użyte oligonukleotydy DNA. Z drugiej strony odkryto, że cząsteczki DOX i i-motif skutecznie interkalują się nawzajem i silnie wiążą się z CNT, dzięki czemu układy te mogą działać jako systemy dostarczania DOX przy kontrolowanym pH do miejsc guza

(Wolski, Nieszporek, i Panczyk 2020). Kontynuując badania wyżej wspomnianego układu przeprowadzono podobne rozważania, ale w nich bogate w cytozynę fragmenty DNA były kowalencyjnie związane z nanorurką. To działanie pozwoliło na skuteczne blokowanie cząsteczek DOX przed ich niekontrolowanym uwalnianiem w pH neutralnym, ale mechanizm tego procesu okazał się nieco inny niż przewidywany we wnioskach we wcześniejszej publikacji. Łańcuchy DNA bogate w cytozynę przy pH neutralnym miały tendencję do oddzielania się od siebie co powodowało, że wejście do CNT było otwarte i cząsteczki DOX były w stanie naturalnie dyfundować z nanorurki. Jednakże uciekające cząsteczki DOX zaczęły działać jako spinacz dla łańcuchów DNA, ulegając interkalacji w łańcuchach tworzących i-motif (Wolski, Nieszporek, i Panczyk 2021).

Podsumowując, CNTs zastosowane w powyższych badaniach umożliwiły wchłanianie i wnikanie do komórek środków leczniczych, przeciwnowotworowych o szerokim zastosowaniu, takich jak MTX czy DOX, zmniejszenie toksyczności ogólnoustrojowej tych leków i w konsekwencji zapobieganie wpływowi ich na normalne komórki, a także kontrolowane i przedłużone uwalnianie leku w komórkach nowotworowych przez długi czas, zwiększając wpływ na komórki rakowe.

Zdolność nanorurek węglowych do przekształcania promieniowania bliskiej podczerwieni (NIR) w ciepło przyciągnęła uwagę badaczy pod kątem możliwości jej zastosowania w biomedycynie, w szczególności do wywoływania efektu termicznego na komórkach i tkankach (Singh i Torti 2013). Murali i wsp. zaproponowali zastosowanie jednościennych CNTs ukierunkowanych na foliany w różnych stężeniach do ablacji komórek rakowych pod wpływem napromieniowywania światłem NIR. Stwierdzono, że stężenie CNTs wynoszące ~13 pg/komórkę było wystarczające do zabicia 90% komórek, podczas gdy zmniejszenie dawki CNTs prowadziło do spadku skuteczności zabijania komórek (Murali i in. 2016).

Virani i wsp. zastosowali jednościenne CNTs funkcjonalizowane aneksyną V i fosfatydyloseryną do fototermicznej ablacji raka pęcherza na modelu mysim. CNTs podawano w bardzo niskiej dawce (0.1 mg na kg), a następnie myszy (z guzami pęcherza mysiego) poddano działaniu światła NIR przez tylko 30 sekund. Wyniki wykazały całkowitą eliminację guzów u zwierząt poddanych leczeniu. Autorzy badań donieśli o braku CNTs w organizmie zwierzęcia po 116 dniach, po którym nastąpiło leczenie, które wskazuje na zerową toksyczność CNTs (Virani i in. 2018). Badania te wskazały na możliwość wykorzystania CNTs do ogrzewania głęboko położonych guzów. Takie

podejście stanowi podstawę do opracowania nowych metod teranostycznych- przyszłej personalizowanej medycyny precyzyjnej, które mogą pomóc w wykrywaniu, wizualizacji i leczeniu nowotworów bez traumatycznych konsekwencji dla pacjentów.

Nanorurki węglowe są wykorzystywane także w inżynierii tkankowej. Dyscyplina ta bada możliwości zastąpienia uszkodzonych, niefunkcjonalnych lub zdegenerowanych tkanek biologicznych za pomocą sztucznych biomateriałów, które są w stanie w jak największym stopniu naśladować środowisko naturalne. CNTs dzięki swoim właściwościom jak wysoka wytrzymałość mechaniczna, elastyczność i dobre przewodnictwo cieplne i elektryczne, są szeroko badane jako kluczowe komponenty innowacyjnych materiałów w inżynierii tkankowej. Wykazano, że CNTs są w pełni biokompatybilne z osteocytami i komórkami kostnymi (Zanello i in. 2006). MWCNTs sąsiadujące z kością wywołują niewielką miejscową reakcję zapalną, wykazują wysoką kompatybilność z tkanką kostną, umożliwiają naprawę kości, integrują się z nową kością i przyspieszają tworzenie kości stymulowane przez rekombinowane ludzkie białko morfogenetyczne kości-2 (rhBMP-2) (Usui i in. 2008). Wykazano, że CNTs wspierają nukleację hydroksyapatytu zgodnie z ich miejscami defektu (Liao i in. 2007). Co więcej, CNTs mogą również hamować osteoklastyczną resorpcję kości *in vivo* (Narita i in. 2009).

CNTs są również intensywnie badane pod kątem ich zastosowania w inżynierii tkanki nerwowej (Choi i in. 2016; Redondo-Gómez i in. 2020). CNTs posiadają cechy (wysokie powinowactwo wiązania, doskonałe przewodnictwo elektryczne) niezbędne do rozwoju neuroimplantów przeznaczonych do wzrostu i naprawy neuronów. Singh i wsp. utworzyli rusztowanie z kompozytu chitynowego i nanorurek węglowych, które poddali obróbce plazmowej. Zaproponowana nanoplatforma wykazała bardzo dobrą adhezję neuronów, wsparcie funkcji synaptycznych neuronów i poprawę przewodnictwa elektrycznego (Singh i in. 2016).

Podejmowane są również próby zastosowania CNTs do badań nad komórkami macierzystymi. Wykazano, że CNTs mogą poprawiać różnicowanie w komórkach macierzystych i mogą być formułowane w celu tworzenia cech takich jak naturalne tkanki neurologiczne. W badaniu wykorzystano hydrofobowe i hydrofilowe CNTs impregnowane neuronalnymi komórkami progenitorowymi strefy podkomorowej, aby wspomóc proces naprawy uszkodzonej tkanki nerwowej w mysim modelu po udarze. Badania wykazały, że hydrofobowe CNTs mogą poprawić stan zdrowia szczurów i ich tkanki nerwowej w porównaniu z grupą kontrolną (bez leczenia) (Moon i in. 2012).

W dziedzinie inżynierii tkankowej przeprowadzono również badania nad bioaktywnym materiałem kompozytowym, wykonanym z hydroksyapatytu i MWCNTs wypełnionych żelazem, do poprawy tworzenia tkanki kostnej w celu opracowania implantów, które wytrzymają ortopedyczne obciążenia mechaniczne. Otrzymane wyniki z badania tego kompozytu wskazują na możliwość zastosowania go w bioinżynierii tkanki kostnej do wypełniania ubytków kostnych o różnej geometrii z funkcją przedłużonego uwalniania leku (Sukhodub i in. 2018).

Inną dziedziną związaną z medycyną, w której również stosowane są nanorurki węglowe, są urządzenia LOC. Właściwości CNTs pozwalają na budowę małych urządzeń mikroprzepływowych, co prowadzi do miniaturyzacji analiz. Przy wymiarach od zaledwie milimetrów do kilku centymetrów kwadratowych urządzenia te nazywane są *lab-on-a-chip* (LOC). Urządzenie LOC wymaga multidyscyplinarnego wkładu z różnych dziedzin i oferuje automatyzację, przenośność i wysokowydajne badania przesiewowe, a także znaczne zmniejszenie zużycia odczynników. Obecnie CNT może odgrywać istotną rolę w wielu częściach LOC, takich jak kanały membranowe, czujniki i ściany kanałów (Ghasemi i in. 2017; Karimi i in. 2016).

Jednościenne nanorurki węglowe zostały uznane za wiodącego kandydata na nanourządzenie, zdolne do oddziaływania z kwasami nukleinowymi. Zheng i wsp. wykazali, że konkretna sekwencja pojedynczej nici ssDNA samoorganizuje się w strukturę spiralną wokół poszczególnych nanorurek węglowych (Zheng i in. 2003). Z kolei fragment dwuniciowego (ds) DNA owinięty na powierzchni CNT może służyć jako czujniki w żywych komórkach w oparciu o przejście drugorzędowej struktury DNA z natywnej, prawoskrętnej formy „B” do alternatywnej, lewoskrętnej formy Z (Heller i in. 2006). Prowadzone były również badania dotyczące interakcji nanorurek węglowych z telomeryczną częścią DNA. Badano serie interakcji DNA z CNT i stwierdzono między innymi, że jednościenne nanorurki węglowe mogą selektywnie stabilizować ludzki telomeryczny odcinek DNA z i-motifem oraz indukować tworzenie struktury i-motif poprzez wiązanie się z głównym rowkiem na końcu 5' w warunkach fizjologicznych (Li i in. 2006; Peng i in. 2009; Zhao i in. 2009), a także w warunkach zagęszczenia molekularnego (Zhao i in. 2008). Dalsze badania wskazują, że nanorurki nie stabilizują G-quadrupleksu i mogą powodować dysocjację ludzkiego dupleksu telomerowego poprzez tworzenie i-motifu i G-quadrupleksu. To sprawia, że jednościenne nanorurki są pierwszym selektywnym środkiem indukującym i stabilizującym i-motif i odpowiednią sondą do badania funkcji biologicznej i-motifu zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* (Chen i in.

2012). Pomimo przeprowadzonych badań nie jest w pełni poznany mechanizm stabilizacji i-motifu w pH neutralnym, co wymaga dalszych wyjaśnień i zainteresowania tym procesem.

Nanorurki węglowe mają duży potencjał znalezienia unikalnych zastosowań w wielu dziedzinach, w tym medycynie. Lecz z drugiej strony wciąż pozostaje wiele istotnych kwestii wymagających rozwiązania, przede wszystkim chodzi o ich toksyczność oraz usuwanie z organizmu, przez co nadal wymagane są dalsze szczegółowe badania, aby promować bezpieczne użycie CNTs i zapewnić przy ich użyciu wiele sukcesów klinicznych.

4. Metodyka

4.1. Dynamika molekularna

Dynamika molekularna (ang. *Molecular Dynamics*, MD) stanowi metodę obliczeniową opartą na symulacjach komputerowych, pozwalających na badanie zachowania analizowanych struktur na poziomie atomowym i śledzenie ich dynamiki z niezwykłą szczegółowością pozwalającą na przewidywanie stanu układu w wybranym momencie. Technika ta należy do deterministycznej grupy metod obliczeniowych. Oparta jest na zdefiniowanym opisie wszystkich atomów tworzących rozważany układ, ich pozycji, działających na nie sił i badaniu ich zachowania w funkcji czasu z możliwością śledzenia ruchu poszczególnych atomów rozważanego układu. Technika ta umożliwia przeprowadzenie symulacji komputerowych układów złożonych z pojedynczych atomów, cząsteczek wieloatomowych jak również układów wielocząsteczkowych. Symulacje układów zawierających około 50 000–100 000 atomów są obecnie rutynowe, a symulacje około 500 000 atomów są powszechne, gdy dostępne są odpowiednie urządzenia komputerowe. Na podstawie symulacji możliwe jest obserwowanie zjawisk, których nie da się dostrzec podczas trwania laboratoryjnego eksperymentu, przez wzgląd na rozdzielczość obserwacji i skalę czasową. Symulacje MD umożliwiają wyznaczenie trajektorii ruchu układu złożonego z N cząstek w czasie. Z trajektorii, zgodnie z hipotezą ergodyczną można wyznaczyć średnie wartości właściwości układu mikroskopowego uśrednione po czasie, prawidłowo odpowiadające mierzonym doświadczalnie wartościom funkcji termodynamicznych układu makroskopowego. Symulacja MD stanowi potężne narzędzie do potencjalnych zastosowań w różnych dziedzinach badawczych, w tym w fizyce, chemii, biologii, bioinżynierii i medycynie. Ta metoda badawcza wykorzystywana jest m.in. do badań struktury materiałów dotyczących zarówno ich właściwości jak i fizycznych procesów w nich zachodzących jak np. przewodnictwa cieplnego. Symulacje MD stanowią ważne narzędzie badań do zdobywania informacji na temat wielu biomolekuł w tym białek, cukrów (Karplus i McCammon 2002) czy kwasów nukleinowych (Romanowska, Reuter, i Trylska 2013), a także ich interakcji z nanorurkami węglowymi (Werder i in. 2003). Symulacje wykorzystywane są również przy projektowaniu nowych leków oraz metod ich dostarczenia (De Vivo i in. 2016; Han i in. 2019; Hospital i in. 2015).

Podstawa dynamiki molekularnej oparta jest na numerycznym rozwiązywaniu klasycznych równań ruchu zgodnych z II zasadą dynamiki Newtona, w których interakcje pomiędzy elementami układu (atomami, molekułami) opisywane są za pomocą odpowiedniego potencjału. Symulacje rozpoczyna się od przygotowania teoretycznego układu molekularnego na podstawie danych z magnetycznego rezonansu jądrowego, krystalograficznych lub danych z modelowania homologicznego. Następnie nadaje się elementom układu początkowe położenia i prędkości. W kolejnym kroku na podstawie zadanych potencjałów oddziaływań U , oblicza się powstające pomiędzy poszczególnymi atomami siły, zgodnie ze wzorem: $F = -\nabla U$. Przy opisie oddziaływań w badanym układzie wynikających z interakcji pomiędzy związanymi i niezwiązanymi atomami, uwzględnia się m.in. oddziaływania dyspersyjne, elektrostatyczne oraz te wynikające z obecności wiązań chemicznych. Przed rozpoczęciem symulacji określa się jeszcze wiele parametrów charakteryzujących warunki symulacji, w tym np. ciśnienie, temperaturę, krok czasowy dla rozwiązywania równań ruchu, czas trwania symulacji, wymiary pudła symulacyjnego oraz rodzaj rozpuszczalnika. Przeważnie w symulacjach układów biologicznych użytym rozpuszczalnikiem jest woda. Po określeniu parametrów symulacji i obliczeniu początkowych sił działających na każdy z atomów układu, owe pozycje atomów są obliczane poprzez numeryczne całkowanie równań ruchu Newtona dla następnych kroków czasowych. Równania ruchu służą do uzyskiwania kolejnych konfiguracji układu i jego ewolucji w czasie. Proces obliczania sił z jakimi oddziałują na siebie elementy układu i wyznaczanie ich położenia i prędkości powtarza się przez zadaną liczbę kroków symulacji, wynoszącą najczęściej kilka milionów po czym analizuje się otrzymane dane.

Podczas symulacji dynamiką molekularną gromadzone są dane dotyczące atomowego układu na poziomie mikroskopowym takie jak m.in. pozycje i prędkości atomów. Te parametry mikroskopowe są dzięki zastosowaniu mechaniki klasycznej przetwarzane na dane makroskopowe takie jak energia, ciśnienie itp. Wariant rozpatrywanych parametrów makroskopowych zależy od rozpatrywanego statystycznego zespołu termodynamicznego. Symulacje dynamiką molekularną przeprowadza się w warunkach odpowiadających wybranym zespołom statystycznym takim jak: zespół mikrokanoniczny (NVE), w którym ustalona jest stała energia E , objętość V i liczba atomów/ cząsteczek N ; zespół kanoniczny (NVT) gdzie stała jest temperatura T , objętość V i liczba atomów/cząsteczek N czy zespół izotermiczno-izobaryczny (NPT) ze stałą temperaturą T , ciśnieniem P i stałą liczbą atomów/cząsteczek N . Dodatkowo

w odpowiednim zespole statystycznym w celu kontroli ciśnienia czy temperatury można uwzględnić działanie barostatu (w zespole NPT) oraz termostatu (w zespole NVT). Barostat wykorzystuje odpowiedni algorytm w celu kontroli naprężenia i ciśnienia, którego rola polega na automatycznym kontrolowaniu i zmianie objętości w kierunkach najwyższych ciśnień czy naprężeń. Takie działanie pozwala na jakościową kontrolę procesu, gdyż zmiany objętości układu pozwalają na zachowanie początkowo ustalonych parametrów. Działanie algorytmów stosowanych do kontroli temperatury polega z kolei na dodatkowym wprowadzeniu do równania ruchu czynnika skalującego wektory prędkości cząstek. Dzięki kontroli prędkości elementów układu, kontrolujemy energię kinetyczną wyznaczającą temperaturę.

4.2. Pola siłowe

Matematyczne wyrażenie opisujące zależność energii układu od współrzędnych położenia jego cząstek określa tzw. pole siłowe (z ang. *Force Field*, FF). Klasyczne pole siłowe składa się z analitycznej postaci międzyatomowej energii potencjalnej i zestawu parametrów w nich występujących. Parametry te są zwykle uzyskiwane albo na podstawie obliczeń mechaniki kwantowej (*ab initio* lub półempirycznie) albo poprzez dopasowanie do eksperymentalnych danych takich jak NMR, spektroskopia w podczerwieni, dyfrakcja rentgenowska, neutronowa czy elektronowa itp. Cząsteczki definiuje się jako zbiór atomów, które są utrzymywane razem przez proste siły sprężyste, a pole siłowe zastępuje prawdziwy potencjał uproszczonym modelem, obowiązującym w symulowanym układzie. Pole siłowe musi być wystarczająco proste, by obniżyć koszty obliczeniowe, lecz jednocześnie odpowiednio szczegółowe, aby odtworzyć interesujące właściwości badanego układu (Karplus i McCammon 2002).

Całkowita energia potencjalna analizowanego układu jest sumą oddziaływań wiążących wynikających z oddziaływania atomów połączonych ze sobą wiązaniem kowalencyjnym i oddziaływań niewiązących. W skład oddziaływań wiążących wchodzi energia wiązań, kątów oraz kątów dwuściennych (torsyjnych). Atomy w układach oscylują wokół położenia równowagowych, przez co łączące je wiązania chemiczne nie mają stałej długości, co wpływa na zmianę ich energii w wyniku oddziaływań rozciągających. Podobnie jak przy długości wiązania, także kąty pomiędzy wiązaniami trzech kolejnych atomów nie są stałe i zmieniają się wokół wartości odpowiadającej stanowi równowagi, przyczyniając się do zmiany energii poprzez międzyatomowe

oddziaływania zginające. Zmianie ulega także energia wiązań kątów torsyjnych, związana z rotacją dookoła wiązań, charakteryzująca elastyczność molekuł. Z kolei oddziaływania niewiążące, stanowią sumę oddziaływań van der Waalsa, potencjału elektrostatycznego Coulomba i wiązań wodorowych (Oostenbrink i in. 2004).

Z polem siłowym związany jest parametr nazywany promieniem odcięcia (ang. *cutoff*). Ze względu na nieskończony zasięg potencjału przyjmuje się, że gdy odległość pomiędzy atomami przewyższa ustalony promień odcięcia to siła ich oddziaływania jest wówczas zerowa. Parametr ten uwzględniany jest po to by obliczenia nie były zbyt kosztowne i aby podczas obliczeń energii oddziaływań nie uwzględniać każdej możliwej pary atomów. Pola siłowe umożliwiają przeprowadzenie symulacji MD dużych układów biomolekularnych. Do powszechnie używanych pól siłowych przeznaczonych do badań różnego typu układów, różniących się stopniem skomplikowania zaliczamy m.in. następujące pola siłowe: AMBER (Weiner i in. 1984), GROMOS (Christen i in. 2005), CHARMM (Brooks i in. 2009).

4.3. Pole siłowe AMBER

Pole siłowe AMBER (z ang. *Assisted Model Building with Energy Refinement*) opracowane przez grupę Petera Kollmana jest to szeroko stosowana rodzina pól siłowych o następującej ogólnej postaci matematycznej potencjału oddziaływań U_{pair} :

$$\begin{aligned}
 U_{pair} = & \sum_{bonds} K_r (r - r_{eq})^2 + \sum_{angles} K_\theta (\theta - \theta_{eq})^2 \\
 & + \sum_{dihedrals} \frac{V_n}{2} (1 - \cos(n\phi - \gamma)) + \sum_{i < j} \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{r_{ij}} \right)
 \end{aligned}
 \tag{4.1}$$

gdzie: r_{ij} jest odległością pomiędzy dwoma atomami, q_i, q_j ładunkami cząstkowymi tych atomów, A_{ij}, B_{ij} parametrami Lennard-Jonesa dla pary atomów, K_r, K_θ, V_n to stałe siłowe dla potencjałów harmonicznym wiązań i kątów oraz kątów dwuściennych które dodatkowo zawierają parametry określające krotność n oraz fazę γ potencjału.

Aby użyć pola siłowego AMBER konieczne jest wyznaczenie wartości wszystkich tych parametrów i tego typu zestawy istnieją dla wielu grup cząsteczek chemicznych. Są one szczegółowo opisane w dokumentacji oprogramowania AMBER. Każdy z tych zestawów parametrów tworzy inną modyfikację pola AMBER, mającą swoją nazwę i zawierającą parametry dla określonych typów cząsteczek. Do tych

modyfikacji pola siłowego AMBER, zalicza się m.in. modyfikację bsc1 i OL15, które zostały opracowane w celu poprawy dokładności symulacji dynamiki molekularnej dwuniciowego DNA w długich skalach czasowych. Obie te modyfikacje są znaczącym ulepszeniem w stosunku do poprzednich wersji pola siłowego bsc0. Lepiej opisują skręt helikalny dla struktur DNA i wykazują lepszą zgodność w porównaniu ze strukturami eksperymentalnymi. Pole siłowe AMBER jest często stosowanym polem ze względu na jego kompatybilność z innymi składnikami badanych układów jak np. nanorurki węglowe (Galindo-Murillo i in. 2016; Ivani i in. 2016). Cenną cechą pola siłowego AMBER są jego właściwości predykcyjne w odniesieniu do niekanonicznych struktur DNA. Mianowicie, struktury typu G-quadruplex oraz i-motif są prawidłowo odtwarzane przez modyfikacje bsc1 oraz OL15 choć nie były one wprost parametryzowane w tym celu.

4.4. Potencjał AIREBO

Potencjał AIREBO (z ang. *Adaptive Intermolecular Reactive Empirical Bond Order*) należy do grupy potencjałów reaktywnych i jest jednym z najbardziej zaawansowanych potencjałów stworzonych do opisu układu atomów węgla i/lub wodoru. Zaletą i cechą potencjału AIREBO jest możliwość szczegółowego modelowania struktury i energii wiązań związków węglowodorowych oraz przewidywanie ich reaktywności uwzględniające tworzenie i zrywanie wiązań w czasie trwania symulacji. Pozwala na modelowanie nanorurki węglowej jako obiektu elastycznego i zachowanie cylindrycznej struktury nanorurki bez dodatkowych więzów. Potencjał ten został stworzony przez grupę badawczą prof. Stuarta w 1999 roku. Powstał on w oparciu o potencjał Brennera, do którego Stuart dodał modyfikację wynikającą z uwzględnienia oddziaływania niewiążącego i oddziaływania torsyjnego związanego z obecnością kąta dwuściennego pomiędzy trzema wiązaniami w grupie czterech atomów (Stuart, Tutein, i Harrison 2000).

Potencjał AIREBO w formie ogólnej przedstawia się jako sumę trzech członów:

$$E^{AIREBO} = \frac{1}{2} \sum_i \sum_{i \neq j} [E_{ij}^{REBO} + E_{ij}^{LJ} + \sum_{k \neq i,j} \sum_{l \neq i,j,k} E_{kijl}^{Torsion}] \quad [4.2]$$

gdzie: E^{REBO} to funkcja pochodząca z potencjału Brennera, E^{LJ} to potencjał Lennarda-Jonesa, E^{tors} to potencjał oddziaływania torsyjnego.

Potencjał REBO, E^{REBO} pozwala na tworzenie się wiązań oraz ich zrywanie w czasie symulacji. Jego postać zaproponował Tersoff (Brenner i in. 2002):

$$E_{ij}^{REBO} = \sum_i \sum_{j>i} [V^R(r_{ij}) - b_{ij}V^A(r_{ij})] \quad [4.3]$$

gdzie V^R i V^A są odpowiednio członem repulsywnym i przyciągającym. Postać członu repulsywnego zaproponował Brenner:

$$V^R(r_{ij}) = w_{ij}(r_{ij})A_{ij}(1 + Q_{ij}/r_{ij})e^{-\alpha_{ij}r_{ij}} \quad [4.4]$$

Część przyciągająca potencjału REBO ma następującą formę:

$$V^A(r_{ij}) = w_{ij}(r_{ij})[B_1e^{-\beta_1r_{ij}} + B_2e^{-\beta_2r_{ij}} + B_3e^{-\beta_3r_{ij}}] \quad [4.5]$$

W równaniach 4.4 i 4.5 A , Q , α , B i β są parametrami dla pary atomów i i j , a ich wartości są stabelaryzowane. Funkcja w_{ij} decyduje o tym, czy należy rozważać oddziaływanie kowalencyjne pomiędzy atomami ij .

Czynnik b_{ij} określa rząd wiązania oraz hybrydyzację atomu węgla. Zależy on w złożony sposób od otoczenia rozpatrywanej pary atomów.

4.5. Niektóre techniki rozszerzonego próbkowania stosowane w dynamice molekularnej

Standardowa dynamika molekularna stała się ważną metodą badawczą, obejmującą układy składające się do milionów atomów. Jednak częsta obecność zróżnicowanych krajobrazów energetycznych, z wieloma wysokoenergetycznymi barierami oddzielającymi różne stany termodynamiczne układu, ogranicza zakres stosowania standardowej dynamiki molekularnej. Występowanie barier energetycznych często nie pozwala na precyzyjne próbkowanie przestrzeni konfiguracyjnej w dostępnym dla konwencjonalnych symulacji czasie. W takim przypadku dokładnie badane są regiony przestrzeni konfiguracyjnej wokół minimum, a znacznie rzadziej obszary o wyższej energii, co prowadzi do uzyskania niepoprawnych wartości energii swobodnej. Dlatego, aby wiarygodnie badać procesy dynamiki molekularnej układów chemicznych lub biologicznych, częstokroć badany proces musi być prowadzony wzdłuż określonego stopnia swobody (tzw. współrzędna reakcji).

W celu poprowadzenia dowolnego układu po wybranej ścieżce, najpierw należy określić odpowiednią współrzędną reakcji. Współrzędna reakcji składa się często z kombinacji parametrów strukturalnych takich jak np. odległości lub kąty między atomami, które opisują postęp reakcji i dlatego mogą być wykorzystane do wymuszania postępu układu. Właściwe próbkowanie układu wzdłuż pożądanej współrzędnej reakcji pozwala na uzyskanie odpowiedniego profilu energii swobodnej, zwanego również

potencjałem średniej siły (ang. *Potential of Mean Force*, PMF), który opisuje jak energia swobodna zmienia się wzdłuż zdefiniowanej współrzędnej reakcji. Z pomocą w uzyskaniu lepszego próbkowania regionów przestrzeni konfiguracyjnej i wyznaczeniu profilu energii swobodnej przychodzi szeroki wachlarz technik rozszerzonego próbkowania (ang. *enhanced sampling*) (Spiwok, Sucur, i Hosek 2015). Do tej grupy technik zalicza się metodę umbrella sampling.

Umbrella sampling jest jedną z szeroko stosowanych metod, która pozwala na określenie profilu energii swobodnej, wyznaczonej na podstawie potencjału średniej siły wzdłuż pewnej współrzędnej reakcji, odpowiadającej za rozróżnienie dwóch stanów termodynamicznych. Przejście układu z jednego stanu termodynamicznego do drugiego wzdłuż współrzędnej reakcji podzielone jest na tzw. okna. W każdym z takich okien przeprowadzona jest oddzielna symulacja MD, w której dodano dodatkowy człon energii do funkcji energii potencjalnej układu. Człon ten ma na celu zmniejszenie odchyłeń współrzędnej reakcji w niewielkim przedziale wokół jej danej wartości. Ma on często postać funkcji harmoniczej. Z wyznaczonych w ten sposób rozkładów współrzędnej reakcji można obliczyć zmianę energii swobodnej w każdym oknie. Okna są następnie łączone za pomocą metody WHAM (ang. *Weighted Histogram Analysis Method*), umożliwiającej uwzględnienie informacji ze wszystkich stanów pośrednich i wyznaczenie na podstawie zebranych danych całkowitego profilu energii swobodnej układu (Kästner 2011; You, Tang, i Chang 2019).

Innym sposobem na obliczenie profilu energii swobodnej jest wykorzystanie sterowanej dynamiki molekularnej (z ang. *Steered Molecular Dynamics*, SMD) oraz nierówności Jarzyńskiego. Jarzyński w 1997 roku, opublikował wybitną pracę (Jarzynski 1997), w której wykazał, że energię swobodną można wyznaczyć na podstawie obliczeń prowadzonych w warunkach odbiegających od równowagi termodynamicznej, zgodnie z tzw. relacją Jarzyńskiego.

$$\Delta F(\lambda) = -\beta^{-1} \ln \langle e^{-\beta W_i(\lambda)} \rangle \quad [4.6.]$$

$\Delta F(\lambda)$ reprezentuje energię swobodną, jako funkcję współrzędnej reakcji λ , $\beta^{-1} = k_B T$, gdzie k_B jest stałą Boltzmanna, a T jest temperaturą układu. W_i reprezentuje pracę potrzebną w celu prowadzenia układu wzdłuż współrzędnej reakcji, a nawiasy oznaczają uśrednianie po wielu różnych trajektoriach startujących z tego samego rozkładu kanonicznego. (Ramírez, Martí, i Roitberg 2016).

Nierówność Jarzyńskiego pokazuje, że dla dowolnego układu napędzanego zewnątrznie ze stanu początkowej równowagi do stanu końcowego, przy dowolnej prędkości, energia swobodna między nimi może być mimo wszystko uzyskana, jeżeli prace wielu indywidualnych trajektorii są uśrednione wykładniczo. Nierówność Jarzyńskiego zapewnia prostą strategię uzyskania profilu energii swobodnej z symulacji sterowanej dynamiki molekularnej. Najpierw do układu dodaje się siłę zewnętrzną, zwykle w postaci potencjału harmonicznego, którego położenie równowagi przesuwa się wzdłuż współrzędnej reakcji z określoną prędkością (v), zgodnie z poniższym równaniem:

$$F(t) = -k(\lambda - \lambda_0 - vt) \quad [4.7]$$

Siła zewnętrzna steruje w ten sposób układem wzdłuż współrzędnej reakcji, przenosząc układ z początkowego do docelowego stanu. Poszczególne sterowane trajektorie rozpoczynają się od konfiguracji równowagowej, a do każdego z nich odpowiedni profil pracy wzdłuż współrzędnej reakcji jest obliczany przez scałkowanie siły zewnętrznej. Na końcu wiele trajektorii jest uśrednianych wykładniczo za pomocą zależności Jarzyńskiego w celu uzyskania odpowiedniego profilu energii swobodnej (Boubeta i in. 2019; Ramírez i in. 2016).

Kolejną metodą, którą można wykorzystać do przyspieszenia próbkowania dowolnego rodzaju symulacji, szczególnie gdy układ zostaje uwięziony w metastabilnych konfiguracjach związanych z lokalnymi minimami energii, utrzymującymi się w typowych skalach czasowych MD jest dynamika molekularna wymiany replik (ang. *Replica Exchange Molecular Dynamics*, REMD). Polega ona na zastosowaniu wielu niezależnych symulacji MD (replik) tego samego układu, równolegle w różnych temperaturach (lub w tej samej temperaturze, ale przy użyciu różnych hamiltonianów) i losowej wymianie pełnego stanu dwóch sąsiadujących replik w regularnych odstępach czasu z określonym prawdopodobieństwem. Dokonuje się wymiany replik jedynie między sąsiednimi replikami, ponieważ prawdopodobieństwo wymiany bardzo szybko spada wraz z różnicą temperatur. Udana wymiany replik powodują przeniesienie badanej struktury między niższą i wyższą temperaturą. Repliki wysokotemperaturowe umożliwiają szybkie przekraczanie barier energetycznych i próbkowanie dodatkowych, rzadkich konfiguracji, których nie można łatwo zaobserwować w konwencjonalnych symulacjach MD w niższej temperaturze (Johnson i in. 2009; Sindhikara, Meng, i Roitberg 2008).

Część badawcza

5. Cele pracy

Chen i wsp. (Chen i in. 2012) wykazali, że stabilizacja struktury i-motif przez karboksylowane CNT prowadzi do supresji aktywności telomerazy, zarówno w badaniach *in vitro* jak i *in vivo* i indukuje otwarcie pętli telomeru. Prowadzi to do uruchomienia mechanizmów odpowiedzi na destrukcję DNA i w efekcie zatrzymania rozwoju komórek. Według Chen'a i wsp. i-motif nie jest bezpośrednio odpowiedzialny za inhibicję telomerazy lecz jego wytworzenie i stabilizacja prowadzi do formowania tetrapleksów guaninowych w komplementarnej, bogatej w guaninę, nici telomerowego DNA. Jednakże podkreślają oni, że szczegółowy mechanizm inhibicji telomerazy przez CNTs oraz wynikające z niego dalsze konsekwencje dla rozwoju komórek nie są całkowicie poznane. Stąd też selektywne oddziaływanie CNTs z ludzkim telomerycznym DNA wymaga dalszych badań. W szczególności, analiza na poziomie molekularnym może dostarczyć szczegółowych informacji na temat natury oddziaływań istniejących w układach CNT-i-motif.

Zatem, badanie oddziaływania jednościennych nanorurek węglowych z telomerycznym i-motifem przy użyciu dynamiki molekularnej było głównym celem niniejszej pracy. Poniższa część rozprawy doktorskiej dotyczy opisu wykonanych badań teoretycznych nad stabilnością niekanonicznych form DNA takich jak G-quadruplex (Gq) oraz i-motif (iM), powstających w telomerowych fragmentach nici DNA bogatych odpowiednio w guaninę i cytozynę oraz struktury, mechanizmu tworzenia i stabilności termodynamicznej kompleksów utworzonych z połączenia w/w form DNA z nanorurkami. Stabilność analizowanych układów rozpatrywano w zależności od pH oraz obecności jednościennych nanorurek węglowych z uwzględnieniem roli takich parametrów jak: rodzaj grup funkcyjnych przyłączonych do CNTs, średnica, długość i chiralność użytych CNTs.

Jako wiodącą metodę zastosowano dynamikę molekularną (MD). Do wielkoskalowych obliczeń równoległych wykorzystywano program LAMMPS, zaś w celu właściwego opisu nanorurki węglowej wykorzystano empiryczne pole siłowe w postaci potencjału AIREBO oraz klasyczne pole siłowe AMBER do opisu składników DNA.

Szczegółowy opis realizacji poszczególnych celów naukowych i zastosowanych w tym celu metod obliczeniowych znajduje się w kolejnych rozdziałach pracy (6-9). Do najważniejszych celów pracy należą:

- I. Określenie warunków stabilności termodynamicznej struktury G-quadrupleksu oraz i-motifu. Wykonanie i analiza procesu rozwijania tych niekanonicznych form DNA w obecności lub braku komplementarnych struktur i innych warunków. Określenie warunków, w jakich i-motif może uzyskać na tyle dużą stabilność termodynamiczną, aby możliwa była jego obserwacja w skali czasu rzeczywistego (rozdział 6).
- II. Przeprowadzenie odpowiednich symulacji w celu przeanalizowania i zrozumienia procesu adsorpcji i desorpcji struktury i-motif na/z powierzchni nanorurki, w zależności od stanu protonacji i-motifu, chiralności i rodzaju grupy funkcyjnej przyłączonej do nanorurki węglowej. Opis mechanizmu stabilizacji i-motifu w wyniku interakcji z jednościennej nanorurkami węglowymi (rozdział 7).
- III. Analiza stabilności struktury i-motifu w przypadku, w którym i-motif jest częścią większej struktury, a więc tworzy się w duplesie telomerowego DNA i oddziałuje z nanorurkami węglowymi. Znalezienie najlepszego/preferowanego wzajemnego dopasowania tych elementów układu przy zastosowaniu różnej chiralności, funkcjonalizacji lub braku funkcjonalizacji użytych nanorurek (rozdział 8).
- IV. Wygenerowanie przy użyciu klasycznej dynamiki molekularnej stanów, w których funkcyjne grupy karboksylowe nanorurek będą doprowadzone jak najbliżej atomów azotu w obrębie pierścieni cytozyny, należących do duplesu DNA. Zbadanie przy użyciu obliczeń kwantowo chemicznych możliwości protonacji cytozyn poprzez przeniesienie protonu z grupy karboksylowej do atomu azotu w pierścieniu cytozyny (rozdział 9).

6. Badanie mechanizmu rozwijania i stabilności niekanonicznych form DNA takich jak G-quadrupleks i i-motif przy użyciu dynamiki molekularnej

G-quadrupleks i i-motif to struktury DNA, które są w pewien sposób ze sobą sprzężone, ponieważ mogą tworzyć się w komplementarnych regionach genomu. Jednak w większości badań opisanych w literaturze, struktury te badano niezależnie, a wnioski dotyczące ich stabilności ograniczały się raczej do takich czynników jak temperatura, pH czy obecność kationów. W literaturze brakuje więc danych dotyczących wzajemnego wpływu tych dwóch struktur na siebie. W jednej z ostatnich publikacji dotyczącej tej tematyki autorzy stwierdzili, że obecność G-quadrupleksu sprawia, iż nie bogata w cytozynę zawierająca i-motif jest stabilna w obojętnym pH, natomiast przy braku komplementarnej nici bogatej w guaninę zawierającej Gq, i-motif ulega samoistnemu pogorszeniu i rozwinięciu do struktury przypominającej spinkę (wsuwkę) do włosów (Wolski, Nieszporek, i Panczyk 2019).

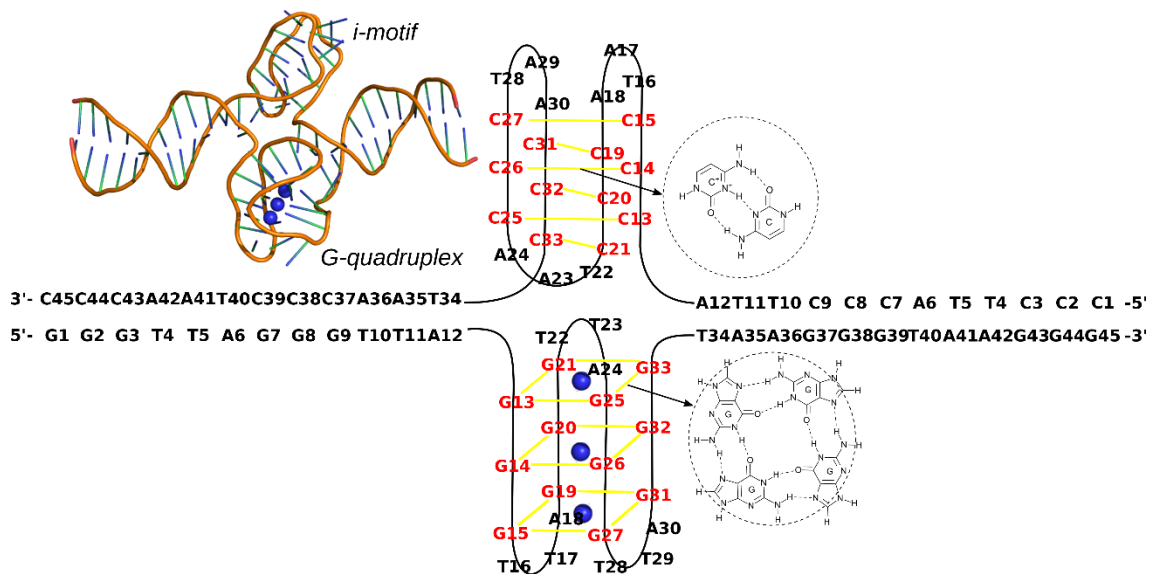
Przedstawione w niniejszym rozdziale badania miały na celu przeprowadzenie szczegółowej analizy wzajemnego wpływu Gq i iM na ich stabilność. W tym celu przeprowadzono wymuszone procesy rozwijania w/w struktur i zmierzono prace niezbędne do wykonania takich przejść w obecności lub braku struktury komplementarnej i innych warunków. Jako zmienną kolektywną, będącą miarą stopnia rozwinięcia, użyto parametru rmsd (z ang. *root mean squared displacement*), będącego pierwiastkiem ze średniego kwadratowego odchylenia danej struktury od pewnego stanu odniesienia, którymi są idealne struktury iM lub Gq.

6.1. Szczegóły dotyczące budowy i symulacji badanych układów

Analizowana struktura iG (i-motif + G-quadrupleks) została utworzona przy użyciu języka NAB (Nucleic Acid Builder), pochodzącego z pakietu AmberTools16 (Case i in. 2005) oraz przy wykorzystaniu plików .pdb z bazy danych PDB. Początkową strukturę ciągu [3'-GGG(TTAGGG)₆]: [5'-CCC(TAACCC)₆] zbudowano za pomocą NAB, a następnie współrzędne atomowe zasad od 13 do 33 zastąpiono odpowiednimi współrzędnymi z plików .pdb 2JPZ i 1EL2. Struktura 1EL2 jest mieszaną, równoległą/antyrownoległą nicią G-quadrupleksu typu hybrydowego (Hybrid-2) i jest to

wewnątrzcząsteczkowa struktura G-quadrupleksu o natywnej, niezmodyfikowanej ludzkiej sekwencji telomerowej (Dai i in. 2007).

Po wstępnej optymalizacji otrzymano strukturę iG pokazaną schematycznie na poniższym rysunku (Rys. 6.1). Jest to telomerowy fragment chromosomu ze strukturami niekanonicznymi i-motifu oraz G-quadrupleksu, umieszczonymi symetrycznie pośrodku dupleksu. Brano pod uwagę sytuację, w której i-motif i G-quadrupleks znajdują się w tej samej pozycji na dupleksie. Jest to najbardziej intuicyjny układ, ponieważ tworzenie G-quadrupleksu lub i-motifu pozostawia nieuporządkowaną komplementarną część dupleksu. Wówczas może ona w naturalny sposób przyjąć uporządkowaną komplementarną strukturę, pod warunkiem spełnienia wszystkich niezbędnych warunków. W przypadku G-quadrupleksu jest to obecność jonów Na^+ lub K^+ (Turel i Kljun 2011). I-motif z kolei potrzebuje obniżonego pH $\sim 4-5$, aby wytworzyć stan protonowany cytozyn. Jednak obniżenie pH nie może być zbyt silne, ponieważ pełna protonacja wszystkich cytozyn prowadzi ponownie do stanu niestabilnego (Kim i Chalikian 2016).



Rys. 6.1. Schematyczne przedstawienie i wizualizacja (wstawka po lewej stronie) analizowanej w pracy struktury iG (i-motif + G-quadrupleks). Po prawej stronie rysunku umieszczone zostały wstawki pokazujące odpowiednie parowanie zasad (parowanie zasad Hoogsteena). W strukturze G-quadrupleksu dodatkowo umieszczono niezbędne do stabilizacji jony sodu (niebieskie kulki) zlokalizowane w centrach kwartetów guaninowych.

Wszystkie obliczenia wykonano przy użyciu pola siłowego AMBER dla kwasów nukleinowych ff99 (Weiner i in. 1986) z modyfikacjami bsc1 (Ivani i in. 2016). Konstrukcje plików topologii wykonano za pomocą samodzielnie zaprojektowanych skryptów, a pole siłowe wygenerowano za pomocą programu tleap, będącego częścią

pakietu AmberTools16. W badaniach rozważano dwa przypadki pH: obojętne i kwaśne. Oznacza to, że przy pH obojętnym wszystkie cytozyny są w swoich standardowych formach nieprotonowanych. Kwaśne pH oznacza, że cytozyny 13, 14, 15, 19, 20 i 21 są dodatkowo protonowane (Rys. 6.1). Protonacji cytozyn dokonano za pomocą programu tleap z dołączonymi plikami modyfikacji do tworzenia protonowanych kwasów nukleinowych. W kolejnym kroku układy wypełniono cząsteczkami wody TIP3P i dodano odpowiednią ilość jonów Na^+ i Cl^- w celu skompensowania całkowitego ładunku i naśladowania fizjologicznej siły jonowej roztworu $0,145 \text{ mol L}^{-1}$. Liczba cząsteczek wody wynosiła około 39 000, jonów Na^+ 196–202 (neutralne – kwaśne), jonów Cl^- 114, a łączna liczba atomów w pudłach symulacyjnych wynosiła około 120 000. Jako kationy stabilizujące strukturę G-quadrupleksu zastosowano trzy jony Na^+ , które umieszczono w centrach kwartetów guaninowych.

Rozmiary pudełek symulacyjnych wynosiły około $100 \times 100 \times 130 \text{ \AA}$. Cząsteczki wody w czasie symulacji były traktowane jako sztywne molekuly przy zastosowaniu algorytmu SHAKE (Andersen 1983). Obliczenia przeprowadzono w zespole NPT z wykorzystaniem kroku całkowania 2 fs i odległości odcięcia 12 \AA dla oddziaływań międzyatomowych. Ciśnienie i temperaturę kontrolowano za pomocą barostatu Nose-Hoover'a ze stałymi czasów relaksacji 2 ps i 0,2 ps odpowiednio dla ciśnienia i temperatury. Wszystkie obliczenia zostały wykonane przy użyciu pakietu obliczeniowego LAMMPS (Plimpton 1995). Każdy badany układ był początkowo poddawany nagrzewaniu od 100 K do 310 K w ciągu 1 ns przy stałej objętości. Następnie przeprowadzono kolejny etap równowagowania w stałej temperaturze 310 K i ciśnieniu 1 atm przez 2 ns. Stany końcowe z etapów równowagowania były następnie wykorzystywane jako konfiguracje początkowe we właściwych obliczeniach. W przeprowadzonych obliczeniach standardową dynamiką molekularną o długości 50 ns, w układzie iG nie zaobserwowano żadnych widocznych zmian struktury i-motifu jak i G-quadrupleksu w obu przypadkach pH.

W celu przeprowadzenia wymuszonego rozwinięcia analizowanych struktur DNA, jako zmienną kolektywną wybrano rmsd, będące pierwiastkiem ze średniego kwadratowego przemieszczenia atomów, biorących udział w tworzeniu wiązań wodorowych w parach Hoogsteena. Były to wszystkie atomy azotu i tlenu połączone liniami przerywanymi na Rys. 6.1. Przemieszczenie zostało zmierzone ze stanu odniesienia (ref), którym jest struktura iG pobrana z ostatniej klatki etapu równowagowania. Rmsd obliczono po wykonaniu optymalnego obrotu $U^x_i(t) \rightarrow x_i^{ref}$,

który najlepiej nakłada współrzędne $x_i(t)$ na zbiór współrzędnych odniesienia x_i^{ref} . To nałożenie zostało wykonane za pomocą modułu Colvar skompilowanego z LAMMPS. Wybór zmiennej kolektywnej rmsd do wymuszania rozwijania badanych struktur jest uzasadniony, ponieważ nie korzysta z określonej ścieżki przejścia, a układ podąża właściwie najłatwiejszą ścieżką, która odpowiada danej wartości rmsd. Zastosowany zakres zmiany wartości rmsd wynosił od 0 do 25 Å. Zerowa wartość rmsd była punktem wyjścia odpowiadającym pełnemu pokrywaniu się współrzędnych ze stanem odniesienia, natomiast 25 Å było wartością, dla której nastąpiło całkowite zniszczenie analizowanej struktury. Wartość rmsd zmieniała się jednostajnie podążając za punktem przemieszczającym się ze stałą prędkością 1.25 Å ns⁻¹. Stała siłowa potencjału harmonicznego łączącego układ z przemieszczającym się punktem wynosiła 5 eV Å⁻² (115 kcal mol⁻¹ Å⁻²). Pojedynczy proces rozwijania odpowiadał 20 ns symulacji. Liczba atomów, do których zastosowano dodatkowy potencjał (ang. *bias*), wyniosła 48 w przypadku rozwijania G-quadrupleksu i 36 w przypadku rozwijania i-motifu.

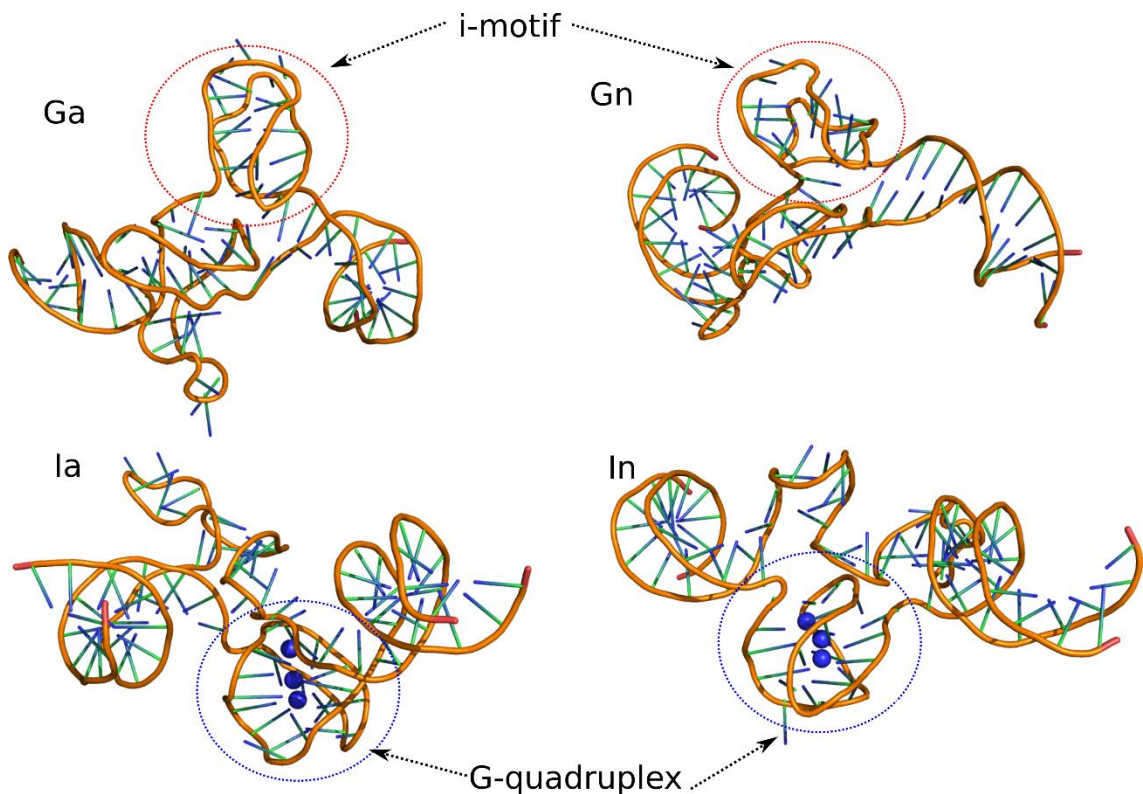
Zastosowane sterowane rozwinięcie iM oraz Gq spełnia warunki zależności Jarzyńskiego dla obliczeń zmiany energii swobodnej (Jarzynski 1997). Jednak w celu odtworzenia energii swobodnej o odpowiedniej dokładności należy wytworzyć bardzo dużo niezależnych trajektorii rozpoczętych od rozkładu kanonicznego, a energię swobodną można następnie wyznaczyć jako średnią wykładniczą (Park i Schulten 2004). Ta metoda jest skuteczna, gdy pojedyncze obliczenia (single run) zajmują niewiele czasu, a wiele niezależnych trajektorii można wyznaczyć w rozsądnych skalach czasowych. W naszym przypadku pojedyncze rozwinięcie struktury iM lub Gq zajmuje dużo czasu i dlatego nie możemy określić dokładnego profilu energii swobodnej, towarzyszącego procesom wymuszonego rozwijania. W związku z powyższym ograniczono rozważania do analizy porównawczej pojedynczych symulacji, które wprost reprezentują pracę wykonaną podczas wymuszonego rozwijania w warunkach nierównowagi. W ten sposób możemy porównać względne stabilności rozważanych układów jako funkcje wybranych parametrów.

Zastosowanie innych metod rozszerzonego próbkowania do wyznaczenia profilu energii swobodnej związanej z procesem rozwijania struktur iM i Gq okazało się nieefektywne. Zarówno metadynamika jak i metadynamika przyspieszona temperaturowo nie były w stanie wywołać powrotu współrzędnej reakcji do wartości odpowiadającej wyjściowym strukturom iM i Gq, co jest konieczne do osiągnięcia

zbieżności wyników w przypadku tych metod. Zastosowane podejście oparte na zależności Jarzyńskiego jest w tym przypadku fizycznie spójne i pozwala na uzyskanie wiarygodnych względnych oszacowań pracy związanej z rozwijaniem tych złożonych struktur.

6.2. Wyniki obliczeń i ich dyskusja

Struktura iG pokazana na Rys. 6.1, składa się z 45 par zasad. Jak już wcześniej wspomniano stabilność tej struktury jest wysoce zależna od pH (Wolski, Nieszporek, i in. 2019). Rys. 6.2. przedstawia konfiguracje struktur iG po wymuszonym rozwinięciu i relaksacji zarówno G-quadrupleksu jak i i-motifu przy obojętnym i kwaśnym pH.

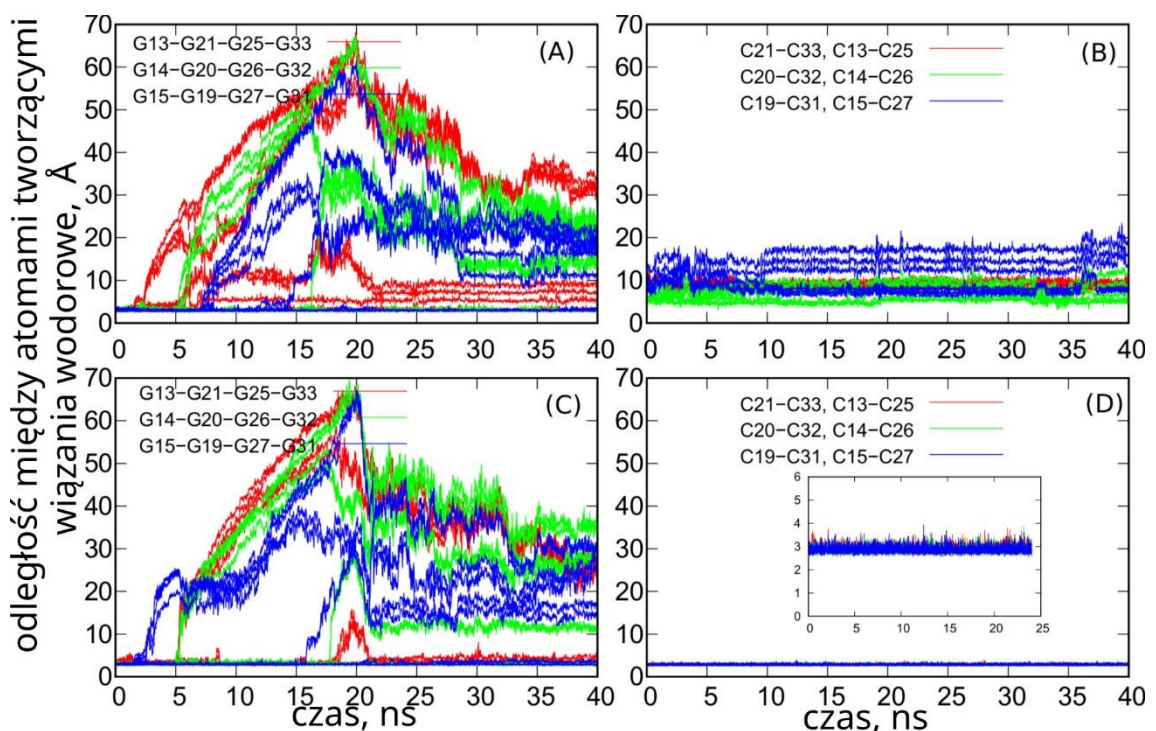


Rys. 6.2. Struktury iG po wymuszonym rozwinięciu przy pomocy sterowanej dynamiki molekularnej, po którym nastąpiła relaksacja bez dodatkowych sił przez dodatkowe 20 ns. Ga: rozwijanie G-quadrupleksu w pH kwaśnym; Gn: rozwijanie G-quadrupleksu w pH neutralnym; Ia: rozwijanie i-motifu w pH kwaśnym; In: rozwijanie i-motifu w pH neutralnym.

Analizując powyższy rysunek, można zauważyć, iż struktura i-motif, stanowiąca element całkowitej struktury iG, jest dobrze zachowana po rozwinięciu G-quadrupleksu tylko w pH kwaśnym. Wymuszone rozwijanie Gq nie wpływa na strukturę iM, gdy w obrębie par C⁺-C istnieją trzy wiązania wodorowe. Przy neutralnym pH struktura iM jest raczej luźna, tym samym możemy stwierdzić, że stabilność i-motifu bez

komplementarnego G-quadrupleksu jest raczej słaba. Osłabienie struktury i-motifu może być spowodowane przez napięcia związane z wymuszonym rozwijaniem Gq, ale główną przyczyną takiego zachowania jest brak protonowanych cytozyn i trzeciego wiązania wodorowego przy obojętnym pH (Wolski, Nieszporek, i in. 2019). Z drugiej strony struktura Gq zostaje zachowana po zniszczeniu iM zarówno przy pH kwaśnym jak i neutralnym. Jak widzimy na Rys. 6.2. jony sodu umieszczone w kwartetach guaninowych pozostają przez cały czas symulacji na swoich miejscach.

Bardziej szczegółowe wnioski dotyczące procesów rozwijania można ustalić na podstawie Rys. 6.3., który pokazuje jak w czasie wymuszonego rozwijania zmieniają się odległości między atomami tworzącymi wiązania wodorowe.



Rys. 6.3. Zmiany odległości między atomami tworzącymi wiązania wodorowe jak pokazano na Rys. 6.1., podczas wymuszonego rozwijania G-quadrupleksu w pH neutralnym i kwaśnym. W obrębie każdego kwartetu znajduje się 8 par atomów tworzących wiązania wodorowe (zaznaczone przy użyciu tego samego koloru). Podobnie ten sam kolor jest stosowany dla atomów w dwóch sąsiednich dubletach w i-motifach, tj. 6 linii. (A) odległości między atomami tworzącymi G-quadrupleks w pH neutralnym, (B) odległości między atomami tworzącymi i-motif w pH neutralnym, (C) odległości między atomami tworzącymi G-quadrupleks w pH kwaśnym, (D) odległości między atomami tworzącymi i-motif w pH kwaśnym.

Rysunek ten dotyczy tylko układów, w których rozwijano strukturę G-quadrupleksu w obu przypadkach pH. Jednak, jak możemy zauważyć, bez względu na to, że użyta do rozwijania G-quadrupleksu siła nie wpływa na powiązane z nim części struktury iG takie jak i-motif i pozostały fragment dwuniciowego DNA, to na te elementy

układu wpływ ma sam proces rozwijania Gq. Najbardziej widoczne zmiany odległości między atomami zachodzą oczywiście w obrębie struktury Gq, ponieważ bezpośrednio oddziałuje na nią siła wymuszająca zmianę tej struktury. Interesującą obserwacją jest sekwencja zrywania wiązań wodorowych. W przypadku pH obojętnego (wykresy na części (A) i (B)) pogorszenie struktury Gq zaczyna się od najbardziej wewnętrznego kwartetu (najlepiej widocznego na Rys.6.1.), chociaż 2 lub 4 wiązania są zachowane do końca obliczeń.

Należy zauważyć, że siła mająca na celu rozwinięcie analizowanej struktury, jest stosowana do dwudziestej nanosekundy obliczeń, kolejne 20 ns są to obliczenia bez dodatkowej siły, w których obserwujemy gwałtowny spadek odległości i dość szybką stabilizację wokół nowych wartości. Spontaniczne ponowne utworzenie struktury Gq jest wysoce nieprawdopodobne w czasie dostępnym dla standardowych obliczeń MD. Nowe wartości można traktować jako reprezentatywne dla przejściowych, ale długotrwałych form rozwiniętego Gq. W kwaśnym pH rozwijanie Gq przebiega w inny sposób, chociaż pH nie może bezpośrednio zmieniać stanu Gq. Widać, że rozwijanie zaczyna się od przeciwnej strony, tj. od skrajnego kwartetu guaninowego. Jednak po 5 ns wszystkie kwartety ulegają częściowemu rozerwaniu, chociaż kilka wiązań wodorowych wciąż istnieje do końca obliczeń. Jak widać na Rys. 6.2. w obu przypadkach pH, jony sodu uciekły z klatek utworzonych przez G-quadrupleksy, a końcowe struktury w ogóle nie przypominają G-quadrupleksów.

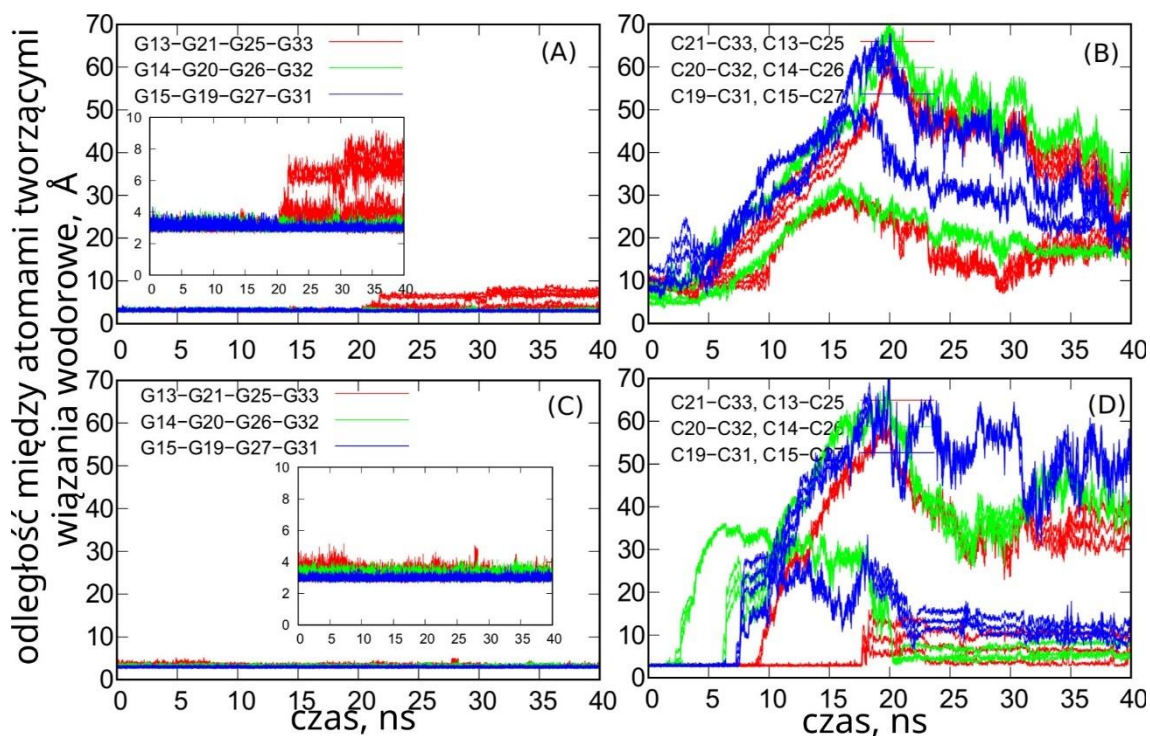
Analiza struktur i-motifu podczas wymuszonego rozwijania G-quadrupleksów prowadzi do wniosku, że w kwaśnym pH proces ten nie ma żadnego wpływu na i-motif. Wiązania wodorowe w iM są nienaruszone (Rys. 6.3.D), ich długości wahają się tylko wokół wartości średnich. Z drugiej strony i-motif przy pH neutralnym szybko tracił swoją strukturę, a większość wiązań wodorowych (szczególnie zewnętrznych) ulegała rozerwaniu w wyniku rozwinięcia Gq. Wydaje się jednak, że uzyskana osłabiona struktura i-motif jest nadal stabilna, ponieważ odległości oscylują jedynie wokół ich wartości średnich. Z drugiej strony, pogorszenie i-motifu przy obojętnym pH zaobserwowano również w obliczeniach klasyczną dynamiką molekularną, ale w przypadku i-motifu utworzonego w obrębie jednoniciowego łańcucha bogatego w cytozyny (Wolski, Nieszporek, i in. 2019). Obecność komplementarnego łańcucha bogatego w guaninę z utworzonym Gq wymaga pokonania bariery energii swobodnej rzędu 70 kJ mol^{-1} w celu rozwinięcia i-motifu do formy spinki do włosów. Wymuszone

rozwijanie G-quadrupleksu nie wydaje się znacząco destabilizować komplementarnego i-motifu.

Na poniższym rysunku pokazano, jak zmieniają się odległości między atomami, tworzącymi wiązania wodorowe podczas wymuszonego rozwijania i-motifu, stanowiącego część struktury iG. Ustawienie wykresów na Rys. 6.4. jest takie samo jak na Rys. 6.3, dzięki czemu możemy bezpośrednio zaobserwować różnice w procesach rozwijania. Na poniższych wykresach widzimy, że podczas wymuszonego rozwijania i-motifu, struktura G-quadrupleksu pozostaje prawie nienaruszona (dodatkowa siła działa do 20 ns). I-motyfy oczywiście w obu przypadkach ulegają rozwinięciu, ale wyraźnie widać, że pH znacząco wpływa na procesy rozwijania. Przy pH obojętnym wszystkie wiązania wodorowe pękają już na samym początku (niektóre z nich są zerwane już po etapie równowagowania). Oznacza to, że i-motif degradowuje się jako cała struktura.

Przy pH kwaśnym proces przebiega w inny sposób. Rozwijanie i-motifu rozpoczyna się od środkowej pary cytozyn, a następnie rozdzielają się skrajne pary. Pary najbardziej wewnętrzne są najbardziej odporne i częściowo regenerują się po ustaniu dodatkowej siły rozwijającej. W tym przypadku i-motif ma tendencję do tworzenia struktury przypominającej spinkę do włosów, w przeciwieństwie do przypadku w pH neutralnym, gdzie i-motif jest przestrzennie zniszczony, a wszystkie odległości na Rys. 6.4 (B) są powyżej 10 Å.

Jak widać na poniższych wykresach, rozwijanie i-motifu nie wpływa na komplementarny G-quadrupleks. Jednak po usunięciu siły rozwijającej i-motif, coś nieoczekiwanego dzieje się z Gq przy pH neutralnym. Rozluźnienie części iM powoduje pewne pogorszenie Gq. Wiązania wodorowe w wewnętrznym kwartecie guaninowym zrywają się, chociaż odległości pomiędzy atomami nie rosną zbyt dużo. Oględziny struktury przestrzennej G-quadrupleksu (Rys. 6.2, część In) nie wykazują w tym przypadku znaczącego odkształcenia lub pogorszenia Gq. Zatem zaobserwowany wzrost odległości na wykresie z Rys.6.4. (A) jest przypadkowy i jest to po prostu stan przejściowy, z którego wiązania wodorowe po pewnym czasie wracają do swoich wyjściowych form.

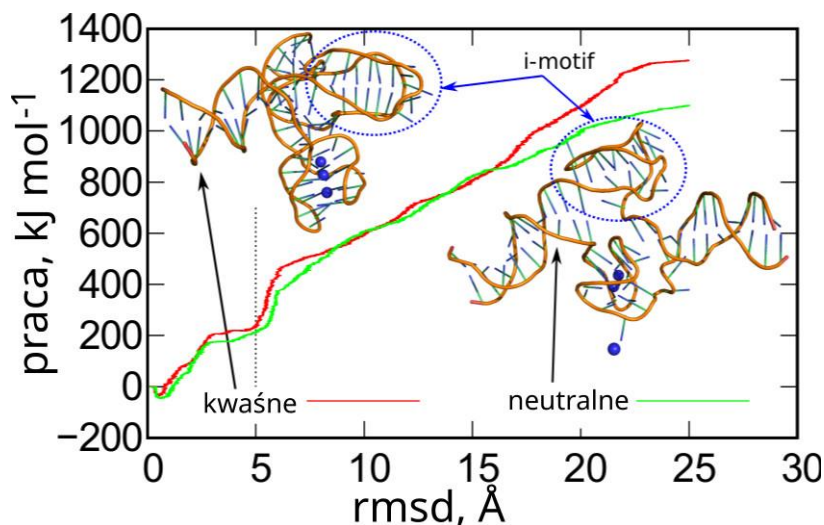


Rys. 6.4. Zmiany odległości między atomami tworzącymi wiązania wodorowe jak pokazano na Rys. 6.1, podczas wymuszonego rozwijania i-motifu w pH neutralnym i kwaśnym. (A) odległości między atomami tworzącymi G-quadrupleks w pH neutralnym, (B) odległości między atomami tworzącymi i-motif w pH neutralnym, (C) odległości między atomami tworzącymi G-quadrupleks w pH kwaśnym, (D) odległości między atomami tworzącymi i-motif w pH kwaśnym.

Analiza pracy wykonanej podczas wymuszonego rozwijania zarówno i-motifu, jak i G-quadrupleksu pozwala na wyciągnięcie wniosków dotyczących stabilności tych struktur. Na Rys. 6.5. przedstawiono pracę związaną z siłami generowanymi przez liniowo narastający (ze stałą prędkością 1.25 \AA ns^{-1}) rmsd w przypadku rozwijania G-quadrupleksu.

Jak widać na wykresach z Rys. 6.5, w obu przypadkach pH praca niezbędna do zniszczenia G-quadrupleksów jest bardzo podobna. Krzywe ujawniają schodkowy kształt z najbardziej widocznym plateau w zakresie rmsd 3-5 Å. Wysokość pierwszego stopnia to ok. 250 kJ mol^{-1} i jest on związany z rozerwaniem 3 wiązań wodorowych, jak to widać na Rys. 6.3. Jednak pomimo podobieństwa wykresów na Rys. 6.5, mechanizm rozwijania jest w tych dwóch przypadkach inny. Zgodnie z Rys. 6.3, rozwijanie rozpoczyna się od najbardziej wewnętrznego pierścienia guaninowego przy pH obojętnym i od najbardziej zewnętrznego w przypadku pH kwaśnego. Pomimo, iż efekt energetyczny jest bardzo podobny w obu przypadkach, nie można go wiązać tylko z rozerwaniem wiązań wodorowych. Dzieje się tak dlatego, że obserwowane energie są znacznie większe niż

suma energii trzech pojedynczych wiązań wodorowych, czyli około. 20 kJ mol^{-1} (Garabedian i in. 2016).

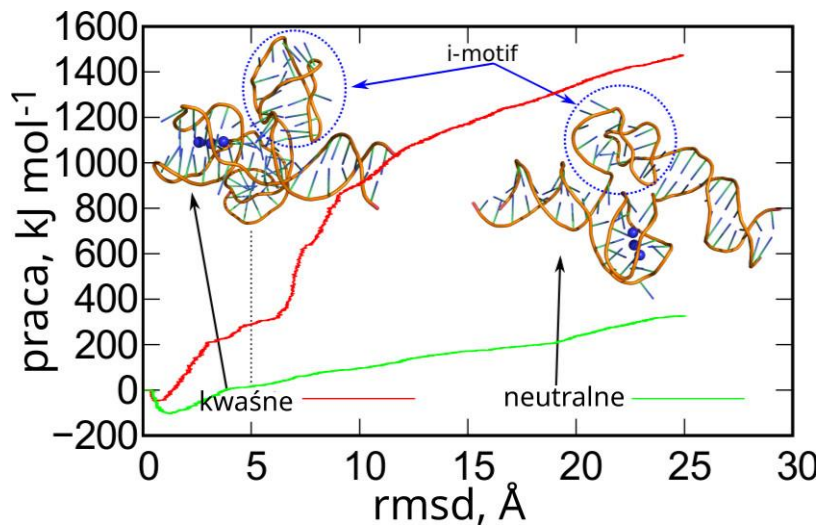


Rys. 6.5. Praca zmierzona podczas wymuszonego rozwijania G-quadrupleksów w pH neutralnym i kwaśnym. Siła wymuszająca zmianę struktury ($5 \text{ eV } \text{Å}^{-2}$) nakładana jest w kierunku rosnącego pierwiastka średniej kwadratowej przemieszczenia atomów tworzących wiązania wodorowe w każdej strukturze. Przedstawione struktury iG zostały wykonane po pierwszych 4 ns rozwijania, ten punkt czasu jest wskazany na wykresie przez pionową linię przerywaną.

Konfiguracje układów pokazane na Rys. 6.5. zostały wykonane pod koniec pierwszego plateau, tj. przy rmsd wynoszącym 5 Å , odpowiadającemu wartości osiągniętej w 4 ns symulacji. Na ich podstawie możemy zauważyć, że stan i-motifu wpływa na mechanizm rozwijania się G-quadrupleksu. Przy pH kwaśnym sztywna struktura i-motifu nie wpływa na dolną część (najbardziej wewnętrzną) G-quadrupleksu, degradacja Gq zaczyna się od zewnętrznej strony. Z kolei przy neutralnym pH, i-motif wydaje się ściśle współdziałać z najgłębszą częścią G-quadrupleksu i dlatego jego pogorszenie zaczyna się od tego końca. Jednak uwolnienie kationu sodu nastąpiło z najbardziej zewnętrznego kwartetu guaninowego, chociaż wiązania wodorowe w tej części Gq były nadal obecne. To dość nieoczekiwana obserwacja, a uwolnienie Na^+ jest prawdopodobnie spowodowane niektórymi oscylacjami całej konstrukcji, będącymi wynikiem rozbicia najgłębszego kwartetu guaninowego.

Kolejny skok na wykresach z Rys. 6.5. przy wartości rmsd około 5 Å , odpowiada rozerwaniu kolejnych grup wiązań wodorowych (6 przy obojętnym pH i 4 przy kwaśnym pH). Dalszy prawie liniowy wzrost pracy związany jest z rozerwaniem innych wiązań wodorowych i jak widać na Rys. 6.3, pękają one szybciej w przypadku obojętnego pH. Wydaje się, że G-quadrupleks przy pH obojętnym jest nieco mniej stabilny niż przy kwaśnym, chociaż nie ma bezpośrednich zależności stabilności Gq od pH.

Rys. 6.6. przedstawia prace związane z rozwijaniem i-motifów przy pH obojętnym i kwaśnym. Widzimy duże różnice w stabilności i-motifów w zależności od pH. W kwaśnym pH praca niezbędna do zniszczenia struktury i-motifu jest bardzo duża i porównywalna z rozwijaniem G-quadrupleksów na Rys. 6.5. Jednak przy pH obojętnym wyznaczona praca jest niewielka, łączna praca związana z pełnym rozwinięciem i-motifu jest nie większa niż 420 kJ mol^{-1} . Jeśli więc podzielimy tę wartość przez liczbę par potencjalnie tworzących wiązania wodorowe, to przeciętna praca związana z rozerwaniem pojedynczego wiązania wodorowego wynosi około 23 kJ mol^{-1} . Określona praca nie pochodzi tylko z wiązań wodorowych; rolę odgrywają również efekty steryczne, więc średnia energia na pojedyncze wiązanie wodorowe jest jeszcze mniejsza. Niemniej jednak rozwinięcie i-motifu wymaga trochę pracy ze strony otoczenia, ponieważ w przeciwnym razie określona na Rys. 6.6. praca byłaby ujemna. Możemy zatem stwierdzić, że stabilność i-motifu w neutralnym pH jest znacznie osłabiona, ale struktura ta nie rozwija się samoistnie. Ta obserwacja jest zgodna z wcześniejszymi obserwacjami (Wolski, Nieszporek, i in. 2019). Tym samym, obecność komplementarnego G-quadrupleksu w pewnym stopniu stabilizuje i-motif.



Rys. 6.6. Praca wyznaczona podczas wymuszonego rozwijania i-motifu w pH neutralnym i kwaśnym. Siła wymuszająca zmianę struktury (5 eV \AA^{-2}) nakładana jest w kierunku rosnącego pierwiastka średniej kwadratowej przemieszczenia atomów, tworzących wiązania wodorowe w każdej strukturze. Konfiguracje struktur iG zostały wykonane po pierwszych 4 ns rozwijania, ten punkt czasu jest wskazany na wykresie przez pionową linię przerywaną.

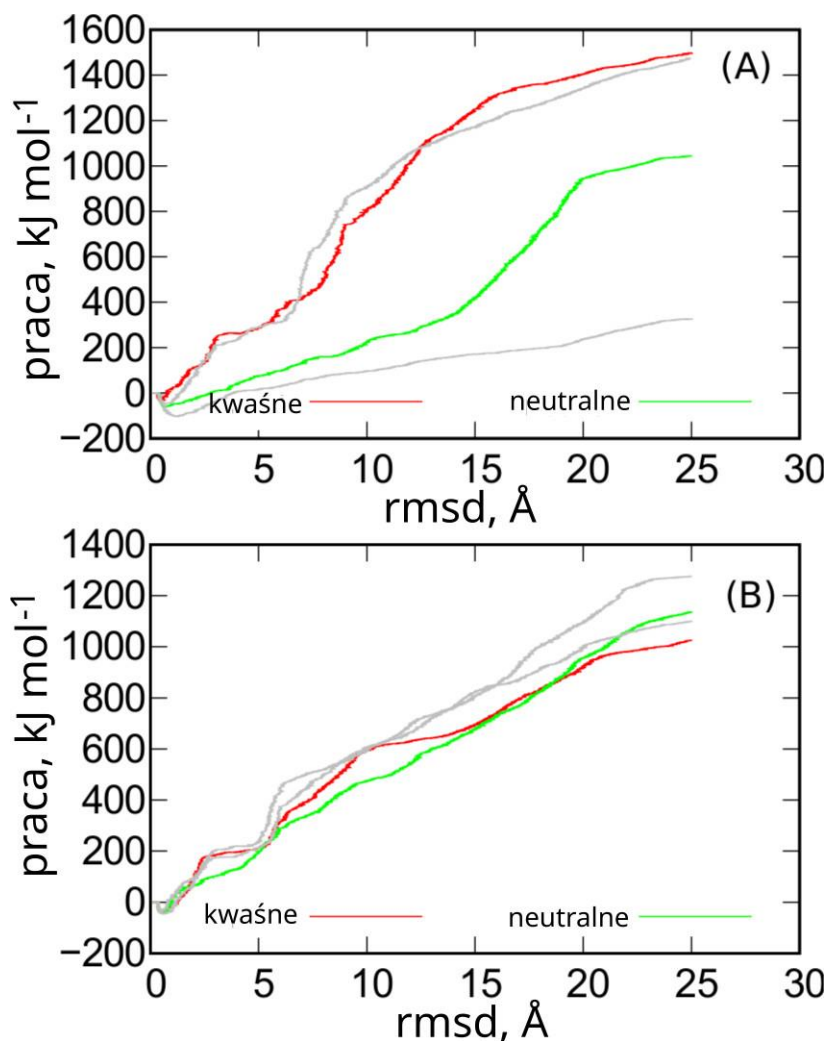
Wzrosty pracy pojawiające się około 5 \AA rmsd na Rys. 6.6. i ich porównanie z danymi z Rys. 6.4. pozwalają stwierdzić, że przy obojętnym pH już pierwszy wzrost mierzonej pracy odpowiada rozerwaniu wszystkich wiązań wodorowych, po którym następuje dalsza degradacja struktury. Z kolei przy pH kwaśnym wzrost ten odpowiada

rozerwaniu tylko dwóch wiązań wodorowych. Co ciekawe, wiązania te znajdują się w środkowej części i-motifu. Pozostałe wiązania rozpadają się sekwencyjnie, ale nie jest to wyraźnie widoczne na powyższym wykresie, ponieważ rośnie on monotonicznie bez wyraźnych, dobrze zaznaczonych kroków. Konfiguracje układów przy rmsd 5 Å pokazują, że w tych momentach symulacji kształty i-motifu są nadal dobrze zachowane.

Ogólny wniosek z powyższych wyników jest taki, że w pH kwaśnym struktura iG jest wysoce stabilna i nie może rozwijać się samoistnie. Jednak po zwiększeniu pH do fizjologicznego, kiedy następuje deprotonacja cytozyn, stabilność iG ulega osłabieniu. Patrząc na Rys. 6.5. i Rys. 6.6. możemy stwierdzić, że najbardziej prawdopodobne jest rozwinięcie się i-motifu, podczas gdy G-quadrupleks powinien zostać nienaruszony. Mówiąc precyzyjniej, jak już wspomniano, pełne rozwinięcie i-motifu do struktury spinki do włosów, nadal wymaga trochę energii. Jednak osłabienie początkowej struktury iM postępuje szybko, a stan osłabienia, choć wykazuje znaczną stabilność, ulegnie pogorszeniu przed G-quadrupleksem.

Na Rys. 6.7. (A) przedstawiono wyniki dotyczące wymuszonego rozwijania i-motifu, ale struktury startowe i referencyjne są stanem końcowym, uzyskanym po rozwinięciu G-quadrupleksu. Jako stany odniesienia użyto struktury Ga i Gn z Rys. 6.2, a siła wymuszająca rozwinięcie jest lokalizowana na atomach, tworzących wiązania wodorowe w strukturze i-motifu. Badania te miały na celu analizę mechanizmu rozwijania się tej struktury iM, gdy G-quadrupleksy już nie istnieją. Podobnie na Rys. 6.7.(B) pokazano pracę zmierzoną podczas wymuszonego rozwijania G-quadrupleksów ze stanów, w których i-motify zostały już rozwinięte, tj. stanów Ia i In z Rys. 6.2.

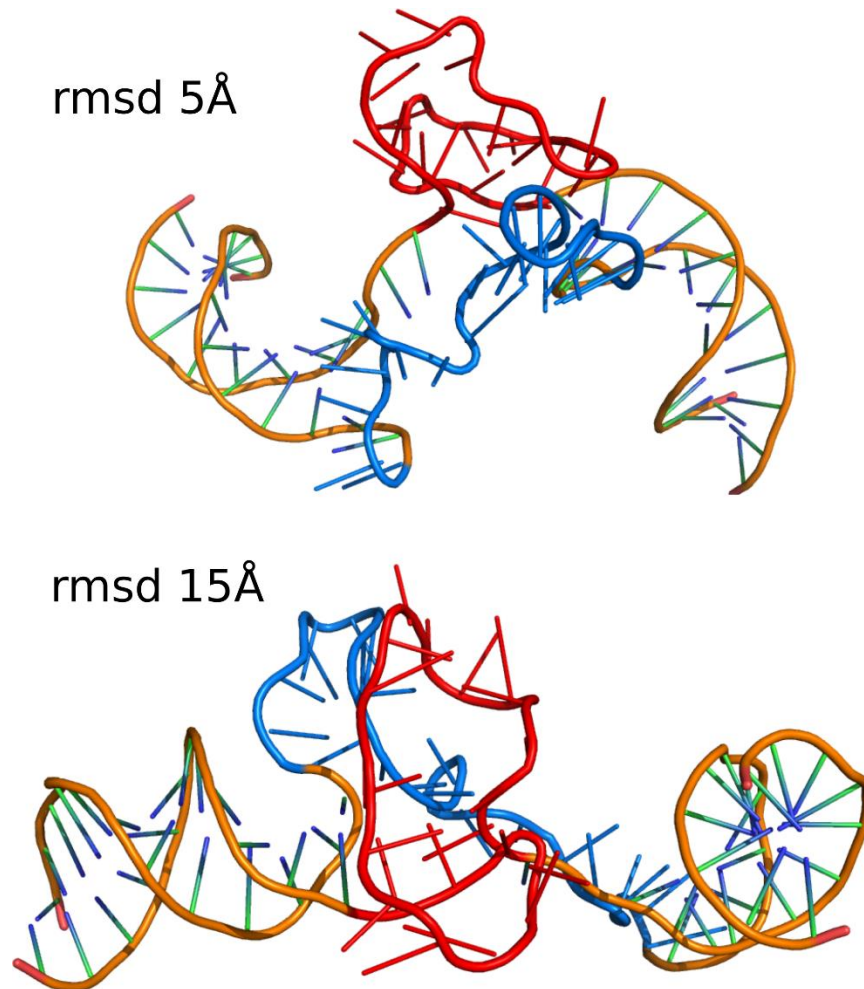
Jak widać na Rys. 6.7. (A) brak G-quadrupleksów przy pH kwaśnym nie wpływa na stabilność iM. I-motif jest stabilny bez względu na to, czy w komplementarnej nici bogatej w guaninę powstaje Gq, czy też część nici jest w nieuporządkowanej strukturze. Jednak przy obojętnym pH obserwujemy dość zaskakujący wynik. Z badań przedstawionych na wykresie wynika, że zaburzenie strukturalne nici bogatej w guaninę stabilizuje i-motif w porównaniu z poprzednim przypadkiem obecności idealnej struktury G-quadrupleksu. W obecnym układzie, praca potrzebna do rozwinięcia i-motifu jest znacznie większa niż praca odpowiadająca rozwinięciu i-motifu przy idealnej strukturze iG.



Rys. 6.7. Praca mierzona podczas wymuszonego rozwijania (A) i-motifów i (B) G-quadrupleksów, zaczynając od częściowo rozwiniętych struktur iG pokazanych na Rys. 6.2: (A) Ga i Gn, (B) Ia i In. Rozwijanie przeprowadzono w taki sam sposób jak na Rys. 6.4, Rys. 6.5, a szare krzywe pokazują dla porównania uzyskane wcześniej wyniki.

Rys. 6.8. przedstawia dwie konfigurację układów, wykonane przy rmsd równym 5 Å i 15 Å, które pomagają zrozumieć, dlaczego obecność rozwiniętego fragmentu Gq stabilizuje i-motif silniej niż idealna struktura Gq. Jak widać na Rys. 6.8 i-motif jest w stanie zbliżyć się do przestrzennie rozciągniętej struktury utworzonej przez fragment dupleksu i rozwinięty G-quadrupleks. Wzmacnia to wzajemne interakcje między atomami tworzącymi iM i tymi należącymi do reszt, które utworzyły G-quadrupleks i dupleks. Wzajemne oddziaływania między atomami tworzącymi iM i Gq są coraz silniejsze w miarę postępującego niszczenia i-motifu. Dlatego praca niezbędna do rozwinięcia i-motifu jest coraz większa wraz ze wzrostem rmsd. W pierwotnej postaci iG, jak pokazano na Rys. 6.1 i-motif jest przestrzennie dobrze oddzielony od

G-quadrupleksu i dupleksu, dzięki czemu nie ma dodatkowych interakcji, które zwiększają stabilność i-motifu.



Rys. 6.8. Wizualizacje symulacji wykonane przy dwóch wartościach rmsd 5 i 15 Å podczas wymuszonego rozwijania i-motifu przy pH neutralnym, zainicjowane z częściowo rozwiniętej struktury Gn z Rys. 6.2. Fragmenty tworzące iM są zaznaczone na czerwono, a fragmenty które wcześniej tworzyły Gq, na niebiesko.

Rozwijanie G-quadrupleksu ze stanu półrozwinętego (Rys. 6.7 B) wymaga bardzo podobnej pracy, jak rozwijanie z oryginalnej struktury iG (Rys. 6.5.). Tak więc, obecność i-motifu w niewielkim stopniu wpływa na stabilność komplementarnego G-quadrupleksu. Jednak przy obojętnym pH różnica między wykresami pracy widoczna na Rys. 6.7(B) może sugerować pewien niewielki efekt stabilizujący i-motifu. Niemniej jednak, każdy proces rozwijania Gq (pH kwaśne lub obojętne) rozpoczynający się od jakiegokolwiek struktury początkowej jest trudny i nie może zachodzić spontanicznie. Rozwijanie i-motifu jest zdecydowanie łatwiejsze w pH neutralnym, a obecność rozwiniętego i nieuporządkowanego fragmentu tworzącego G-quadrupleks znacznie zwiększa stabilność i-motifu w neutralnym pH.

6.3. Podsumowanie wyników

Określenie pracy niezbędnej do rozwinięcia G-quadrupleksu i i-motifu przy wykorzystaniu sterowanej dynamiki molekularnej pozwoliło stwierdzić, że G-quadrupleksy są wysoce stabilne, a ich stabilność właściwie nie zależy od pH, co pośrednio wynika z modyfikacji stanów energetycznych komplementarnego i-motifu. Natomiast sam proces rozwijania G-quadrupleksu przebiega w zupełnie inny sposób w zależności od pH. Mianowicie przy pH obojętnym degradacja zaczyna się od kwartetu guaninowego G13-G21-G25-G33, podczas gdy przy pH kwaśnym kwartet G15-G19-G27-G31 ulega zniszczeniu jako pierwszy (Rys. 6.1). Na komplementarne i-motify nie mają wpływu wymuszone i silne zmiany strukturalne w G-quadrupleksach.

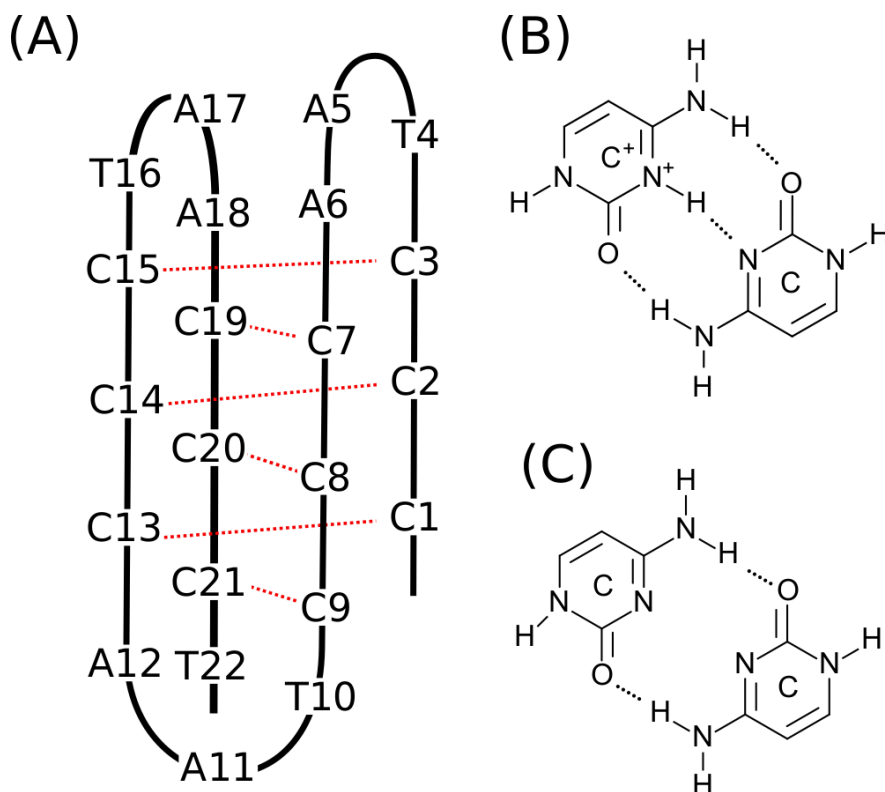
Wartość pH ma silny wpływ na stabilność i-motifów, określone prace związane z wymuszonym rozwinięciem iM znacznie się różnią. W pH kwaśnym ilość pracy jest porównywalna z pracą potrzebną do rozwinięcia Gq, ale przy neutralnym pH praca jest znacznie mniejsza, choć nadal niezerowa. Oznacza to, że rozwijanie iM przy pH neutralnym jest stosunkowo łatwe, ale nadal niespontaniczne. Tym samym struktura iM, choć znacznie osłabiona, jest zachowana także przy pH neutralnym. Efekt ten przypisywany jest obecności komplementarnego Gq. Jak stwierdzono we wcześniejszych badaniach, brak komplementarnej nici bogatej w guaninę prowadzi do spontanicznego rozwinięcia iM (Wolski, Nieszporek, i in. 2019). W zaprezentowanych tu badaniach stabilizująca rola Gq została dokładniej zbadana, prowadząc do wniosku, że obecność idealnego Gq jest mniej skuteczna niż jego rozwinięte i nieuporządkowane formy. Dzieje się tak, ponieważ elementy Gq zbliżają się do iM i wzmacniają interakcje międzyatomowe, które z kolei utrudniają rozwijanie iM.

7. Analiza interakcji i-motifu z jednościennymi nanorurkami węglowymi

W tym rozdziale przedstawiono i omówiono wyniki uzyskane z przeprowadzonych metodą dynamiki molekularnej symulacji układów, złożonych z ludzkiego telomerowego DNA w postaci i-motifu oddziałującego z funkcjonalizowanymi nanorurkami węglowymi. W pracy użyto dwóch form i-motifu, tak jak w badaniach w poprzednim rozdziale, tj. formę nieprotonowaną i sprotonowaną. Te i-motify oddziaływały z dwoma rodzajami nanorurek węglowych, różniących się głównie chiralnością (średnicą). Dodatkowo nanorurki były funkcjonalizowane na końcach grupami aminowymi lub resztami zawierającymi guaninę. Celem pracy było zrozumienie zjawisk zachodzących podczas interakcji tych cząstek oraz przeanalizowanie mechanizmu stabilizacji struktury i-motifu w wyniku oddziaływania z jednościennymi nanorurkami węglowymi, który został zaproponowany przez Chen i wsp. (Chen i in. 2012).

7.1. Szczegóły dotyczące budowy i symulacji badanych układów

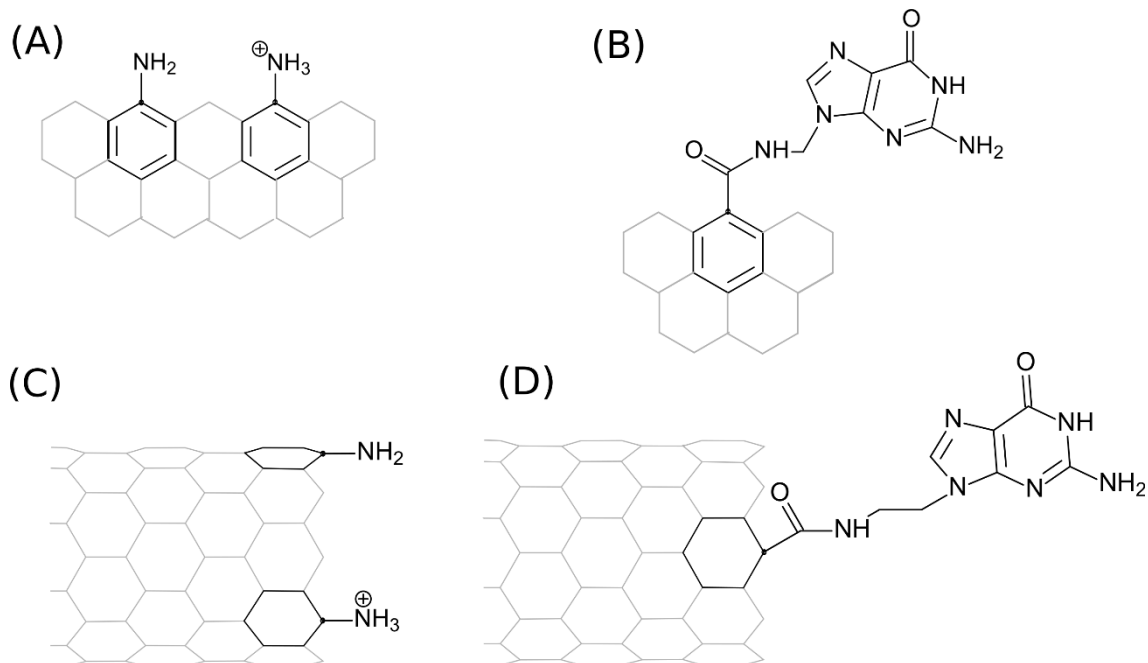
Badana struktura i-motifu opiera się na sekwencji d[(CCCTAA)₃CCCT], którą otrzymano z pdb 1EL2, tj. sekwencji opublikowanej przez Phan i wsp. (Phan i Mergny 2002), w której zastąpiono uracyl i 5m-cytozynę odpowiednio tyminą i cytozyną. Powyższa sekwencja zasad reprezentuje natywny, nieprotonowany iM. Jak już wcześniej dyskutowano semiprotonowana struktura iM (iMp) pojawia się przy lekko kwaśnym pH. Protonacji cytozyn dokonano w ten sam sposób jak w opisie 6.1., tj. za pomocą programu tleap z dołączonymi plikami modyfikacji do tworzenia protonowanych kwasów nukleinowych. Struktury przestrzenne iM i iMp są początkowo niemal identyczne jak pokazano na Rys. 7.1.A. Jednak różnią się one znacznie pod względem topologii pola siłowego i wartości parametrów ze względu na dodatkowy proton związany z atomem azotu, jak widać na Rys. 7.1. B, C. Protonowane cytozyny to C1, C2, C3, C19, C20, C21. Zastosowany rodzaj pola siłowego i model cząsteczek wody są takie same jak w podrozdziale 6.1.



Rys. 7.1. (A) Schematyczne przedstawienie struktury przestrzennej i-motifu; (B) parowanie cytozyny C:C⁺ w protonowanym i-motifu, iMp; (C) parowanie cytozyny C:C w natywnym nieprotonowanym iM.

W przeprowadzonych badaniach rozważano dwa rodzaje jednościennej nanorurki węglowej, różniące się parametrami chiralności, które w tym przypadku wpływają głównie na średnice CNT. Zastosowano nanorurki o chiralności (10,0) i (20,0), mające odpowiednio średnice 7,8 i 15,7 Å i tą samą długość, która wynosiła 75 Å. Zastosowanie dwóch różnych rozmiarów nanorurek miało na celu sprawdzenie, w jaki sposób średnica CNTs wpływa na strukturę iM zaadsorbowanego na ich powierzchniach zewnętrznych. CNTs dodatkowo kowalencyjnie sfunkcjonalizowano na ich końcach, aby sprawdzić jak niektóre niespecyficzne (-NH₂) lub wysoce specyficzne (-Gu, guanina) grupy wpływają na interakcję ze strukturami iM. W celu sfunkcjonalizowania CNT, najpierw wygenerowano szablony grup funkcyjnych (Rys. 7.2.) przy użyciu pierścienia benzenowego jako najbliższego sąsiedztwa atomu węgla w końcówce nanorurki, z którą połączona jest grupa funkcyjna. W przypadku grup aminowych matrycami były w rzeczywistości cząsteczki aniliny, natomiast w przypadku funkcjonalizacji guaninami zastosowano sprawdzoną już strategię, polegającą na karboksylacji i późniejszej derywatywacji za pomocą N⁹-(2-aminoetylo) guaniny (Singh i in. 2012). Następnie takie cząsteczki matrycy poddano obliczeniom kwantowo-chemicznym w celu wyznaczenia potencjału elektrostatycznego, po czym dokonano dopasowania ładunków punktowych

do tych potencjałów elektrostatycznych. Ostatnie dwa kroki zostały wykonane w sposób półautomatyczny przy pomocy internetowego serwisu R.E.D, przeznaczonego do automatycznego wyznaczania ładunków RESP, który implementuje procedurę opisaną przez Dupradeau i wsp. (Dupradeau i in. 2010).



Rys. 7.2. Schemat zastosowanej funkcjonalizacji końcówek nanorurek węglowych. Czarne kropki pokazują atomy węgla CNT, do których dodawane są grupy funkcyjne. (A) Szablony do wyznaczania parametrów pola siłowego, związanego z funkcjonalizacją końcówek CNT grupami $-NH_2$ i $-NH_3^{(+)}$. (B) Szablony do wyznaczania parametrów pola siłowego dla nanorurek sfunkcjonalizowanych guaninami. (C) Schemat pokazujący połączenie grup aminowych z CNT i (D) to samo dla CNT zawierającej grupy guaninowe.

Szablony zostały następnie wykorzystane do wygenerowania plików topologii zgodnie z polem siłowym GAFF (Generalised Amber Force Field). Dokonano tego za pomocą pakietu AmberTools16 i skryptu AcPyPe (Sousa da Silva i Vranken 2012). Wewnętrzna struktura CNT została opisana przez potencjał AIREBO (Brenner i in. 2002). Pomimo, iż jego reaktywna część w rzeczywistości nie została tutaj wykorzystana, to pola siłowe REBO/AIREBO są jednymi z najbardziej zaawansowanych potencjałów przeznaczonych do opisu właściwości mechanicznych materiałów węglowych. Kowalencyjną funkcjonalizację końcówek CNT przy użyciu przygotowanych szablonów przeprowadzono poprzez zastąpienie atomów węgla pierścienia benzenowego w danym szablonie atomami z nanorurki węglowej jak to pokazano na Rys. 7.2. C i D. Wtedy wszystkie atomy węgla (ich współrzędne) z szablonów biorące udział w wiązaniach, kątach płaskich oraz torsyjnych stają się atomami z nanorurki. Nowe wiązania, kąty płaskie oraz kąty torsyjne, są dodawane do ogólnej topologii tylko wtedy, gdy atom węgla

z końcówki CNT do której dodawana jest grupa funkcyjna jest częścią tego komponentu. Nowe pojawiające się interakcje 1-4 LJ (oddziaływania 1-4 LJ to oddziaływania atomów rozdzielonych trzema wiązaniami kowalencyjnymi, tzw. „trzecie sąsiedztwo”), zostały odpowiednio dostosowane tak, aby były zgodne z zasadami tworzenia pola siłowego AMBER. Na koniec zsumowano częściowe ładunki atomów, tworzące pierścienie benzenowe w szablonach i ustalono ładunek efektywny na atomie węgla CNT, do którego dodano grupę funkcyjną. Pozostałe atomy węgla w CNT były neutralne pod względem ładunku.

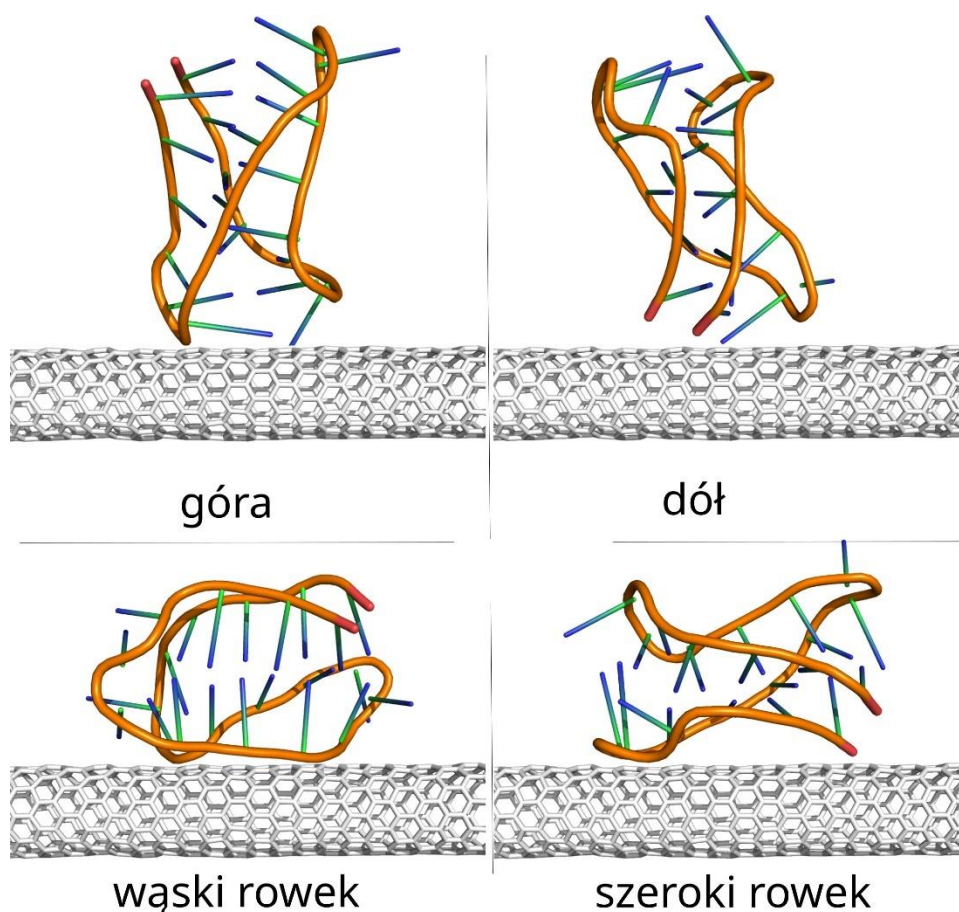
Liczba grup funkcyjnych dodanych do CNT była różna w zależności od rozważanych warunków. W przypadku obniżonego pH, tj. gdy i-motif przyjmuje protonowaną formę iMp, CNT jest funkcjonalizowana zarówno grupami $-NH_2$ jak i $-NH_3^+$, ponieważ protonowanie grup aminowych jest wysoce prawdopodobne w takich warunkach. Całkowita liczba grup aminowych zależy od parametrów chiralności CNT. Do CNT (10,0) dodano 3 grupy aminowe po każdej stronie nanorurki (łącznie 6). Połowa z nich była neutralna, a połowa protonowana. W przypadku CNT (20,0) liczba grup była podwojona. Przy obojętnym pH, gdy iM jest nieprotonowany, liczba grup funkcyjnych była taka sama, ale wszystkie były w natywnej formie nieprotonowanej. Liczby grup guaninowych były takie same jak w przypadku aminowych, jednakże reszty guaninowe były takie same bez względu na to, które pH było brane pod uwagę.

Wszystkie obliczenia były przeprowadzone przy użyciu programu LAMMPS z 2 fs krokiem całkowania w zespole izobaryczno-izotermicznym (NPT). Ciśnienie i temperaturę kontrolowano przy użyciu barostatu Nose-Hoovera. Sferyczna granica dla oddziaływań międzyatomowych wynosiła 12 Å. We wszystkich kierunkach zastosowano periodyczne warunki brzegowe. Rozmiary pudełek symulacyjnych wynosiły około 100x100x130 Å, a liczba cząsteczek wody wynosiła ok. 40 000. Łączna liczba atomów w pudełku symulacyjnym wynosiła ok 121 300. Rozpuszczalnik został uwzględniony w sposób jawny, stosując model cząsteczki wody TIP3P. W czasie symulacji cząsteczki wody były traktowane jako sztywne molekuły przy zastosowaniu algorytmu SHAKE. Etapy obliczeń związane z produkcją danych trwały zwykle co najmniej 45 ns. Ze względu na duże rozmiary układów i zastosowany potencjał AIREBO, ten czas symulacji był w rzeczywistości górną granicą rozsądnego czasu obliczeń. Jednocześnie ten czas okazał się wystarczający do wykrycia niestabilności strukturalnych lub różnic pomiędzy różnymi stanami układów.

7.2. Wyniki obliczeń i ich dyskusja

7.2.1. Położenie i-motifu na powierzchni CNT

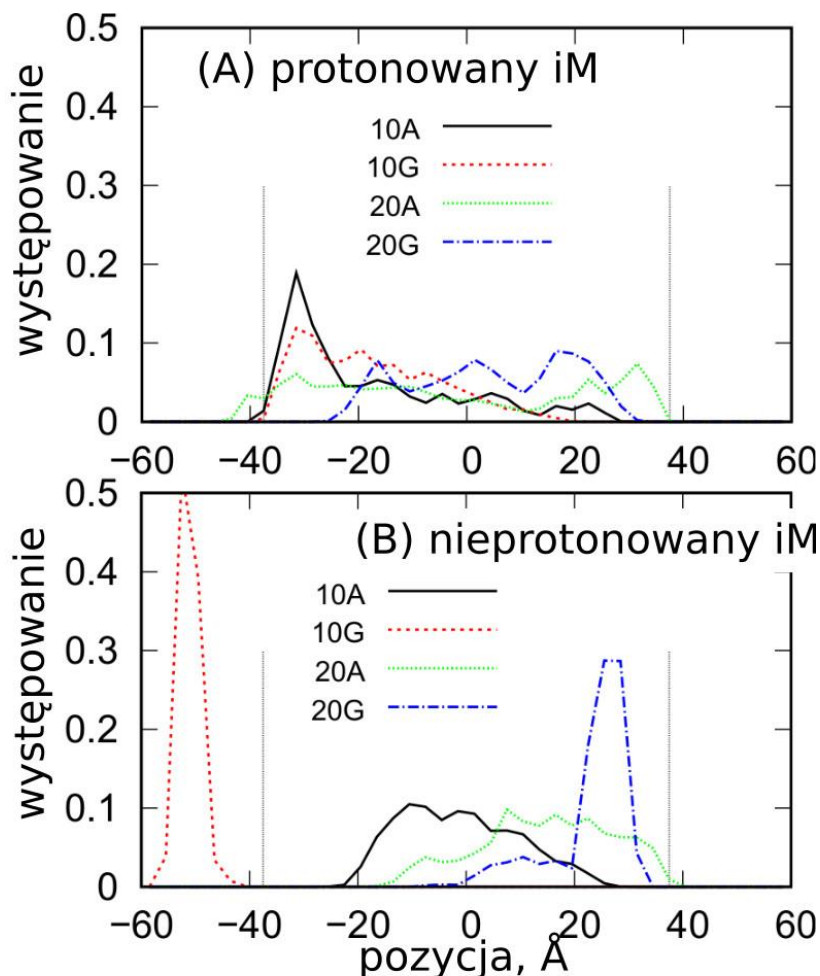
Analiza trajektorii uzyskanych z symulacji klasyczną dynamiką molekularną pozwala określić, w jaki sposób iM wiąże się z powierzchnią CNT. W każdym badanym układzie początkowa pozycja elementów układu była taka sama, tzn. iM był umieszczony pośrodku CNT i w sąsiedztwie powierzchni CNT końcami 3' i 5' oraz podstawą A11 skierowaną w kierunku powierzchni CNT. Takie rozmieszczenie w dalszym opisie nazywane będzie „dolną” orientacją iM względem powierzchni CNT. Inne możliwe orientacje to orientacja „górną”, gdy iM dotyka CNT swoimi podstawami A5 i A17, „wąski rowek”, gdy iM wiąże się z CNT swoją stroną z węższym rowkiem, „szeroki rowek”, gdy iM wiąże się z CNT stroną z szerszym rowkiem. Wymienione orientacje są schematycznie pokazane na rysunku 7.3.



Rys. 7.3. Orientacje i-motifu w odniesieniu do powierzchni nanorurki.

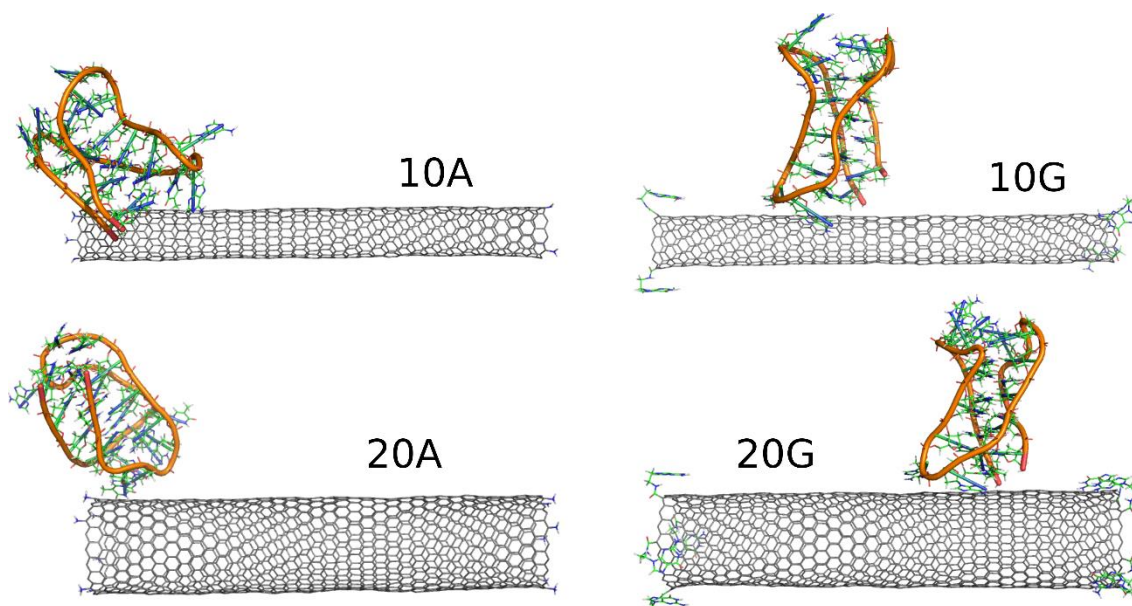
Najpierw poddano analizie najbardziej prawdopodobne położenie iM na CNT bez uwzględniania konkretnej określonej powyżej orientacji. Pozycję taką zdefiniowano jako rzut środka masy iM na oś CNT, a następnie określono prawdopodobieństwo znalezienia

danego rzutu w całym czasie symulacji. Rys. 7.4. przedstawia wykresy tych prawdopodobieństw dla każdego rozpatrywanego układu.



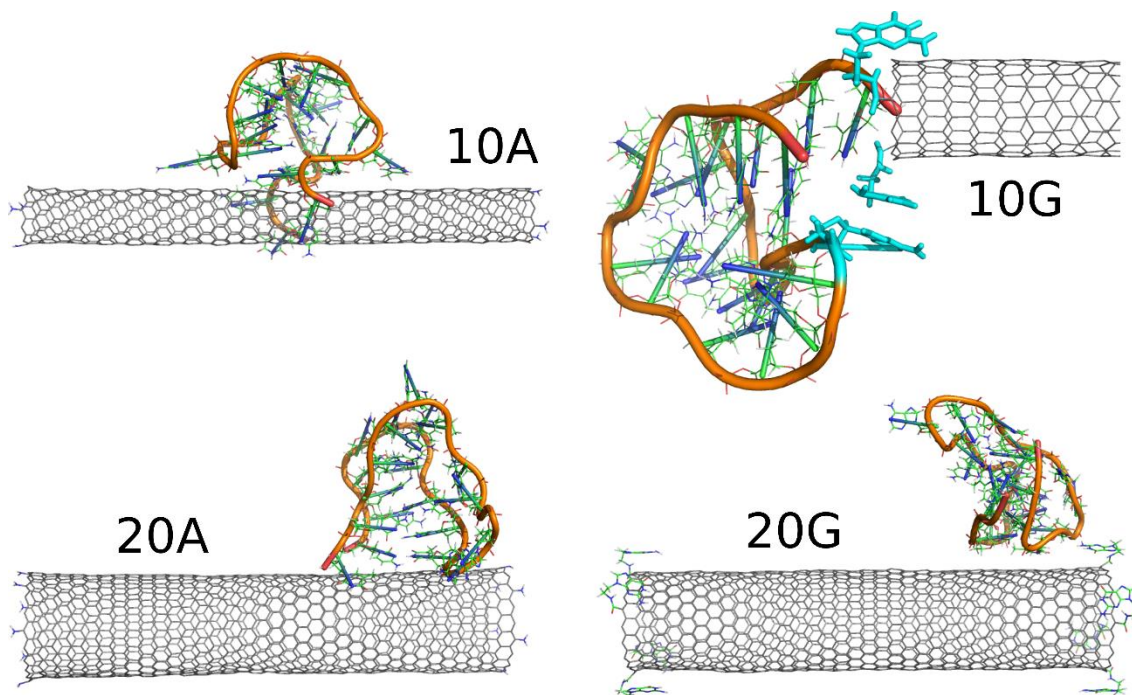
Rys. 7.4. Pozycje iM na CNT zdefiniowane jako rzut środka masy iM na oś CNT. Końce CNT są oznaczone pionowymi liniami przerywanymi umieszczonymi w odległości $\pm 37,5$ Å, a zero jest punktem odpowiadającym środkowi CNT. "Występowanie" oznacza jak często obserwowany był środek masy iM w danej pozycji na osi CNT. Część (A) dotyczy sytuacji z protonowanym iM, część (B) z nieprotonowanym iM. Oznaczenie linii jest następujące: 10A oznacza CNT (10,0) sfunkcjonalizowaną grupami aminowymi; 10G to CNT (10,0) sfunkcjonalizowana resztami guaniny; 20A i 20G oznaczają CNT (20,0) sfunkcjonalizowane odpowiednimi grupami.

Jak widać na Rys. 7.4.(A) protonowany iM jest wysoce ruchliwy na powierzchni CNT. Wszystkie rozkłady są raczej płaskie, co oznacza, że każda lokalizacja na powierzchni CNT jest równie prawdopodobna. Pewnym wyjątkiem jest CNT (10,0) z protonowanym iM (układ 10A), dla którego można zaobserwować pik po lewej stronie. Na Rys.7.5. pokazano konfiguracje, odpowiadające najwyższym pikom na powyższych wykresach dla protonowanej struktury iM. Wizualna kontrola struktur iM zaadsorbowanych na powierzchni CNT prowadzi do wniosku, że iM nie zmienia swojego kształtu przestrzennego, a grupy funkcyjne zlokalizowane na końcówkach CNT nie biorą udziału w wiązaniu iM z CNT.



Rys. 7.5. Wizualizacje symulacji wykonane dla układów z protonowanym iM w pozycjach najbardziej reprezentatywnych, określonych za pomocą wykresów z Rys. 7.4. (A).

Inne zachowanie obserwuje się w przypadku nieprotonowanego iM. Na Rys. 7.4. (B) widać bardzo ostry pik dla układu 10G i mniej ostry, ale nadal dobrze rozdzielony dla przypadku 20G. Pozostałe układy nie ujawniają pików, ale rozkłady pozycji iM świadczą, że nieprotonowany iM jest zdecydowanie mniej ruchliwy na powierzchni CNT. Rys. 7.6. przedstawia najbardziej reprezentatywne konfiguracje uzyskane z całych przebiegów symulacji, przeprowadzonych w ciągu 45 ns dla układów z nieprotonowanym iM.



Rys. 7.6. Wizualizacje symulacji wykonane dla układów z nieprotonowanym iM w najbardziej reprezentatywnych pozycjach, określonych na podstawie danych z Rys. 7.4 (B). Układ 10G jest przedstawiony w powiększeniu, aby lepiej pokazać w jaki sposób iM wiąże się z CNT.

W przypadku nieprotonowanego iM możemy zaobserwować, że struktura iM ulega znacznemu pogorszeniu po interakcji z CNT. Wąskie nanorurki (10,0) wydają się bardziej skuteczne w niszczeniu struktury iM. W układzie 10A iM próbuje owinać CNT, chociaż proces ten nie został sfinalizowany w dostępnym czasie symulacji. Finalizacja tego procesu wymagałaby znacznie więcej czasu w standardowych obliczeniach bez stosowania bias'u. W przypadku układu 10G, iM został unieruchomiony na końcu CNT, próbując dostać się końcem 3' do wnętrza CNT. Adenina A12 stanowiąca fragment iM oddziałuje również z grupą funkcyjną nanorurki, jednak ta interakcja nie jest specyficzna, ponieważ nie powstaje tutaj wiązanie wodorowe.

Szersze CNTs (20,0) są mniej skuteczne w pogarszaniu symetrii iM. W układzie 20A iM jest raczej nienaruszony i swobodnie migruje po powierzchni CNT. W przypadku 20G struktura iM jest nadal niezdeformowana, ale tutaj nastąpiło pewne unieruchomienie iM z powodu interakcji z grupą funkcyjną CNT. Jednak ta interakcja nadal nie jest specyficzna, ponieważ zachodzi głównie między częściami szkieletu fosforanowego reszt A5 i A6 a grupą funkcyjną – guaniną.

Kolejną informacją, którą wywnioskowano z analizy trajektorii MD, jest wzajemne ułożenie iM i CNT. W tym celu przeanalizowano wszystkie klatki symulacyjne i sklasyfikowano chwilowe orientacje iM zaadsorbowanego na powierzchni CNT na cztery kategorie, które zostały już zdefiniowane powyżej jako orientacja dolna, górna, wąskiego i szerokiego rowka (Rys. 7.5). Struktura iM we wszystkich badanych układach była początkowo umieszczana w pobliżu powierzchni CNT w tej samej orientacji tj. dolnej, a po okresie równowagowania iM przyjmował swoje preferowane ułożenie względem CNT. Struktury iM nie zmieniały już swojego ułożenia do końca trwania symulacji. Podczas przebiegu symulacji obserwowano tylko niewielkie odchylenia od preferowanych pozycji. Tabela 7.1. pokazuje jakie orientacje iM względem CNT zaobserwowano dla analizowanych układów.

Tabela 7.1. Obserwowane wzajemne ułożenie iM i CNT

układ	10A	10G	20A	20G
protonowany iM	szeroki rowek	dół	wąski rowek	dół
nieprotonowany iM	wąski rowek (zawijanie)	-	szeroki rowek	wąski rowek

Jak widać w Tabeli 7.1, protonowany iMp spędza cały czas w trzech z czterech możliwych orientacji. Najbardziej dominuje orientacja dolna, ale może to być związane

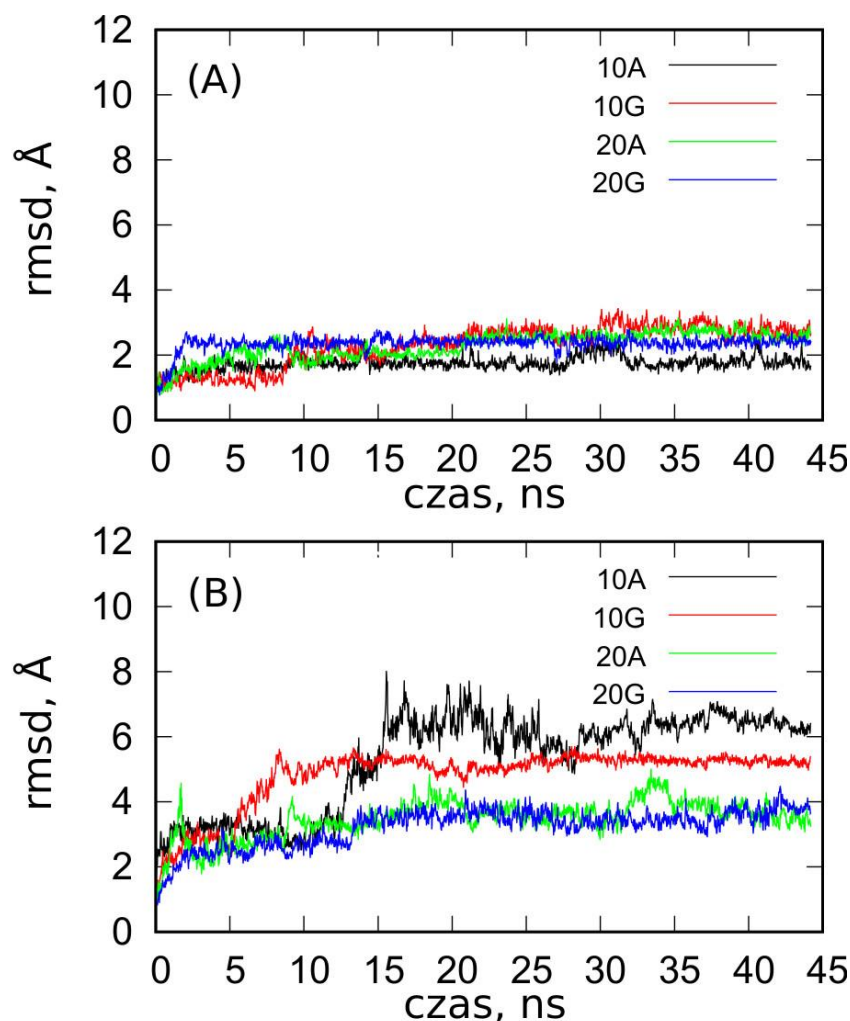
z początkową orientacją startową. Wymaga to bardziej szczegółowej analizy, obejmującej symulacje sterowaną MD i oszacowanie energii wiązania w rozważanych orientacjach. W przeprowadzonych symulacjach, iMp zachowuje nienaruszoną strukturę przestrzenną i nie zmienia swojej orientacji w poszczególnych układach w zastosowanym czasie symulacji. Nie można jednak stwierdzić, że są to orientacje odpowiadające najniższej energii. Orientacje te pojawiły się spontanicznie i prawdopodobnie istnieją bariery energetyczne, związane z przechodzeniem z jednej orientacji do drugiej.

Nieprotonowany iM wykazuje bardziej złożone zachowanie. W szczególności interakcja z CNT (10,0) prowadzi do nieokreślonej orientacji w przypadku układu 10G lub rozerwania iM w układzie 10A. W układzie 10A, iM spędził trochę czasu w orientacji wąskiego rowka, ale ostatecznie iM zaczął owijać CNT, co wiązało się ze zniszczeniem symetrycznej struktury iM. W układzie 10G, iM został unieruchomiony przy końcówce nanorurki, dlatego jego orientacja względem powierzchni CNT jest nieokreślona. Nanorurki o chiralności (20,0) są mniej destrukcyjne dla iM, ponieważ analizowane struktury DNA były mniej zniszczone i spędzały cały czas symulacji w orientacji szerokiego lub wąskiego rowka.

7.2.2. Analiza zmian struktury i-motifu podczas adsorpcji na powierzchni nanorurki węglowej w analizowanych układach

Adsorpcja iM na powierzchni nanorurki wpływa również na jego strukturę wewnętrzną, ale zakres zmian zależy głównie od stanu protonacji iM. Rys. 7.7. przedstawia zmianę wartości rmsd w funkcji czasu dla wszystkich badanych układów. Wykresy rmsd wyznaczono dla wszystkich atomów, tworzących iM porównując ich położenie do struktury wyjściowej, stanowiącej stan odniesienia. Stanami odniesienia były stany z zerowego kroku czasowego symulacji.

Jak widać protonowany iMp nie zmienia swojej wewnętrznej struktury po adsorpcji na powierzchni CNT. Na podstawie wykresów z Rys 7.7 (A) wydaje się, że średnica nanorurki oraz grupa funkcyjna nie mają wpływu na strukturę iMp. Występujące niewielkie zmiany pomiędzy analizowanymi układami są nieznaczące.



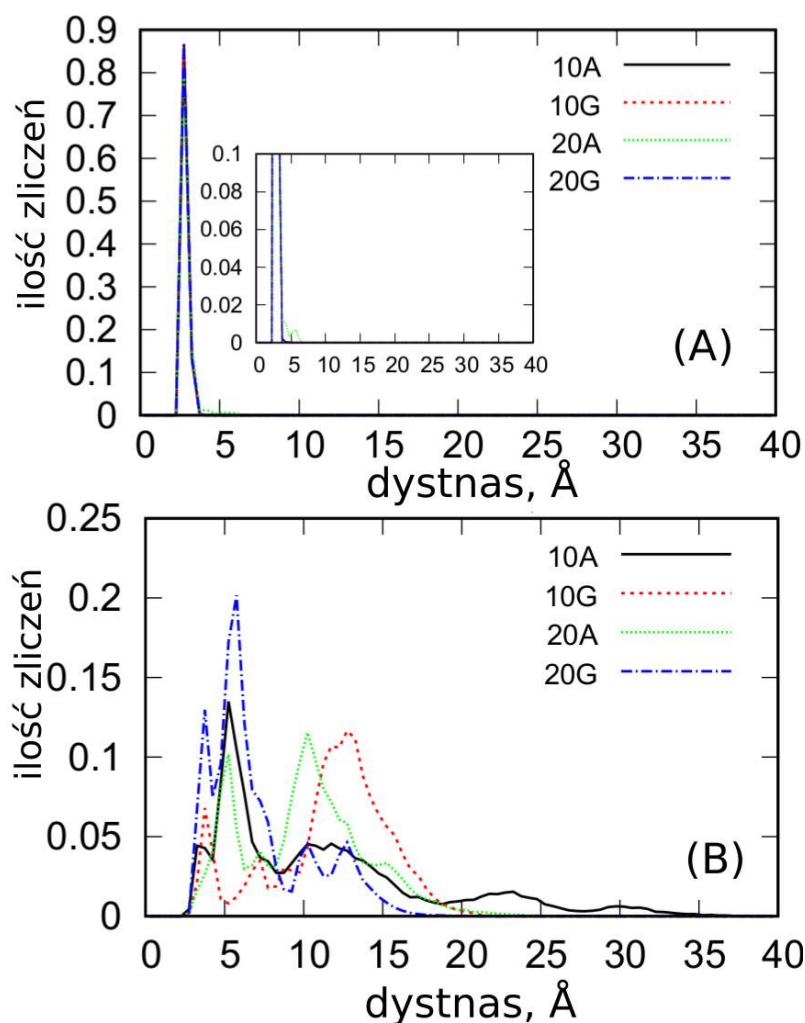
Rys. 7.7 Wykresy pierwiastka średniego kwadratowego przemieszczenia atomów (*rmsd*) w funkcji czasu, wyznaczone dla iM w rozpatrywanych układach. (A) protonowany iMp i (B) nieprotonowany iM.

Z kolei struktura nieprotonowana iM jest silnie uzależniona od adsorpcji na powierzchni CNT. Rys. 7.7. (B) pokazuje, że *rmsd* znacznie wzrasta w czasie, co świadczy o degradacji tych struktur. Średnica nanorurek wydaje się być czynnikiem bezpośrednio wpływającym na tempo degradacji. Zastosowanie węższych nanorurek prowadzi do intensywniejszych zmian strukturalnych w porównaniu do szerszych CNTs. W podrozdziale 7.2.1. rzeczywiście zauważono, że iM zaczął rozwijać się i zawijać wokół CNT w przypadku układu 10A, a w układzie 10G szybko wyszedł poza CNT i kontynuował degradację podobnie jak izolowany iM. Już z wcześniejszych badań wiadomo, że nieprotonowany iM spontanicznie rozwija się do struktury spinki do włosów. Z drugiej strony w przedstawionych w literaturze badaniach stwierdzono, że jednościenne nanorurki węglowe są w stanie selektywnie stabilizować ludzką telomerową strukturę iM przy neutralnym pH (Peng i in. 2009; Shamas 2011).

Przedstawione wyniki sugerują jednakże, że wąskie jednościenne nanorurki przyspieszają proces degradacji iM.

Chen i wsp. (Chen i in. 2012) zaobserwowali istotną stabilizację iM tylko w obecności karboksylowanych CNTs i jedynie słaby efekt stabilizacji przy użyciu CNTs, funkcjonalizowanych grupami aminowymi. Dlatego prawdopodobne jest, że obecność grup karboksylowych (lub innych zdolnych do uwalniania protonów) jest czynnikiem decydującym, a oddziaływanie karboksylowanej CNT z nieprotonowanym iM prowadzi najpierw do przejścia nieprotonowanego iM do jego protonowanej formy iMp, a to z kolei prowadzi do tworzenia trzeciego wiązania wodorowego między cytozynami i stabilizacji struktury iM. Prawdopodobną hipotezą jest więc, że obserwowana w tych pracach stabilizująca rola karboksylowanych CNTs może wynikać z lokalnego obniżenia pH i późniejszego przejścia nieprotonowanego iM do jego formy protonowanej, która jest wysoce stabilna. Na Rys. 7.7. (B) widać, że szersze nanorurki (20,0) wpływają na strukturę iM w mniejszym stopniu niż wąskie, tak więc średnica nanorurki ma istotny wpływ na interakcję z iM.

Dodatkowe ważne informacje dla analizy stabilności struktury iM, pochodzą z oceny odległości między atomami, które mogą tworzyć wiązania wodorowe. Atomy te są zdefiniowane na Rys. 7.1. B, C, a cytozyny biorące udział w tworzeniu wiązań wodorowych zaznaczono na Rys. 7.1. A. W przypadku struktury iMp może powstać maksymalnie 18 wiązań wodorowych, podczas gdy w przypadku iM maksymalna ilość wiązań wodorowych wynosi 12. Występowanie wiązań w analizowanych układach pokazano na Rys. 7.8. Reprezentowane są jako odległości między atomami tworzącymi wiązania wodorowe, a dokładniej jako prawdopodobieństwo wystąpienia danej odległości. Odległość około 3 Å lub mniej jest wskaźnikiem wiązań wodorowych, podczas gdy większe odległości oznaczają brak wiązań wodorowych między atomami, które mogłyby je utworzyć.



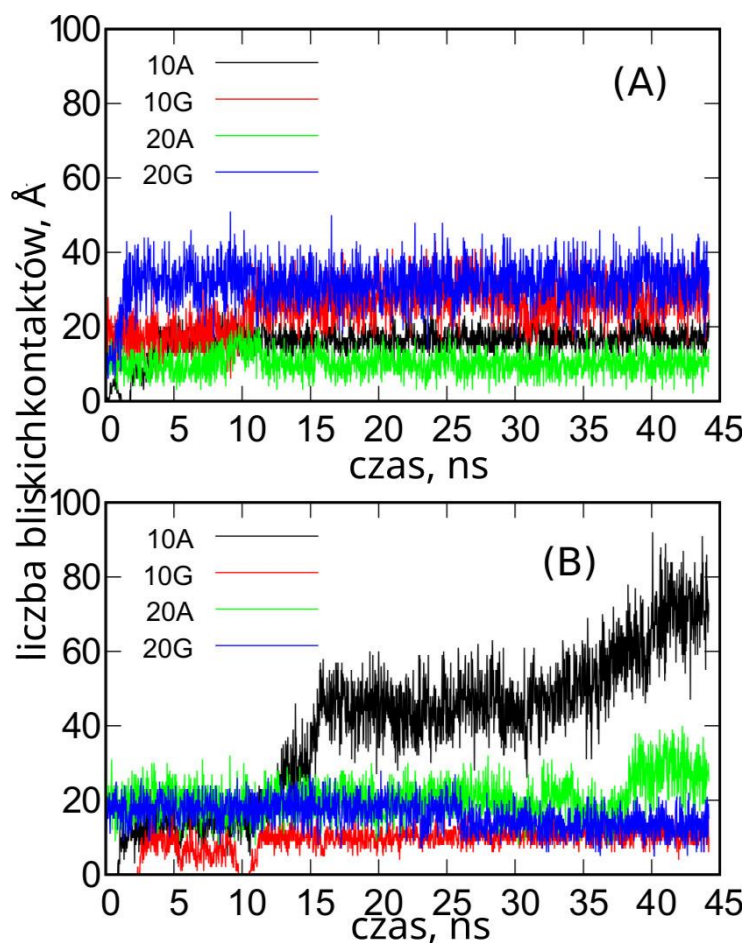
Rys. 7.8. Histogramy odległości między atomami zdolnymi do tworzenia wiązań wodorowych, jak pokazano na Rys. 7.1. (A) protonowany iMp (B) nieprotonowany iM.

Jak widać na powyższych wykresach, na stabilność protonowanego iMp oddziaływanie z nanorurkami nie ma wpływu. Pojedynczy i bardzo ostry pik przy 2,8 Å oznacza, że iMp zachowuje wszystkie swoje wiązania wodorowe podczas interakcji z nanorurką. Wstawka na Rys. 7.8. (A) potwierdza, że tylko w przypadku układu 20A wystąpiły bardzo małe przemieszczenia. Zupełnie inny obraz jest obserwowany dla nieprotonowanego iM na Rys. 7.8. (B). W tym przypadku wiązania wodorowe w rzeczywistości nie istnieją, tylko bardzo mały ułamek odległości został sklasyfikowany jako mniejszy niż 3 Å. Zatem iM w tym przypadku nie jest utrzymywany przez wiązania wodorowe i nie można tego przypisać wyłącznie oddziaływaniu z nanorurkami. Dzieje się tak, ponieważ nieprotonowany iM spontanicznie traci wiązania wodorowe, chociaż jego struktura przestrzenna jest z grubsza zachowana. W pracy Wolski i wsp. (Wolski, Nieszporek, i in. 2019) określono średnie odległości między atomami tworzącymi wiązania wodorowe, a otrzymane wyniki były podobne do przedstawionych powyżej, tj.

większość odległości mieściła się w zakresie od 5 do 10 Å. Zatem nanorurki węglowe nie zmieniają w dużym stopniu przestrzennej struktury iM, ale możemy stwierdzić, że wąskie nanorurki ułatwiają rozwijanie iM i prowadzą do pojawienia się większych odległości niż szersze (20,0) nanorurki.

7.2.3. Interakcje iM z CNT

Jak już wcześniej pokazano na Rys. 7.5. i 7.6, i-motify adsorbują się na powierzchniach nanorurek w rozważanych warunkach. Jednak siła adsorpcji różni się w zależności od układu, dlatego wymaga to wnikliwszej analizy. W Tabeli 7.2 zebrano średnie energie interakcji między iM a CNT. Jednocześnie przydatna jest analiza liczby bliskich kontaktów między atomami, tworzącymi iM i atomami tworzącymi nanorurki węglowe. Kontakt określono poprzez analizę odległości między parą atomów. Gdy odległość ta była mniejsza niż 3.5 Å przyjmowano, że atomy te są w kontakcie. Wyniki tej analizy przedstawiono na Rys. 7.9.



Rys. 7.9. Liczba bliskich kontaktów wyznaczonych pomiędzy atomami tworzącymi iM i atomami węgla tworzącymi CNT. (A) układy z iMp, (B) układy z iM.

Tabela 7.2. Średnie energie oddziaływań między iM a CNT, określone na podstawie ostatnich 24 ns symulacji *

Układ		10A	10G	20A	20G
Protonowany iMp	całkowita	-172	-283	-122	-306
	CNT	-159	-254	-116	-302
Nieprotonowany iM	całkowita	-442	-235	-207	-240
	CNT	-442	-76	-206	-165

* Energie dzielą się na dwie kategorie: „całkowita” to ogólna energia oddziaływań par między iM, a całą sfunkcjonalizowaną CNT; „CNT” oznacza energię interakcji par między iM i tylko atomami węgla tworzącymi CNT. Wszystkie energie podane są w kJ mol^{-1} i zawierają energie Lennarda-Jonesa i energie oddziaływań elektrostatycznych.

Analizując wartości energii interakcji zebrane w Tabeli 7.2., widać, że siła adsorpcji zmienia się znacząco w zależności od rozpatrywanego układu, a energie te dobrze korelują z liczbą bliskich kontaktów (Rys. 7.9.). Najsilniejsza adsorpcja występuje w przypadku układu 10A, w którym nieprotonowany iM rozpoczął owijanie CNT, co widać na Rys. 7.9.B w postaci rosnącej liczby bliskich kontaktów w czasie. Pozostałe układy są bardziej statyczne, a liczba bliskich kontaktów szybko osiąga pewną stałą wartość i pozostaje prawie bez zmian do końca obliczeń. Jednak nadal istnieją znaczące różnice w energiach interakcji. Niektóre z nich są łatwe do uzasadnienia, poprzez wizualną analizę otrzymanych trajektorii, ale inne są wynikiem mniej oczywistych efektów. Na przykład duże różnice między energiami oddziaływań, wyznaczonych dla całych sfunkcjonalizowanych CNTs i tylko dla CNTs bez grup funkcyjnych dla iM w układach 10G i 20G, wynikają z konfiguracji przestrzennych i-motifu wzmacniających kontakty z grupami funkcyjnymi. W niektórych przypadkach różnice te są bardzo małe (20G-iMp i 20A-iM), co oznacza, że i-motif rzadko odwiedzał strefy końcowe CNT.

Pomijając układ 10A+iM, w którym następuje owijanie nanorurki, najsilniejsza adsorpcja występuje w protonowanych układach iMp 20G i 10G. W tych przypadkach zgodnie z Tabelą 7.1. iMp przyjmuje pozycję dolną i dlatego takie ustawienie wydaje się być najbardziej preferowane energetycznie. Inne pozycje określone w Tabeli 7.1. zapewniają mniej kontaktów i przez to słabszą energię interakcji. Jednak i-motyfy pozostają w tych orientacjach, ponieważ przejście do orientacji dolnej wiąże się z pokonaniem barier energetycznych.

Generalnie protonowany iMp wykazuje silniejszą adsorpcję na powierzchni CNT niż nieprotonowany (z wyjątkiem układu 10A). Jest to nieco nieoczekiwane, ponieważ

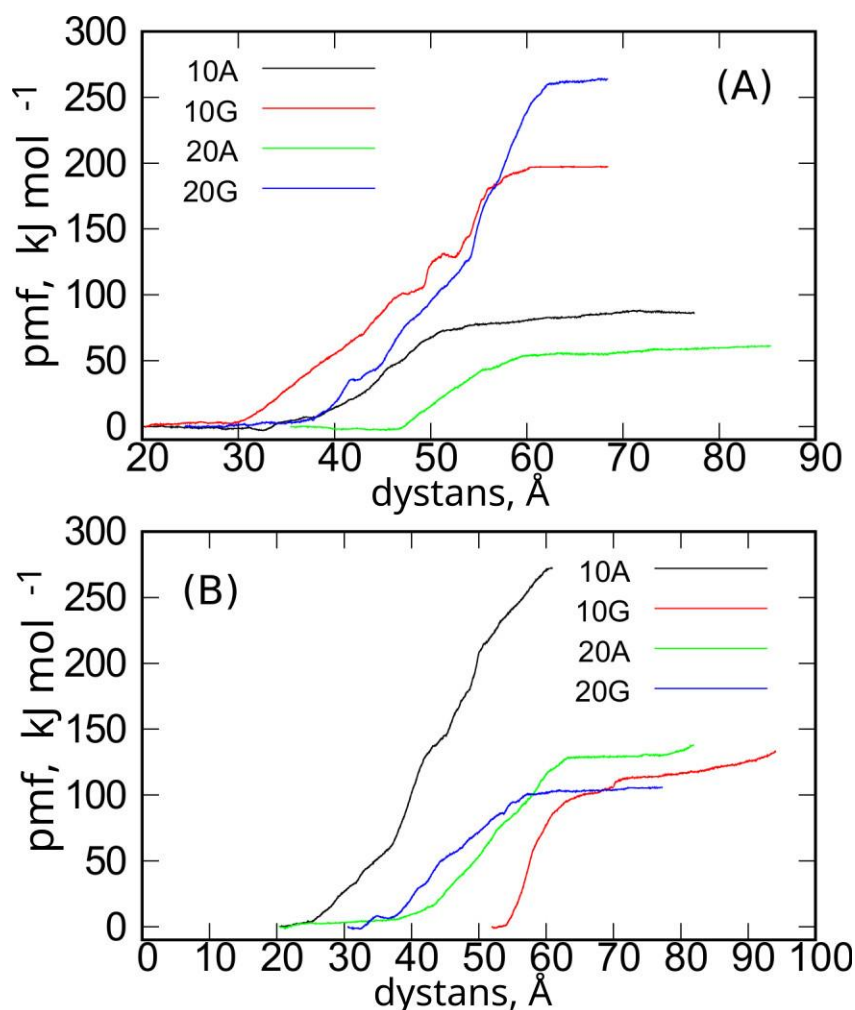
nieprotonowany iM jest bardziej elastyczny i powinien lepiej pasować do powierzchni CNT, a zatem zwiększać liczbę bliskich kontaktów i energię interakcji. Jednak wynik jest inny, a uzasadnienie tej obserwacji można opierać na różnicach w gęstości atomowej układów iMp i iM. Protonowany iMp jest ciasną i sztywną strukturą, a co za tym idzie jego gęstość atomowa jest wyższa niż gęstość nieprotonowanego iM, który jest bardziej luźną strukturą. Dlatego iMp tworzy więcej kontaktów z atomami w strukturze CNT, co zwiększa jego energię interakcji z CNT.

7.2.4. Wymuszone odrywanie iM od powierzchni CNT

W celu dokładniejszego przebadania stabilności adsorpcji iM na powierzchni CNT, podjęto próby pomiaru profili energii swobodnej związanych z wymuszonym odłączaniem iM od powierzchni CNT. Tego typu obliczenia są bardzo wymagające nawet w przypadku prostych układów o niewielkiej liczbie atomów. W przypadku rozpatrywanych układów, obejmujących nanorurki węglowe, reaktywny potencjał AIREBO i transfer dużych grup atomów, określenie energii swobodnej jest prawie niemożliwe. Jeśli jednak oprzemy się na wcześniej już stosowanym mniej dokładnym podejściu, bazującym na ograniczonej liczbie trajektorii wziętych do uśrednienia, możemy uzyskać potencjał średniej siły przy zastosowaniu rozsądnej iskali czasowej. Po wstępnym wyborze dostępnych metod i wariantów wyboru współrzędnych reakcji, ostatecznie przyjęto następujący schemat.

Odrywanie i-motifu przeprowadzano przy pomocy sterowanej dynamiki molekularnej, smd (Fiorin, Klein, i Hénin 2013). Zdefiniowano odległość między środkami masy iM a nanorurki. Odległość ta rosła liniowo w czasie, tj. ze stałą prędkością, dzięki zastosowaniu zaprogramowanej zewnętrznej harmonicznej siły, działającej między tymi środkami mas. Mierząc średnie siły działające na środki mas i próbując skompensować przyłożoną siłę zewnętrzną, można określić prace (W), wykonane podczas przejścia, przez całkowanie sił i przemieszczeń. Według stosowanej już zależności Jarzyńskiego i powiązanej z nią nierówności $\Delta F \leq W$, energia swobodna jest nie większa niż średnia praca wykonana na układzie podczas przejścia ze stanu równowagi początkowej do stanu końcowego.

Dobre oszacowanie prawdziwej wartości energii swobodnej ΔF jest średnią wykładniczą zgodnie z równaniem 4.6. Zbieżność energii swobodnej wyznaczona tą metodą nie jest jednak zadowalająca ze względu na uśrednienie wykładnicze. Dlatego dla uzyskania ΔF z dobrą dokładnością potrzebne są tysiące niezależnych trajektorii. Jest to możliwe w przypadku prostych układów z przejściami kilku atomów, ale w przypadku analizowanych tutaj układów jest to niemożliwe. Zamiast tego użyto tylko trzech niezależnych trajektorii, a otrzymany wynik nazwano potencjałem średniej siły, pmf. Wielkość ta jest, zgodnie z twierdzeniem Jarzyńskiego, nie mniejsza niż rzeczywista energia swobodna, czyli reprezentuje górną granicę zmiany energii swobodnej.

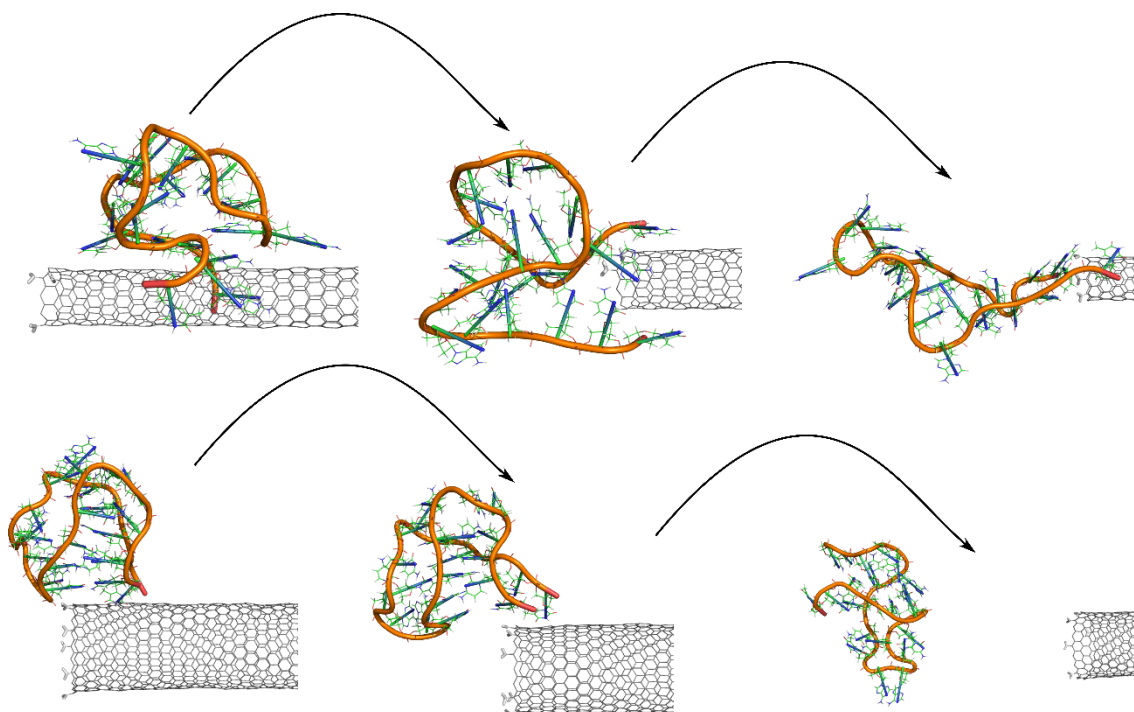


Rys. 7.10. Potencjały średniej siły wyznaczone podczas wymuszonego odrywania *iM* od powierzchni CNT, uzyskane za pomocą sterowanej dynamiki molekularnej, *smd*. (A) układy z *iMp* (Rys. 7.5.), (B) układy z nieprotonowanym *iM* (Rys. 7.6.).

Rys. 7.10. pokazuje profile pmf wyznaczone metodą *smd* dla każdego badanego układu. Są to zawsze krzywe w kształcie liter S typowe dla przejść z pojedynczą barierą energetyczną. Jak wynika z analizy trajektorii, bariery te są związane z oderwaniem się *iM* od końcówek CNT. Początkowe płaskie odcinki pmf, odpowiadające ok. zeru energii,

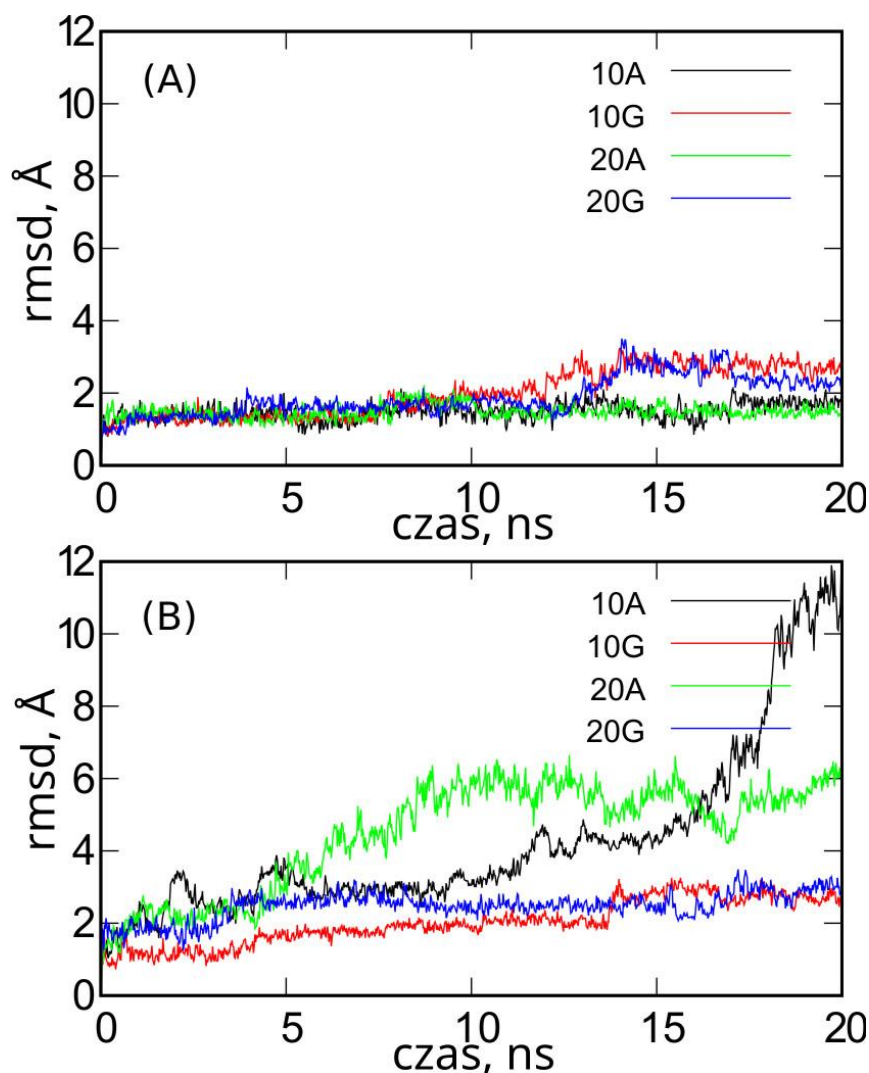
są związane z ruchami iM na powierzchniach CNT w kierunku jednego z jej końców. Oznacza to, że bezpośrednia desorpcja iM z CNT w kierunku prostopadłym do osi CNT jest niekorzystna energetycznie. Zaobserwowano to we wszystkich badanych przypadkach.

Początkowe płaskie sekcje pmf'ów zaczynają się w różnych odległościach, ponieważ początkowe konfiguracje dla różnych układów odpowiadały różnym odległościom między środkami mas iM i CNT. Oznacza to, że iM potrzebował więcej lub mniej czasu, aby dotrzeć do brzegu CNT, gdzie pmf zaczął wzrastać. Te rosnące odcinki krzywych pmf odpowiadają odrywaniu iM od końcówek CNT, za nimi następują długie płaskie odcinki, które są związane z ruchem iM w wodzie. Proces ten jest zilustrowany graficznie na Rys. 7.11 dla układów 10A i 20A z nieprotonowanymi iM.



Rys. 7.11. Graficzne przedstawienie wymuszonego odrywania iM od powierzchni CNT. Górna sekwencja przedstawia konfigurację początkową, środkową i końcową dla układu 10A z nieprotonowanym iM. Dolna część przedstawia tę samą sekwencję dla układu 20A z nieprotonowanym iM.

Wybrano te układy, ponieważ ujawniały znaczne deformacje struktur iM zachodzące jednocześnie z oderwaniem się od powierzchni CNT. Pozostałe układy nie wykazywały wewnętrznej degradacji struktury iM. Potwierdzają to wykresy rmsd wyznaczone dla wymuszonych oderwań iM od powierzchni CNT pokazane na Rys. 7.12.



Rys. 7.12. Rmsd wyznaczone dla wymuszonego odrywania i-motifu od powierzchni CNT. (A) Układy z protonowanym iMp; (B) układy z nieprotonowanym iM.

Wartości rmsd na Rys. 7.12 zostały przygotowane przy użyciu jako struktur odniesienia konfiguracji z poprzednich obliczeń dynamiką molekularną. Odpowiadają one konfiguracjom na Rys. 7.5 i 7.6. Rosnąca wartość rmsd podczas odrywania się iM jest miarą deformacji wewnętrznej struktury iM, będącej wynikiem desorpcji całej struktury z powierzchni CNT. Potencjały średniej siły są dobrymi deskryptorami stabilności termodynamicznej adsorpcji iM na powierzchniach CNT. Najmniej stabilne są układy 10A i 20A, w których protonowany iMp (Rys. 7.10.) ujawnia bariery energetyczne około 85 i 60 kJ mol⁻¹ przeciwko desorpcji. Wartości te dobrze korelują z wcześniej analizowanymi średnimi energiami oddziaływań, ale są niższe (ich wartości bezwzględne). Prawdziwe swobodne energie są jeszcze mniejsze, ponieważ wyznaczone pmf'y reprezentują ich górne granice. Ogólny wniosek jest taki, że w tych układach desorpcja iMp może zachodzić spontanicznie na skutek wahań temperatury. Konfiguracje

węższego i szerszego rowka obserwowane dla tych układów należy sklasyfikować jako tymczasowe, być może długotrwałe, lecz niestabilne, ponieważ mogą one przechodzić w konfiguracje dolne, które z kolei są wysoce stabilne termodynamicznie. Wniosek ten wynika z analizy średnich energii oddziaływań w Tabeli 7.2. Energie dla układów 10G i 20G pochodzą głównie z interakcji z powierzchnią CNT, a wykład grup funkcyjnych jest niewielki. Ponadto układy 10G i 20G znajdują się w konfiguracji dolnej. Zatem przejścia od węższego i szerszego rowka do orientacji dolnej powinny być bardziej prawdopodobne niż trwała desorpcja i-motifów od CNT. Proces ten wymaga jednak znacznie dłuższego czasu niż jest dostępny w standardowych symulacjach dynamiką molekularną, ale w makroskopowej skali czasu może być dość szybki. Tak więc w przypadku protonowanego iMp należy w granicach makroskopowej skali czasu spodziewać się iMp, zaadsorbowanego na powierzchni CNT w orientacji dolnej, a adsorpcja powinna być stabilna, ponieważ pmf przewidują bariery energetyczne dla desorpcji rzędu 200-240 kJ mol⁻¹.

Nieprotonowane iM wykazują dość wysokie wartości pmf'ów, jak pokazano na Rys. 7.10 B. Oczywiście układ 10A jest dość charakterystyczny, ponieważ w tym przypadku rozwijanie okazało się łatwiejsze niż oderwanie. Jak widać na Rys. 7.11. iM z układu 10A jest rozplątany i nadal częściowo związany z powierzchnią CNT. Jego pierwotna struktura została utracona (Rys. 12.B), a cały proces wymaga ogromnej ilości energii (ponad 260 kJmol⁻¹). Ponieważ w tym przypadku iM owinał CNT, do pewnego stopnia można wnioskować, że desorpcja takiego rozwiniętego iM jest termodynamicznie zablokowana. Taki efekt jest prawdopodobnie związany z małą średnicą (10,0) nanorurek. Na podstawie tych obserwacji oczekuje się, że nanorurki (10,0) będą silnie oddziaływać z iM i tworzyć formy termodynamicznie zablokowane.

Pozostałe układy, zawierające nieprotonowany iM (10G, 20A i 20G), wykazują dość podobne wartości barier energetycznych przeciwko desorpcji, tj. 95-130 kJ mol⁻¹. Wśród nich układ 20G ulega znacznym odkształceniom podczas procesu desorpcji, ale w tym przypadku odłączenie się powiodło, chociaż wewnętrzna struktura iM została w pewnym stopniu zniszczona (Rys. 7.12.B). Pozostałe układy zachowują swoje początkowe struktury w stanie nienaruszonym podczas desorpcji, ponieważ wzrost rmsd jest spowodowany jedynie odkształceniami wynikającymi z fluktuacji termicznych. Pmf'y dobrze korelują ze średnimi energiami interakcji w Tabeli 7.2. Co ciekawe, konfiguracje węższego i szerszego rowka wydają się być dość stabilne termodynamicznie w przypadku iMs nieprotonowanych, w przeciwieństwie do iMs protonowanych dla

których układy te były układami o najniższej energii. Sugeruje to, że zmiany pH mogą prowadzić do odwracalnych zmian w układzie iM i CNT, jednak ta hipoteza wymaga weryfikacji eksperymentalnej.

7.3. Podsumowanie wyników

Analiza interakcji krótkich sekwencji i-motifu z nanorurkami węglowymi prowadzi do kilku ważnych wniosków. Wykazano, że nieprotonowany iM lub jego protonowany odpowiednik iMp adsorbują się na powierzchni nanorurek węglowych. Obecność grup funkcyjnych, zlokalizowanych na wierzchołkach CNT miała raczej minimalny wpływ na lokalizację lub siłę adsorpcji. Wyjątkiem był układ 10A, w którym nieprotonowany iM ześlizgnął się z powierzchni CNT, przymocował się bezpośrednio do końcówki i został unieruchomiony w tej pozycji. W innych układach iM mógł swobodnie migrować po powierzchni CNT, chociaż jego preferowana orientacja w kierunku CNT zmieniała się w zależności od układu.

Stwierdzono, że protonowany iMp jest stabilną i sztywną strukturą z wszystkimi wiązaniami wodorowymi utrzymywanymi również w stanie zaadsorbowanym. Jego energia adsorpcji była wysoka lub mała w zależności od orientacji względem CNT. Stwierdzono, że orientacja dolna jest bardzo stabilna, tym samym orientacje o słabszej energii adsorpcji (wąskie i szeroki rowek) należy uznać za czasowe i spontanicznie przechodzące w dolną w dłuższej skali czasowej. Średnica lub funkcjonalizacja końcówek CNT miała również minimalny wpływ na zachowanie iMp na powierzchni CNT.

Nieprotonowany iM okazał się trudniejszy w analizie, a jego zachowanie podczas interakcji z CNT nie da się łatwo sklasyfikować. Można jednak z całą pewnością stwierdzić, że średnica nanorurki ma tu bardzo istotny wpływ. Wąskie nanorurki prowadziły do szybkiej degradacji struktury przestrzennej iM, podczas gdy szersza (20,0) była mniej efektywna pod tym względem. W przypadku wąskich (10,0) nanorurek zaobserwowano albo próby owinięcia CNT przez iM, albo po prostu znaczny wzrost rmsd po adsorpcji iM. Jednak w każdym przypadku struktura iM uległa znacznej degradacji i po adsorpcji nie przetrwało żadne wiązanie wodorowe. Zdecydowanie nie zaobserwowano stabilizacji ani poprawy struktur przestrzennych iM w wyniku interakcji z funkcjonalizowanymi CNT. Rola grup funkcyjnych wszczepionych w strukturę CNT nie była zbyt oczywista; w rzeczywistości zwiększyło to energię interakcji par, ale te oddziaływania nie były specyficzne.

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że adsorpcja nieprotonowanego iM jest dość silna przy barierach energetycznych rzędu 95-130 kJ mol⁻¹ lub nawet więcej. Niektóre układy były tak silnie zaadsorbowane, że wymuszone oderwanie iM w sterowanych symulacjach doprowadziło do ich całkowitego zniszczenia przed desorpcją (układ 10A, w którym iM zaczęło owijać CNT). Jednak w większości przypadków desorpcje były udane. Chociaż jednoczesna degradacja struktur przestrzennych iM była ewidentna.

Stwierdzono zatem, że jednościenne CNTs nie mogą bezpośrednio stabilizować struktur nieprotonowanego iM z powodu prostych oddziaływań fizycznych, wynikających ze specyficznego kształtu CNTs. Zaobserwowano raczej odwrotny efekt: wąskie CNTs okazały się bardziej skuteczne w degradacji iM. W literaturze donoszono, że stabilizacja iM w fizjologicznym pH, będąca wynikiem interakcji z karboksylowanymi jednościennejmi CNTs, obejmuje bardziej złożone zjawisko. Jednym z nich może być transfer protonów z grupy karboksylowej do cytozyny, prowadzący do powstania półprotonowanej pary C:C⁺. W efekcie otrzymujemy wtedy protonowaną formę iMp, która rzeczywiście jest strukturą wysoce stabilną, również w stanie zaadsorbowanym. Ponieważ bezpośrednia analiza wspomnianego transferu protonów jest niemożliwa w klasycznych symulacjach dynamiką molekularną, te spostrzeżenia opierano na wnioskach pośrednich, płynących z analizy układów bez grup karboksylowych. Bardziej szczegółowe wnioski dotyczące tego mechanizmu będą przedstawione w kolejnych rozdziałach.

8. Badanie dynamiką molekularną oddziaływań pomiędzy nanorurką węglową a fragmentem DNA zawierającym G-quadrupleks i i-motif

Celem badań przedstawionych w tym rozdziale jest analiza przypadku bardziej istotnego z biologicznego punktu widzenia, tj. przypadku, w którym iM tworzy się w dupleksie telomerowego DNA. W takim przypadku komplementarna nić bogata w guaninę może zwinąć się w strukturę Gq, ponieważ niezbędne jony Na^+ są obecne w roztworze. Poddano więc wnikliwej analizie teoretycznej telomerowy fragment DNA, składający się z 45 nukleotydów w jednej nici, podobnie jak w rozdziale 6.1. W środku tego dsDNA utworzono dwie niekanoniczne formy: iM i Gq, a ta złożona struktura nazwana iG została poddana interakcji z dwoma rodzajami CNT o chiralności (10,0) i (20,0). CNTs na końcach sfunkcjonalizowano grupami guaninowymi lub pozostawiono bez funkcjonalizacji. Funkcjonalizacji karboksylowej nie zastosowano, aby najpierw zrozumieć w jaki sposób obecność nanorurki, bez możliwych procesów przenoszenia protonów, oddziałuje z iG. Analizowane w tej części układy okazały się szczególnie trudne z obliczeniowego punktu widzenia, ponieważ standardowa dynamika molekularna prowadziła do formowania stanów zablokowanych i dalekich od optymalnych termodynamicznie. Z drugiej strony zastosowanie metod rozszerzonego próbkowania prowadziło do niszczenia delikatnych fragmentów iM i Gq. W tym celu należało więc wypracować specjalną procedurę, która została opisana poniżej.

8.1. Szczegóły dotyczące budowy i symulacji badanych układów

Zastosowana w analizowanych badaniach metodyka opiera się na symulacjach dynamiką molekularną układów modelowych, składających się z funkcjonalizowanych nanorurek węglowych fCNTs oraz telomerowego fragmentu DNA z ugrupowaniem iG, w którym obecne są niekanoniczne formy Gq i iM. Zarówno fCNTs jak i iG były już opisywane w tej pracy, ale do tej pory były analizowane osobno. W związku z tym duża część zastosowanej tutaj metodologii, w tym generowanie topologii pudełek symulacyjnych i pól siłowych jest już opisana w tej pracy. Opis dotyczący budowy sfunkcjonalizowanych nanorurek węglowych ze wszystkimi szczegółami technicznymi znajduje się w podrozdziale 7.1. Jednak w poniższych badaniach skupiono się tylko na CNTs funkcjonalizowanych guaniną o dwóch chiralnościach (10,0) i (20,0). Z kolei

analizowany tutaj telomerowy fragment DNA w postaci ugrupowania iG jest taki sam, jak opisany w podrozdziale 6.1. Tak jak we wcześniejszych badaniach wygenerowano dwie wersje iG, odpowiadającą pH kwaśnemu i obojętnemu.

Biorąc pod uwagę, że w badaniach rozważano dwa rodzaje iG, różniące się stanem protonowania cytozyn oraz dwa rodzaje nanorurek różniących się chiralnością, mamy do czynienia z czterema różnymi układami: a10, a20, n10 i n20. Są to odpowiednio: protonowany iM z nanorurką (10,0), protonowany iM z nanorurką (20,0), nieprotonowany iM z nanorurką (10,0) oraz nieprotonowany iM z nanorurką (20,0).

Pudełka symulacyjne zawierały również odpowiednią ilość jonów Na^+ i Cl^- w celu skompensowania ładunku szkieletów fosforanowych i naśladowania siły jonowej roztworu $0,145 \text{ mol L}^{-1}$. Liczba cząstek wody wynosiła około 32 600 cząsteczek, a więc pudła symulacyjne zawierały łącznie około 102 000 atomów. Obliczenia tak jak w poprzednich przypadkach przeprowadzono przy użyciu pakietu LAMMPS w zespole statystycznym NPT z kontrolą ciśnienia i temperatury za pomocą barostatu Nosé-Hoovera.

8.2. Wyniki obliczeń i ich dyskusja

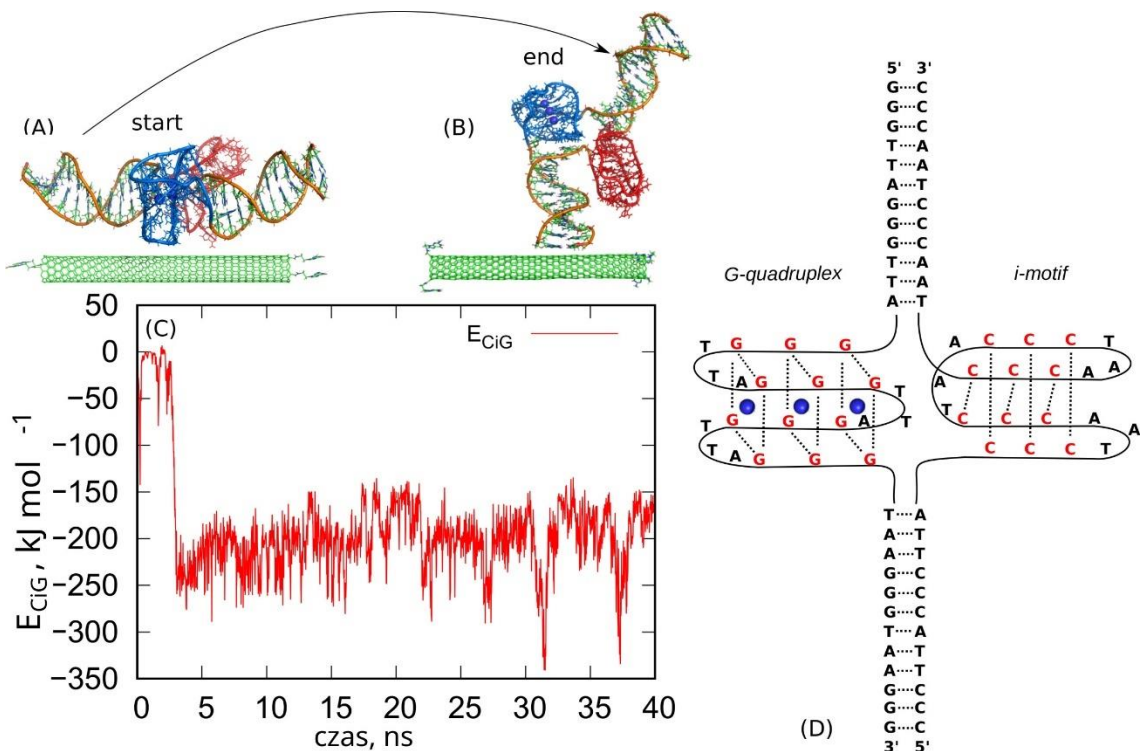
8.2.1. Metodyka obliczeń rigid-body replica exchange

Jak wspomniano standardowa dynamika molekularna zastosowana do analizy tego typu układów prowadziła do uzyskiwania stanów zablokowanych. Zatem konfiguracje otrzymane z takich obliczeń mogą być dalekie od tych termodynamicznie optymalnych. Dlatego w przedstawionych badaniach próbowano kilku podejść w celu przełamania lokalnych barier energetycznych i przyspieszenia próbkowania całej przestrzeni konfiguracyjnej. Pierwsze podejście zakładało nagrzewanie układów do wysokich lub nawet bardzo wysokich temperatur. Jednakże szybko okazało się, że fCNT i iG wciąż wykazują powolny ruch i stosowanie wysokich temperatur, które wpływają głównie na ich wewnętrzne stopnie swobody, nie jest pożądane, ponieważ ugrupowanie iG jest dość delikatne i podgrzanie go do temperatur znacznie wyższych niż temperatura pokojowa prowadzi do jego zniszczenia.

Innym podejściem zastosowanym w celu znalezienia optymalnej konfiguracji była metoda wymiany replik (Roxbury, Jagota, i Mittal 2013). Formalnie podejście to ma takie same ograniczenia, jak bezpośrednie ogrzewanie, ponieważ obejmuje szereg replik układów pracujących w coraz wyższych temperaturach z możliwością zamiany

temperatury między replikami. Pojawiła się jednak jeszcze inna trudność. Stwierdzono, że odstępy temperatur między kolejnymi replikami muszą być dość małe (ok. 3-4 K), ponieważ w przeciwnym razie zamiany replik nie będą zachodzić ze względu na bardzo małe prawdopodobieństwo generowane przez duże różnice energii potencjalnej replik. Zatem osiągnięcie temperatur, prowadzących do skutecznych przejść pomiędzy replikami wymagałoby zastosowania wielu replik, a tym samym ogromnych zasobów obliczeniowych.

W pierwszym kroku przeprowadzono standardowe równowagowanie układu w konfiguracji początkowej pokazanej na Rys. 8.1.(A). Jest to konfiguracja, w której ułożono fCNT i iG równoległe do siebie z zastosowaniem pewnego dystansu między tymi dwoma strukturami tak, aby uniknąć ich wzajemnego nakładania się. Stan z konfiguracji początkowej po pewnym czasie przekształcił się w stan pokazany na Rys. 8.1.(B). Obliczenia kontynuowano przez 40 ns, monitorując w tym czasie energię oddziaływania między fCNT i iG, E_{CiG} . Energię tę pokazano na Rys. 8.1.(C) w funkcji czasu. Należy zauważyć, że stan na Rys. 8.1.(B) okazał się bardzo stabilny, choć jak widać gołym okiem prawdopodobnie daleki od stanu termodynamicznie optymalnego.



Rys. 8.1. (A) Początkowa konfiguracja układu złożonego z (10,0) fCNT i protonowanego iG. (B) końcowa konfiguracja uzyskana po 40 ns standardowych symulacji w zespole NPT. Niebieskie części to struktury G-quadrupleks, a czerwone to i-motif. (C) Energie interakcji par między fCNT i iG w funkcji czasu. (D) Schematyczny diagram przedstawiający strukturę i sekwencję kwasów nukleinowych w strukturze iG.

Jak widać E_{CiG} szybko spada z wartości początkowej ~ 0 do nowej, bardziej ujemnej wartości -250 kJ mol^{-1} , co odpowiada spontanicznie osiągniętemu bliższemu kontaktowi między fCNT i iG. E_{CiG} niewiele zmienia się do końca obliczeń w tym etapie i jedynie oscyluje wokół wartości średniej. Konfiguracja przestrzenna fCNT i iG również niewiele się zmienia i jest podobna do tej pokazanej na Rys. 8.1. (B). Oznacza to, że układ został zablokowany energetycznie, a dalsza kontynuacja standardowych symulacji nie doprowadziłaby do zmiany tego stanu. Wniosek jest taki, że nie mamy tu stanu optymalnego termodynamicznie i nie ma szans na ucieczkę z tego stanu do innego przy użyciu standardowej dynamiki.

Konieczne było zatem zaprojektowanie dedykowanej procedury, która byłaby w stanie skutecznie próbować przestrzeń konfiguracyjną przy rozsądnym zaangażowaniu zasobów obliczeniowych. Ta specjalnie zaprojektowana metodyka, nazwana wymianą replik w dynamice ciała sztywnego, (z ang. *rigid body replica exchange*, rbREM), obejmuje kilka kroków, które zostaną poniżej przedstawione na przykładzie analizowanego wyżej układu.

Punktem startowym jest ostatnia klatka ze standardowych symulacji (Rys. 8.1.(B)) i wykorzystanie jej jako początkowej konfiguracji w kolejnych krokach gdzie:

(i) Najpierw przeniesiono układ do niejawnego modelu rozpuszczalnika. W tym celu usunięto wszystkie cząsteczki wody z układu, ale pozostawiono jony soli fizjologicznej. Sumowanie oddziaływań elektrostatycznych wykonano przy użyciu potencjału Yukawy, wykorzystując promień Debye'a i stałą dielektryczną wody. W związku z tym elektrostatyczną część pola siłowego obliczono za pomocą:

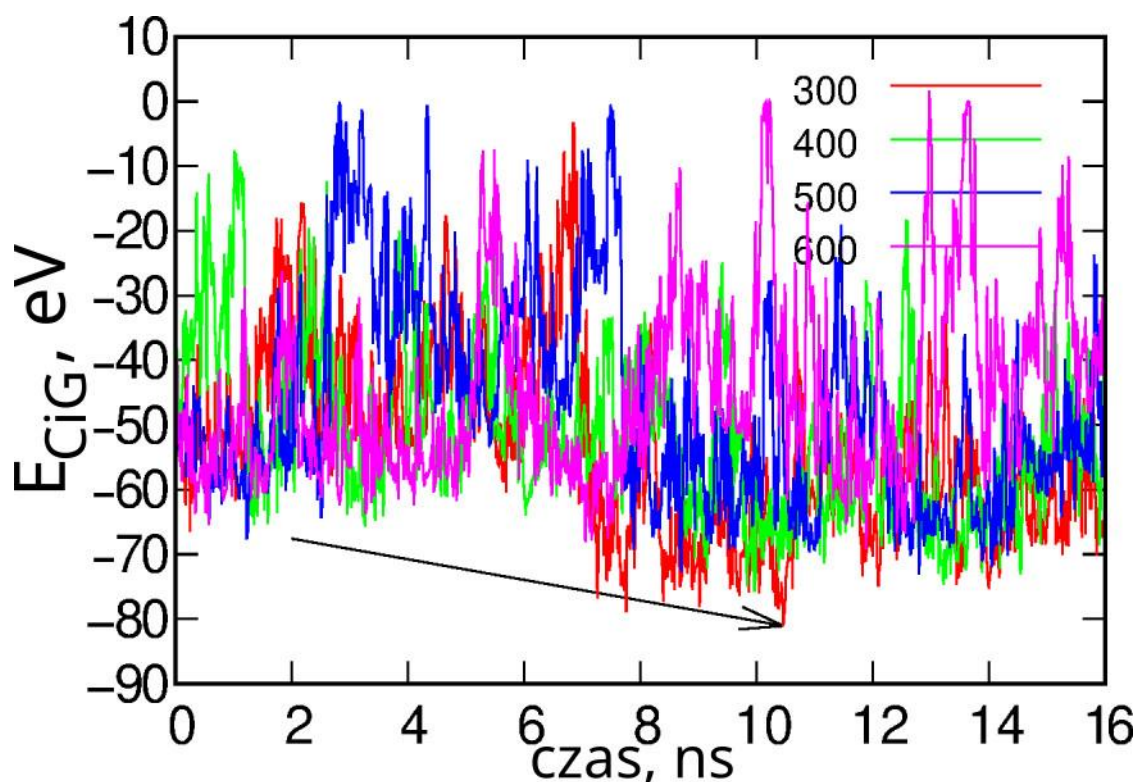
$$E_{el} = \frac{q_i q_j}{\epsilon r} \exp(-\kappa r) \quad [8.1]$$

gdzie E_{el} jest energią oddziaływania elektrostatycznego między ładunkami punktowymi q_i i q_j , ϵ jest stałą dielektryczną wody, κ jest długością promienia Debye'a w elektrolicie o sile jonowej $0,145 \text{ mol L}^{-1}$, a r jest odległością między ładunkami punktowymi.

Dodatkowo przeskalowano wszystkie parametry energii Lennarda-Jonesa, zwykle oznaczane jako ϵ_{ij} , o ten sam współczynnik 0,1-0,2 w celu zredukowania wysokości barier energii potencjalnej. Dzięki temu zastosowany zakres temperatur 300-600 K jest wystarczający do efektywnego przeskoku układu z dowolnej lokalnej studni energii potencjalnej do innej, dzięki czemu możliwe było wykonanie dobrego próbkowania całej przestrzeni konfiguracyjnej za pomocą prostej wymiany replik.

(ii) Następnie zastąpiono klasyczną dynamikę punktów materialnych na dynamikę ciał sztywnych. fCNT i iG są wówczas traktowane jako dwa oddzielne, ale oddziałujące ze sobą ciała sztywne. Jednakże jony soli nadal podlegały dynamice punktów materialnych. Na tym etapie obliczenia były prowadzone w zespole NVT.

(iii) Przeprowadzono symulacje wymiany replik w układzie z ciałami sztywnymi reprezentującymi fCNT i iG i w przybliżeniu rozpuszczalnika niejawnego. Symulacje przeprowadzono na czterech replikach odpowiadających temperaturom 300, 400, 500 i 600 K, a współczynnik skalowania dla ϵ_{ij} został tak dobrany, aby zmiana temperatur w rbREM zachodziła z rozsądną częstotliwością. Rys. 8.2. przedstawia typowe wyniki uzyskane z symulacji ciała sztywnego rbREM. Krzywe oznaczone jako 300, 400, 500 lub 600 pokazują energię E_{CiG} uzyskaną w danej replice. Zazwyczaj nie odpowiadają one temperaturom replik, ponieważ temperatury migrują między replikami.

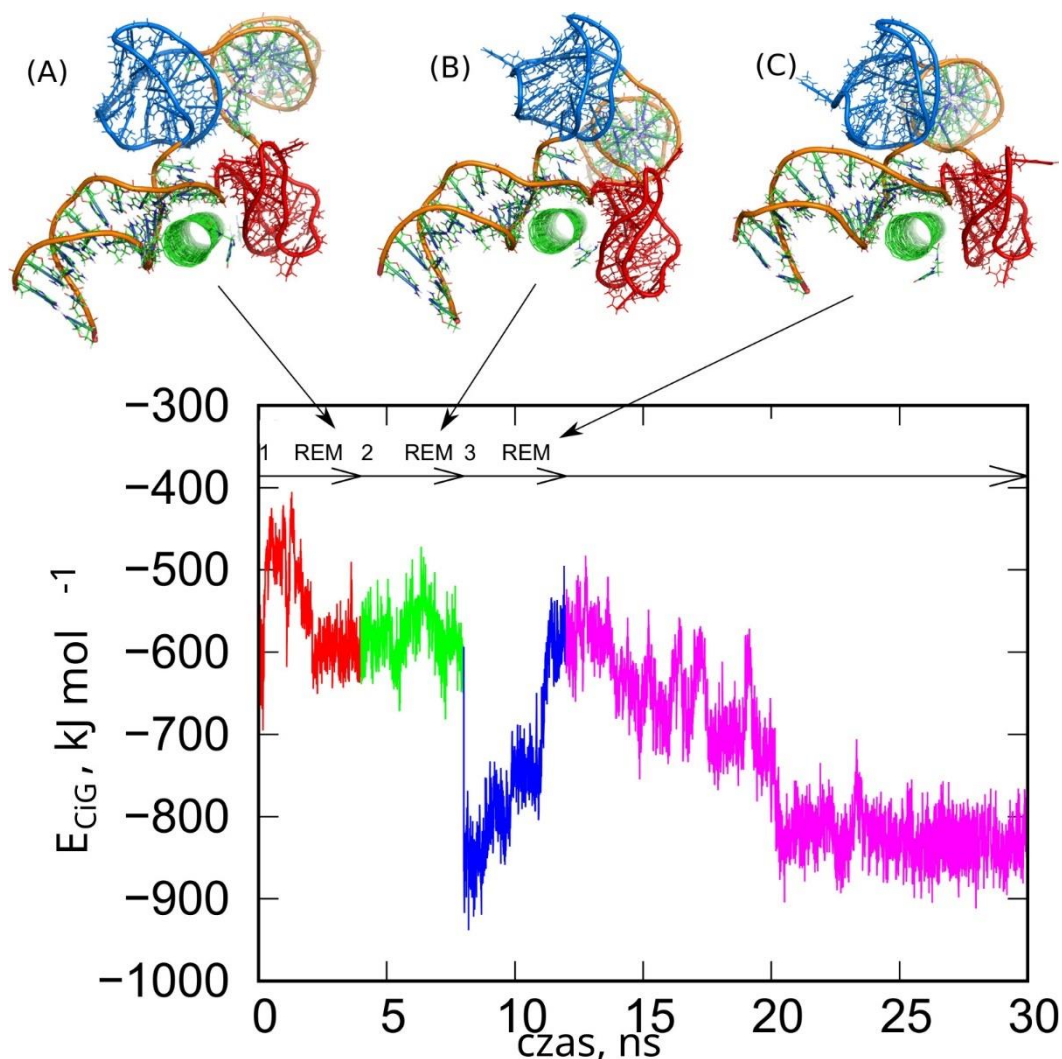


Rys. 8.2. Zależność energii oddziaływania między fCNT i iG, E_{CiG} w symulacjach wymiany replik ciała sztywnego. E_{CiG} nie jest równe energii z Rys. 8.1. (C), wynika to z przeskalowania ϵ_{ij} o współczynnik 0,1, a także z przeniesienia do modelu rozpuszczalnika niejawnego. Każda krzywa pokazuje energię uzyskaną w danej replice od 300 do 600. Strzałka pokazuje punkt, w którym interakcja między fCNT i iG jest najsilniejsza. Konfiguracja odpowiadająca temu punktowi jest następnie używana jako konfiguracja początkowa w obliczeniach prowadzonych w jawnym rozpuszczalniku.

Punkt oznaczony strzałką na Rys. 8.2. odpowiada najsilniejszej energii oddziaływania pomiędzy sztywną fCNT i sztywnym iG, obserwowanym w symulacjach rbREM, a przestrzenny układ fCNT i iG, odpowiadający temu punktowi jest konfiguracją o najniższej energii. Ponieważ przestrzeń konfiguracyjna w rbREM jest bardzo wydajnie próbkowana, można przyjąć, że punkt ten reprezentuje najgłębsze minimum energii potencjalnej układu, którą w rzeczywistości rządzą oddziaływania E_{CiG} .

(iv) Konfiguracja o najniższej energii jest następnie wykorzystywana jako punkt startu w obliczeniach w jawnym rozpuszczalniku. Oznacza to, że do układu ponownie wprowadzono odpowiednią ilość cząsteczek wody, przywrócono sumowanie Ewalda oddziaływań elektrostatycznych, do opisu wewnętrznych stopni swobody CNT użyto potencjału AIREBO, a na koniec przywrócono pierwotne wartości parametrów ϵ_{ij} . Następnie przeprowadzono standardowe obliczenia w zespole NPT przez 4 ns, co doprowadziło układ do jeszcze korzystniejszej energetycznie konfiguracji ze względu na przywrócenie elastyczności fCNT i iG. W ten sposób pogłębiono lokalną studnię energii potencjalnej układu.

Następnie kroki (i)-(iv) powtórzono kilka razy, aż konfiguracje znalezione w kolejnych przebiegach rbREM były takie same lub bardzo podobne. W przypadku przedstawionego układu wystarczyły 3 kolejne powtórzenia rbREM. Rys. 8.3. pokazuje, jak zmienia się energia E_{CiG} podczas każdego cyklu po etapie rbREM oraz konfiguracje znalezione na końcu każdego cyklu. Należy zauważyć, że skala czasowa na Rys. 8.3. nie jest ciągła. Jest ona podzielona na kilka odcinków, odpowiadającym normalnym przebiegom pełnej dynamiki molekularnej obejmującej wszystkie atomy, ale przerywanej okresami rbREM. Każdy etap rbREM był wykonywany pomiędzy odcinkami czasowymi oznaczonymi krótkimi strzałkami.



Rys. 8.3. Zmiany energii E_{CiG} po kolejnych obliczeniach wymiany replik ciała sztywnego (rbREM). Wizualizacje (A – C) przedstawiają konfiguracje układu znalezione w punktach czasowych, odpowiadających końcowi każdej krótkiej strzałki.

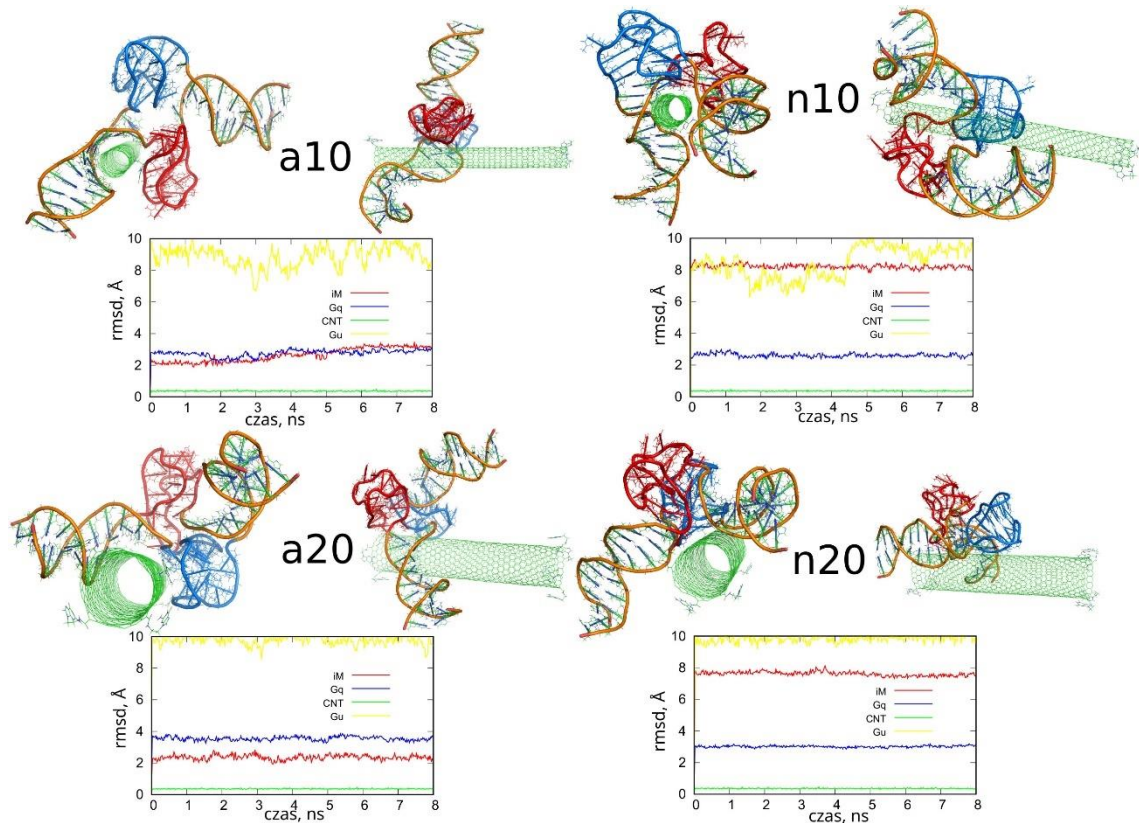
Jak widać na Rys. 8.3., energia E_{CiG} zmienia się w dość niemonotoniczny sposób, jednak z wyraźną tendencją do uzyskiwania coraz niższych wartości, co jest spowodowane coraz silniejszym przyciąganiem pomiędzy fCNT i iG. Energie na Rys. 8.3. warto porównać z wartościami z Rys. 8.1. Wyraźnie widać, że po pierwszym okresie rbREM energia E_{CiG} gwałtownie spadła z około -200 kJ mol^{-1} do około -500 kJ mol^{-1} , a przestrzenne ułożenie elementów fCNT i iG względem siebie uległo całkowitej zmianie. Oznacza to, że konfiguracja przestrzenna na Rys. 8.1., uzyskana z dość długich symulacji klasyczną dynamiką molekularną jest zdecydowanie losowa. Wiązanie iG przez jego dupleksowy koniec ze ścianą boczną fCNT (Rys. 8.1.B) jest dość dziwne i raczej dalekie od równowagi termodynamicznej. Zastosowanie rbREM szybko doprowadziło do bardziej rozsądnej konfiguracji z fCNT wstawioną między Gq i iM w połączeniu między dupleksem, a strukturami niekanonicznymi. Jednocześnie jony sodu

uwięzione w strukturach Gq zostały utracone, ponieważ podczas rbREM temperatury osiągały 600 K. Zatem bez usztywnienia struktur, Gq i iM nie przetrwałyby normalnych obliczeń REM.

Kolejne dwa etapy rbREM nie zmieniły zasadniczo konfiguracji uzyskanej po pierwszej wymianie replik rbREM, chociaż energia E_{CiG} spadła do -900 kJ mol^{-1} po ostatniej rbREM. Wzrosła ona jednak do około -500 kJ mol^{-1} w klasycznych symulacjach, ale ten efekt jest związany z fluktuacją energii. Dalsza kontynuacja klasycznych symulacji doprowadziła ostatecznie do stabilizacji energii E_{CiG} . Można zatem przyjąć, że struktury otrzymane po 3 etapach rbREM, po których nastąpiły ok. 10 ns standardowe symulacje, reprezentują konfiguracje optymalne termodynamicznie.

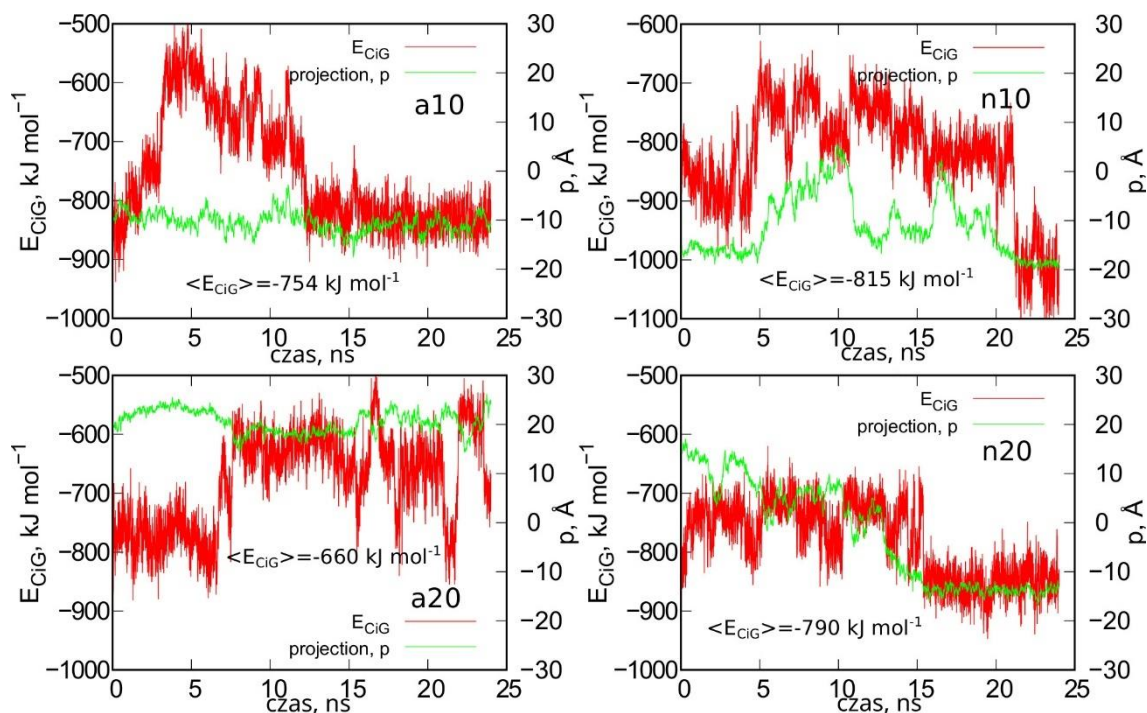
8.2.2. Optymalne konfiguracje układów fCNT z iG

Powyższe podejście zastosowano do pozostałych trzech układów analizowanych w tej części pracy. Rys. 8.4. przedstawia uzyskane geometrie po rbREM, które odpowiadają punktowi czasowemu, oznaczonemu przez koniec długiej strzałki na Rys. 8.3. Na podstawie tych geometrii można wyciągnąć kilka ogólnych wniosków dotyczących zachowania iG i fCNT. Mianowicie iG zawsze przyjmuje kształt litery V z Gq i iM umieszczonymi na ostrzu kształtu tej litery. Układy „a” tworzą bardziej otwarte struktury iG w kształcie litery V, podczas gdy układy „n” tworzą bardziej zwarte, ale jednocześnie bardziej zniekształcone kształty V. Nanorurki węglowe są zwykle umieszczone pomiędzy ramionami kształtów V i wydaje się, że struktury iG preferują lokalizację blisko końcówek CNTs. Dodatkowo na tym samym rysunku umieszczono wykresy przedstawiające zmiany strukturalne elementów badanego układu, ilościowo zilustrowane jako wykresy rmsd, które zostały przygotowane w oparciu o ostatnie 8 ns symulacji i konfigurację z Rys. 8.1.A użyte jako stany odniesienia.



Rys. 8.4. Wizualizacje wyznaczonych optymalnych konfiguracji układów fCNT i iG oraz wykresy rmsd, wyznaczone na podstawie ostatnich 8 ns symulacji dla iM, Gq, samej CNT i guaninowych grup funkcyjnych (Gu). G-quadrupleksy zaznaczone są kolorem niebieskim, a i-motify czerwonym.

Na Rys. 8.5. przedstawione zostały zmiany energii E_{CiG} w funkcji czasu symulacji. Na tym samym rysunku pokazano też zmiany położenia rzutu środków masy Gq i iM (wziętych razem) na oś nanorurki. Znaczenie parametru p jest następujące, $p=0$ oznacza, że środek masy Gq i iM znajduje się na środku fCNT, a jego zmiana w kierunku ujemnych lub dodatnich wartości oznacza, że iG porusza się odpowiednio w lewo lub prawo. Zatem analiza p w funkcji czasu daje wyobrażenie o mobilności iG w odniesieniu do fCNT. Można stwierdzić, że w układach „a” ugrupowanie iG jest raczej statyczne w stosunku do osi nanorurki (rzut parametru p jest prawie niezmienny). W układach „n” iG jest w stanie poruszać się po powierzchni fCNT, chociaż nadal woli przebywać bliżej końcówki nanorurki. Dodatkowo widzimy, że średnia energia interakcji $\langle E_{CiG} \rangle$ jest większa (jej wartość bezwzględna) w układach „n”.



Rys. 8.5. Energie interakcji między iG i fCNT, E_{CiG} w funkcji czasu oraz rzut środka masy Gq i iM (wziętych razem) na oś CNT.

Przyglądając się bliżej każdemu układowi można stwierdzić, że w przypadku układu a10 struktura iG jest prawie statyczna i nie porusza się po powierzchni fCNT. Widać, że rzut środka masy Gq i iM pozostaje praktycznie niezmienny, a struktury te są dość daleko od krańców fCNT, chociaż część dupleksowa iG znajduje się blisko krańca fCNT. Jednocześnie energia E_{CiG} zmienia się znacząco w czasie. Oznacza to, że albo niekanoniczne części iG nie przyczyniają się znacząco do energii E_{CiG} , albo Gq i iM otaczają nanorurkę bez istotnej zmiany położenia ich środka masy, ale z istotnymi zmianami związanymi z liczbą bliskich kontaktów z powierzchnią CNT. Drugie wyjaśnienie jest bardziej prawdopodobne, ponieważ na Rys. 8.4. widzimy, że iM przylega do powierzchni CNT, więc jego wkład w energię E_{CiG} nie może być pomijalny, a Gq jest w rzeczywistości dość daleko od CNT. Tabela 8.1. potwierdza te obserwacje, że najważniejszy wkład w energię pochodzi z interakcji z częścią dupleksową. Widać na Rys. 8.4., że fCNT wiąże się z szerokim rowkiem dupleksu, a iM i dupleks tworzą okrągły tunel, w którym lokalizuje się fCNT. Unieruchomienie iG jest najprawdopodobniej spowodowane interakcją z grupą funkcyjną w postaci guaniny przyłączonej do końcówki CNT. Bliższa analiza tej części układu pozwala stwierdzić, że jedna z guanin z grup funkcyjnych tworzy wiązanie wodorowe z adeniną z dupleksu. To wiązanie nie jest bardzo silne, ponieważ odległość między atomami, tworzącymi wiązanie wodorowe

wynosi 3,1 Å. Wydaje się jednak, że to wystarcza do unieruchomienia iG, ponieważ nie ma innych specyficznych interakcji z końcówką CNT.

Tabela 8.1. Energie oddziaływań pomiędzy fCNT a iG, częścią Gq oraz częścią iM wyznaczona na podstawie 4 ns symulacji. Energia wyrażona jest w kJ mol^{-1} .

Element układu	a10	a20	n10	n20
iG	-833	-653	-959	-844
Gq	0	-241	-109	-347
iM	-38	-151	-327	-182

Drugi układ z protonowanym iM, a20 wykazuje podobną właściwość jak a10, czyli iG jest prawie statyczny na powierzchni CNT. Jednak znajduje się po przeciwnej stronie CNT, a środek masy Gq i iM jest znacznie bliżej końca CNT niż w przypadku układu a10. Obserwowane fluktuacje energii E_{CiG} również należy przypisać zjawisku owijania nanorurki przez Gq i iM, ponieważ struktury te nie poruszają się wzdłuż CNT. Energia interakcji przedstawiona w Tabeli 8.1., pochodząca od Gq i iM, stanowi ponad połowę całkowitej energii oddziaływania z iG, a głównym składnikiem jest w tym przypadku oddziaływanie z Gq.

Jak widać szeroka nanorurka (20,0) znajduje się w połączeniu między dupleksem a Gq i iM i próbuje dopasować się do szerokiego rowka dupleksu. Jednak w tym przypadku, ze względu na wielkość CNT, powierzchnia styku nanorurki z iG jest mniejsza niż w przypadku układu a10. Bliższa analiza odległości między atomami należącymi do fCNT i iG prowadzi do wniosku, że unieruchomienie iG wobec przesunięcia po powierzchni CNT wynika z pojawienia się dwóch wiązań wodorowych między grupą funkcyjną a iG. Dokładnie te wiązania wodorowe pojawiają się między atomami azotu z -NH i -NH₂ w atomach guaniny i tlenu, należących do szkieletu fosforanowego reszty 69 adeniny. To residuum należy do iM, a zatem iM prawdopodobnie odgrywa ważną rolę w immobilizacji iG, chociaż jego udział w całkowitej energii oddziaływania wynosi tylko ¼ całkowitej energii E_{CiG} .

Układ z nieprotonowanym iM i fCNT (10,0), tj. n10, wykazuje jakościowo odmienne zachowanie, ponieważ w tym przypadku środek masy Gq i iM (rzut, p) porusza się od krawędzi CNT w kierunku jej środka i ponownie zbliża się do końcówki fCNT. Ruchy te skorelowane są ze zmianami energii E_{CiG} , jak widać na Rys. 8.5. Energia ta jest najwyższa (jej wartość bezwzględna) wśród badanych układów, a jej duża wartość wynika z dużej liczby bliskich kontaktów fCNT z iG. Szczególnie wkład iM jest bardzo

duży, jak widać w Tabeli 8.1., ale ważną rolę odgrywa również interakcja z dupleksem. Patrząc na konfigurację geometryczną, utworzoną przez fCNT i iG na Rys. 8.4., można stwierdzić, że fCNT została faktycznie owinięta przez iG. Można również zauważyć, że jedno ramię dupleksu iG znajduje się na powierzchni fCNT, a iM wraz z szerokim rowkiem drugiego ramienia uformował tunel, w który idealnie wpasowuje się nanorurka.

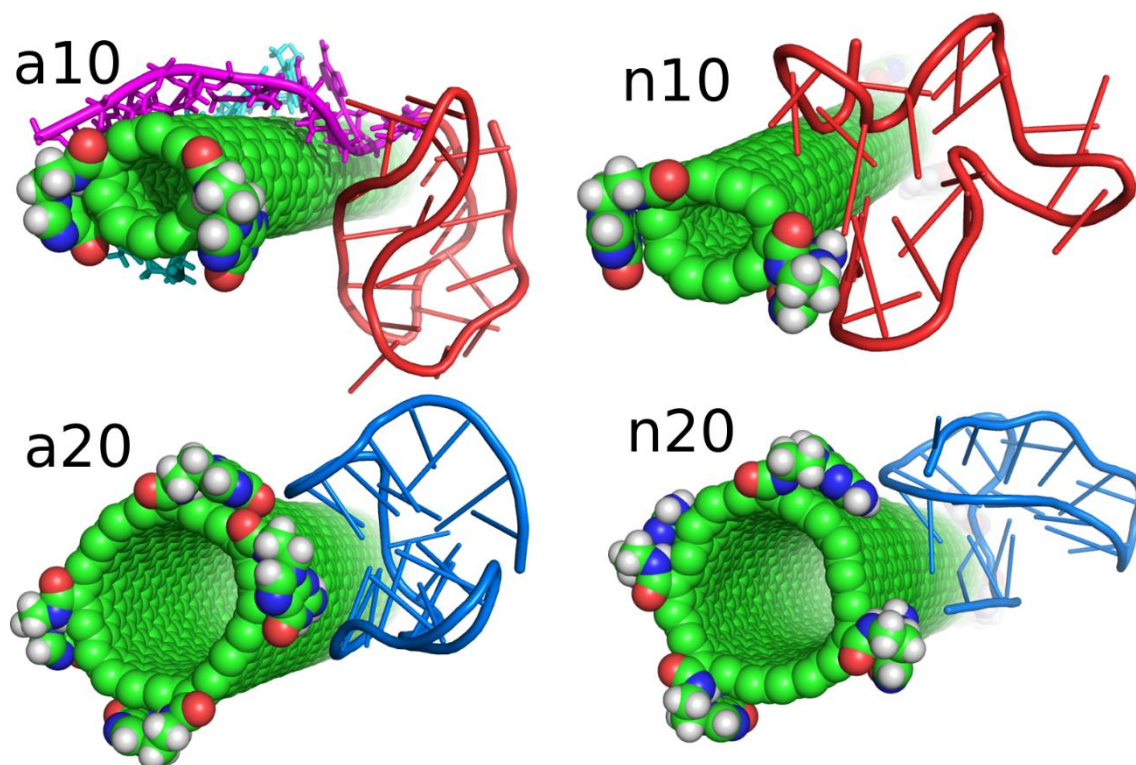
Ostateczna konfiguracja pokazana na Rys. 8.4. odpowiada najsilniejszej interakcji iG i fCNT. Wykryto tutaj istnienie trzech wiązań wodorowych między iG a grupą funkcyjną fCNT. Jedno z wiązań wodorowych powstaje między guaniną -NH a tlenem ze szkieletu fosforanowego, pozostałe dwa wiązania wodorowe tworzą się między atomem azotu z reszt adeniny 62 a atomami O i N z grupy funkcyjnej guaniny. Wydaje się, że te wiązania wodorowe są odpowiedzialne za spadek E_{CiG} pod koniec obliczeń (pomiędzy 21 a 24 ns) na Rys. 8.5. Podobny rodzaj i liczbę wiązań wodorowych pomiędzy iG i fCNT zaobserwowano również w początkowym etapie obliczeń przedstawionych na Rys. 8.5. (między 0 a 5 ns), ale struktura iM była mniej otwarta niż w końcowej fazie. Te wiązania wodorowe oczywiście zniknęły, gdy środek masy Gq i iM przesunął się w kierunku środkowej części nanorurki. Dlatego można stwierdzić, że pojawienie się tych wiązań nie jest wystarczające, aby unieruchomić iG na końcu fCNT. Wydawało się to jednak wystarczające w przypadku układów z protonowanym iM, dlatego też zjawisko to wymaga dalszej analizy.

Układ n20 również ujawnia pewną korelację między położeniem Gq i iM na fCNT, a energią oddziaływania E_{CiG} . Jak widać na Rys. 8.5. iG przesunęło się z jednej strony nanorurki na drugą w ciągu pierwszych 15 ns i zostało unieruchomione. Towarzyszy temu spadek energii oddziaływania, ale wiązanie jest nieco słabsze niż w przypadku wąskiej nanorurki n10. W tym przypadku ważna część interakcji pochodzi z oddziaływania z Gq. Ponownie guaninowa grupa funkcyjna z fCNT bierze udział w tworzeniu wiązań wodorowych z iG. W końcowej konfiguracji układu n20 pokazanej na Rys. 8.4. wykryto obecność dwóch wiązań wodorowych. Jedno z nich powstaje między NH_2 z grupy funkcyjnej guaniny a tlenem, należącym do grupy fosforanowej połączonej z resztą cytozyny 58 wchodzącą w skład iM. Drugie wiązanie wodorowe tworzy się między atomem tlenu z grupy cukru połączonej z resztą adeniny 57.

Wykresy rmsd z Rys. 6.4 pokazują, jak struktury wewnętrzne iM, Gq, CNT i grup funkcyjnych zmieniają się w czasie i w odniesieniu do ich stanów początkowych. Wykresy te są przydatne do zilustrowania roli protonowania cytozyn i chiralności nanorurek w degradacji struktur DNA. Zauważono, że protonowanie cytozyn prowadzi

do stabilnych iM z rmsd nie większym niż 3 Å, ale deprotonacja destabilizuje iM i ich rmsd rośnie do około 8 Å. Efekt jest taki sam bez względu na chiralność nanorurek. G-quadrupleksy są stabilne i raczej niewrażliwe na stan protonacji cytozyn. Zauważono tu jednak pewien destabilizujący wpływ szerokiej (20,0) nanorurki na strukturę Gq. Rmsd Gq oddziałujących z CNT (20,0) są nieco wyższe niż w przypadku CNT (10,0) i rosną powyżej 3 Å. Rdzenie nanorurek są praktycznie statyczne i zachowują się jak ciała sztywne, ponieważ rmsd jest tylko nieznacznie większe od zera. Z drugiej strony, grupy funkcyjne CNTs całkowicie zmieniły swoje początkowe struktury. Przeniosły się na ściany boczne nanorurek, co doprowadziło do dużych wartości rmsd ok. 10 Å dla tych grup.

Jak przedstawiono na Rys. 8.5. i omówiono powyżej, iG adsorbuje się na fCNTs raczej statycznie we wszystkich badanych przypadkach. Oznacza to, że w każdym układzie istnieją pewne istotne obszary lub miejsca interakcji, które w przeważającym stopniu przyczyniają się do całkowitej energii interakcji. Te miejsca interakcji można wykryć patrząc na wartości przedstawione w Tabeli 8.1., tj. kombinacje par energii interakcji, dających najwyższe energie (ich wartości bezwzględne). Rys. 8.6. przedstawia graficzną reprezentację tych kluczowych miejsc interakcji. Jak widać w Tabeli 8.1., układ a10 generuje większość energii interakcji przez dupleksową część iG z niewielkim udziałem iM. Rys. 8.6. pokazuje ten fragment iG i fCNT po to, by wyeksponować detale strukturalne tej konfiguracji. W układzie a20 zasadniczym fragmentem interakcji jest Gq. G-quadrupleks zasadniczo zachowuje swój „koszykowy” kształt, ale w przypadku układu a20 kształt ten jest nieco zdeformowany, jak pokazano na wykresach rmsd z Rys. 8.4. W układzie n10 najsilniejsze oddziaływanie pochodzi od iM, ale jednocześnie kształt przestrzenny iM jest silnie zdeformowany, jak widać na Rys. 8.6. W układzie n20, adsorpcja Gq na ścianie bocznej fCNT generuje najsilniejsze oddziaływanie, a „koszykowy” kształt Gq jest dobrze zachowany po adsorpcji.



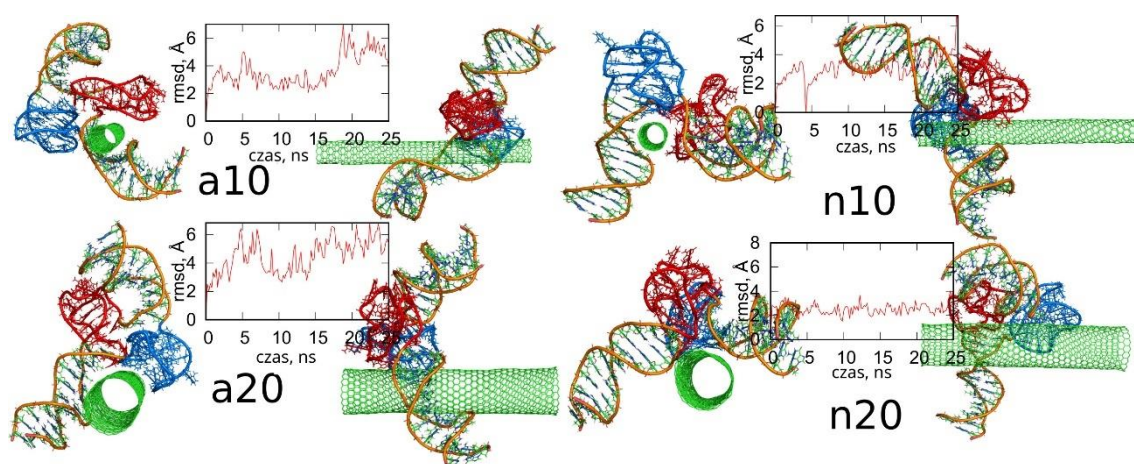
Rys. 8.6. Szczegółowe wizualizacje najważniejszych miejsc interakcji występujących w rozważanych układach.

Wiązania wodorowe utworzone między guaninowymi grupami funkcyjnymi z fCNT i iG w miejscach blisko końców fCNT nie są typowymi wiązaniami Watsona-Cricka czy Hoogsteena. Zwykle tworzą się między atomami tlenu ze szkieletów fosforanowych lub cukrów. Co więcej, zwykle kąty między atomami są większe niż typowa wartość dla wiązania wodorowego, tj. 20° . Jednakże w każdym układzie ostateczna i prawdopodobnie najbardziej optymalna konfiguracja ma miejsce, gdy centrum iG (jego obszar Gq i iM) zbliża się do końca fCNT. Wydaje się, że główną przyczyną takich konfiguracji jest obecność grup funkcyjnych guaniny na końcówkach fCNT. Dlatego w kolejnej części badań ponownie przeanalizowano wszystkie układy, ale z usuniętymi grupami funkcyjnymi guaniny.

8.2.3. Analiza konfiguracji fCNT i iG po usunięciu grup funkcyjnych

Rys. 8.7. przedstawia wizualizacje układów w taki sam sposób jak na Rys. 8.4. Wizualne porównanie konfiguracji pokazanych na Rys. 8.4. i Rys. 8.7. dla każdego przypadku pokazuje, że struktury iG nie zmieniły się silnie podczas przeprowadzonych 25 ns symulacji. Wartości rmsd obliczono dla wszystkich atomów tworzących iG, a ich bliższa weryfikacja, oparta na analizie udziału każdego residuum w całkowitej wartości rmsd, doprowadziła do wniosku, że dominujące składniki pochodzą z przemieszczeń

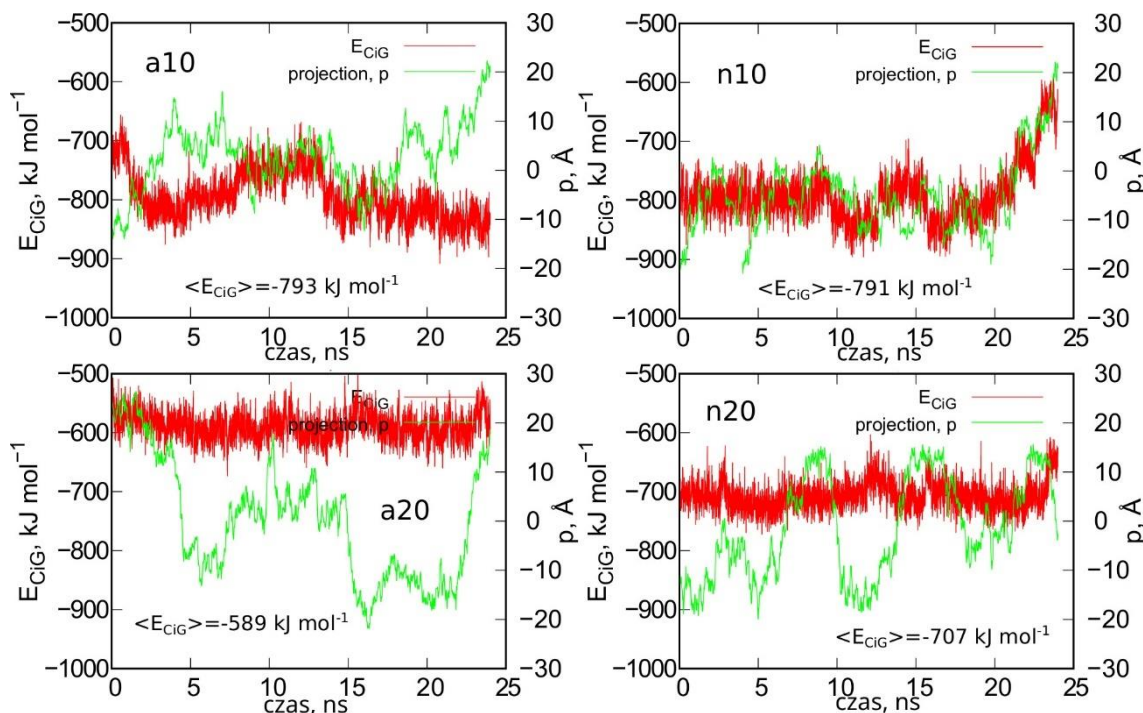
reszt końcowych. Innymi słowy, główna składowa rmsd w każdym analizowanym przypadku pochodzi ze zmian położenia części dupleksowych, zlokalizowanych na końcach iG. Co ciekawe, nieco większe odkształcenie iG obserwuje się w przypadku protonowanych iM, czyli układów a10 i a20, gdzie rmsd oscyluje wokół 5 Å. W tych dwóch przypadkach zaobserwowano również pewne odchylenia od początkowych pozycji części iM. Zupełnie nieistotne zmiany w strukturze iG po usunięciu guaninowych grup funkcyjnych z fCNT obserwuje się dla układów z nieprotonowanym iM, tj. n10 i n20. Rmsd w tych przypadkach wynosi ok. 3 Å, więc nie są to więcej niż fluktuacje termiczne.



Rys. 8.7. Wizualizacje układów po usunięciu guaninowych grup funkcyjnych z fCNT oraz wykresy rmsd części iG obliczone dla kolejnych 25 ns symulacji. Konfiguracjami referencyjnymi do obliczenia rmsd były struktury z Rys. 8.4.

Rys. 8.8. przedstawia analogiczne wyniki jak Rys. 8.5. dla układów bez guaninowych grup funkcyjnych. Uderzająca różnica między Rys. 8.5. a Rys. 8.8. polega na tym, że rzut p zmienia się silnie podczas trwania symulacji w przypadku Rys. 8.8. Oznacza to, że iG porusza się swobodnie po powierzchni CNT. Energia oddziaływania jest jednak prawie stała, co oznacza, że nie zależy znacząco od położenia iG względem osi CNT. Jest jednak wyjątek, tj. układ n10, w którym energia oddziaływania znacznie słabnie, gdy iG zbliża się do końca CNT. Potwierdza to jednak wniosek, że brak guaninowych grup funkcyjnych powoduje, że iG jest wysoce mobilne na powierzchni CNT. Oczywiście, gdyby iG było połączone z większym fragmentem DNA, to wówczas mówilibyśmy o swobodnym poruszaniu się CNT względem fragmentu DNA. Jest to bardzo ważna obserwacja, ponieważ możemy wykorzystać funkcjonalizację guaniną, w celu kontrolowania interakcji nanorurek węglowych z sekwencjami DNA zawierającymi iG. Wbudowanie reszt guaninowych do końcówek CNT prowadzi do

fCNT, która może precyzyjnie atakować części DNA, zawierające Gq i iM swoją końcówką. Brak reszt guaninowych sprawia, że CNT jest niespecyficzna i oddziałuje z obszarem Gq+iM ścianą boczną. Obserwacja ta może być przydatna w projektowaniu inteligentnych nośników ukierunkowanych na te części DNA.



Rys.8.8. Energia oddziaływania między iG i CNT dla układów bez guaninowych grup funkcyjnych, E_{CiG} w funkcji czasu i rzut środka masy Gq i iM (wziętych razem) na oś CNT, p .

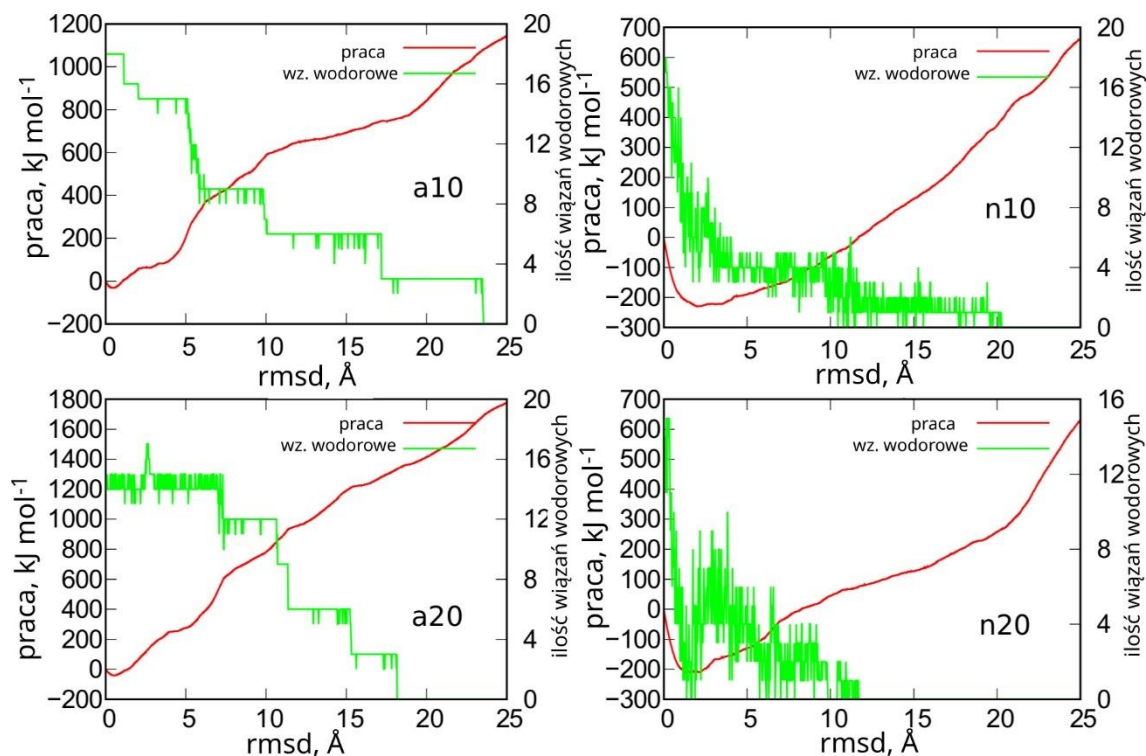
Obserwowana silna różnica w zachowaniu fCNT i CNT bez sfunkcjonalizowanych końcówek jest dość nieoczekiwana, ponieważ jak już omówiono powyżej, obecność guaniny prowadzi do powstania tylko jednego lub dwóch wiązań wodorowych z iG. Oczywiście pojawiają się również dodatkowe oddziaływania Leonarda-Jonesa między bardziej oddalonymi atomami, ale zwykle są one dość słabe. Osłabienie średniej energii oddziaływania $\langle E_{CiG} \rangle$ po usunięciu grup funkcyjnych wynosi od 3 do 11 %, więc są to raczej niewielkie zmiany. Nie zaobserwowano również splątania reszty guaninowej i fragmentów iG, więc efekt ten również trudno wytłumaczyć większą trudnością we wzajemnym rozplątaniu się obu obiektów (efektem entropowym). Niemniej jednak obserwacja jest bardzo jasna: grupy funkcyjne guaniny prowadzą do przyłączenia końcówek fCNT do połączenia między Gq i iM oraz dupleksem DNA.

8.2.4. Stabilność i-motifu, stanowiącego fragment ugrupowania iG podczas oddziaływania z fCNT

Bardzo ważną obserwacją doświadczalną, związaną z oddziaływaniem iM z fCNT jest stabilizacja struktury iM przy neutralnym pH za pomocą jednościennych nanorurek węglowych (Chen i in. 2012; Li i in. 2006). Efekt ten został już omówiony w tej pracy w rozdziale 7 oraz opisany w publikacji Wolski i wsp., dotyczącej interakcji wolnego fragmentu iM z fCNT (Wolski, Wojton, i in. 2019). Jednak zachowanie iM może znacząco się różnić w przypadku iG, gdzie iM jest częścią większej struktury. Dlatego ponownie zastosowano symulacje sterowaną dynamiką molekularną w celu wyznaczenia prac, niezbędnych do rozwinięcia iM w kontrolowany sposób. Podejście obliczeniowe było dość podobne do stosowanego wcześniej przypadku iM, będącego częścią struktury iG, ale bez obecności fCNT (rozdział 6) (Panczyk, Wojton, i Wolski 2019). Zastosowano sterowaną dynamikę molekularną, smd i zależność Jarzyńskiego, w celu oszacowania energii swobodnej związanej z procesem rozwijania iM.

Podobnie jak poprzednio jako zmienną kolektywną zastosowano rmsd, atomów tworzących wiązania wodorowe w strukturze iM. Schematyczne przedstawienie tych wiązań wodorowych można zobaczyć na Rys. 6.1. Stany odniesienia do obliczenia rmsd były stanami końcowymi z obliczeń standardową dynamiką z Rys. 8.4. Zostały one wzięte bezpośrednio tylko w przypadku układów z iMp, tj. a10 i a20. Wynika to z faktu, że podczas obliczeń struktury iMp w układach a10 i a20 były nienaruszone. Inaczej było w przypadku układów n10 i n20, gdzie iM stale się pogarszał od samego początku obliczeń. Struktury pokazane na Rys. 8.4. przeszły już około 100 ns na różnych etapach obliczeń, a zatem iMs w układzie n10 i n20 są już znacznie zdeformowane. Dlatego obliczenie prac związanych z rozwijaniem się iM w sterowanych symulacjach prowadziłyby do wyników, których interpretacja byłaby trudna. Zamiast tego w badanym przypadku zastosowano procedurę, która naśladuje zmianę pH z kwaśnego na obojętne, tj. odpowiadająca sytuacji, gdy sztywna i wysoce uporządkowana struktura iM, powstająca w kwaśnym pH, przechodzi do obojętne pH i szybko traci protony z pół-protonowanych cytozyn. Proces ten technicznie odpowiada zastąpieniu struktury atomowej układów n10 i n20 współrzędnymi atomów, pobranymi odpowiednio z układów a10 i a20. Wszystkie inne parametry, w tym topologia pola siłowego są zachowane. W ten sposób można śledzić zmiany w nieprotonowanym iM podczas rozwijania, wychodząc od nienaruszonych struktur iM.

Rys. 8.9. przedstawia wyniki uzyskane przy użyciu sterowanej dynamiki molekularnej. Są to wartości prac wykonanych podczas rozwijania iM, a także liczba wiązań wodorowych między parami C:C⁺ w iM przy danej wartości rmsd.



Rys. 8.9. Prace wyznaczone podczas wymuszonego rozwijania iM, stanowiącego część ugrupowania iG w symulacjach sterowanej dynamiki molekularnej. Zielone krzywe pokazują, jak zmienia się liczba wiązań wodorowych wraz z rmsd.

Patrząc na krzywe wartości pracy w funkcji rmsd dla układów a10 i a20 (protonowany iM) trudno stwierdzić, czy wielkość nanorurki ma istotne znaczenie. Obie krzywe mają mniej więcej ten sam kształt, a pewne różnice między nimi należy przypisać różnym początkowym konfiguracjom. Należy zauważyć, że w obliczeniach smd prace mierzone względem zmiennej kolektywnej różnią się również dla bardzo podobnych konfiguracji początkowych. Dlatego, aby uzyskać bardziej powtarzalne wyniki, takie jak potencjał średniej siły (energii swobodnej), konieczne jest wykładnicze uśrednienie tych krzywych (Park i Schulten 2004). Jednak w tym przypadku uśrednienie byłoby nieefektywne ze względu na wysokie koszty obliczeń pojedynczej krzywej. Tak więc można stwierdzić, że rozmiar nanorurki ma raczej minimalny wpływ na stabilność protonowanego iM. Ponadto obecność lub brak nanorurki węglowej ma również raczej nieistotny wpływ na stabilność iMp. Ten wniosek można wyciągnąć porównując wyniki na Rys. 8.9. z analogicznymi wynikami dla układu iG bez obecności nanorurki (Rys. 6.6). Jak widać kształty krzywych są zbliżone, a także maksymalne wartości prac niezbędnych

do uzyskania 25 Å rmsd mieszczą się w przedziale 1200-1800 kJ mol⁻¹. Zatem w każdym z tych przypadków protonowany iM jest wysoce stabilny.

Mechanizm rozwijania układu a10 i a20 wydaje się być za to zależny od rozmiaru nanorurki. Można zauważyć, że w a10 początkowa liczba wiązań wodorowych jest równa wartości teoretycznej, tj. 18. Spada ona kolejno w grupach po 3, ponieważ w parach C:C⁺ zawsze mamy trzy różne wiązania wodorowe. W przypadku wąskich nanorurek do zerwania wszystkich wiązań wodorowych jest potrzebna duża wartość rmsd około 24 Å. Układ a20 wykazuje jakościowo odmienne zachowanie, ponieważ możemy zauważyć, że na początku wymuszonego rozwijania, 3 wiązania wodorowe już nie istnieją. Efekt ten należy przypisać destrukcyjnemu wpływowi nanorurki (20,0) na strukturę protonowanego iM. Wzrokowa kontrola tego układu pozwala stwierdzić, że nanorurka (20,0) jest w stanie zniszczyć dolną część iM w miejscu, w którym łączy się z kanonicznymi częściami nici bogatej w cytozynę. W układzie a20 wiązania wodorowe zrywają się szybciej niż w przypadku a10. Jednak praca niezbędna do rozerwania ich wszystkich jest nieco większa niż w przypadku wąskiej nanorurki.

Zachowanie układów n10 i n20 czyli przypadków, w których struktura iG powstała przy kwaśnym pH i jest przenoszona do pH obojętnego, różni się znacznie od przypadków a10 i a20. Praca wykonana podczas rozwijania iM w tych układach jest ujemna do wartości ok. 10 Å rmsd. Fizycznie oznacza to, że proces jest spontaniczny, a obecność dodatkowego potencjału w ramach smd ogranicza ten proces. Zatem zmiana pH z kwaśnego na obojętne, co wiąże się ze zmianą protonacji cytozyn, prowadzi do bardzo szybkiej i spontanicznej utraty symetrii iM. Jak widać na Rys. 8.9., prawie wszystkie wiązania wodorowe uległy szybkiemu zniszczeniu w zakresie 0-10 Å rmsd. Oznacza to, że pary Hoogsteena C:C⁺ stają się niestabilne po usunięciu jednego z trzech wiązań wodorowych. Wówczas wzrost rmsd związany jest ze zmianą ułożenia C:C od samego początku. W przeciwieństwie do układów a10 i a20, w których pary C:C⁺ były utrzymywane aż do wartości rmsd 18-24 Å.

Wpływ średnicy nanorurki, czyli różnicy między układem n10 i n20 jest raczej niewielki, podobnie jak w przypadku a10 i a20. W obu rozpatrywanych przypadkach obliczona praca przyjmuje dodatnią wartość dopiero przy rmsd większym niż ~ 10 Å, co oznacza, że w tym miejscu proces rozwijania iM staje się wolniejszy od prędkości przemieszczania się punktu, do którego zaczepiono potencjał harmoniczny. Jednak różnica w stabilności układów z protonowanym i nieprotonowanym iM jest wyraźna. Sprotonowany iM potrzebuje dużo energii, aby wyprowadzić atomy z początkowej

symetrii, ale nieprotonowany iM rozwija się samoistnie. Jednak to spontaniczne pogorszenie w pewnym momencie staje się powolne lub nawet zatrzymuje się i wymaga zewnętrznej, dodatkowej siły, aby postępować dalej. Podobny wniosek wyciągnięto w przypadku iM będącego częścią iG, ale bez obecności nanorurek węglowych (Wolski, Nieszporek, i in. 2019). W tych przypadkach rmsd dla nieprotonowanego iM nieznacznie wzrosło, ale po pewnym czasie osiągnęło poziom plateau. Oznacza to, że początkowa struktura nieprotonowanego iM została osłabiona, ale jej całkowite pogorszenie się zostało zatrzymane z powodu obecności Gq lub po prostu bogatej w guaninę nici komplementarnej. Z kolei wiadomo, że nieprotonowany iM rozwija się samoistnie w strukturę spinki do włosów lub losowe struktury. We wcześniejszych badaniach zaobserwowano również, że obecność nanorurek węglowych faktycznie przyspiesza pogorszenie struktury iM (Wolski, Wojton, i in. 2019). Obecne wyniki potwierdzają wniosek, że rozwijanie nieprotonowanego iM jest w pewnym momencie utrudnione, ponieważ rmsd na Rys. 8.7. całej struktury iG jest w przybliżeniu stały w rozpatrywanych okresach czasu. Tak więc, nieprotonowany iM szybko traci wiązania wodorowe między parami C:C, osiąga bardzo luźną i otwartą formę i pozostaje w niej przez długi czas lub nawet na stałe. Ta statyczna forma iM nie może być jednak nazywana regularnym i-motifem, ponieważ jego symetria jest daleka od idealnej, początkowej symetrii z sześcioma parami Hoogsteena C:C⁺. Niemniej jednak, ze względu na obecność komplementarnych nici bogatych w guaninę, końcowych fragmentów nici bogatych w cytozynę i wreszcie nanorurek węglowych, ta forma iM staje się z czasem bardzo statyczna.

8.3. Podsumowanie wyników

Przedstawione w powyższym rozdziale wyniki dotyczą dwóch odrębnych, ale w rzeczywistości powiązanych, ważnych problemów związanych z interakcją nanorurek węglowych z fragmentami DNA, zawierającymi niekanoniczne struktury DNA. Pierwszy problem dotyczy strony czysto obliczeniowej i został wykryty podczas prób wyznaczenia optymalnych termodynamicznie konfiguracji fCNT i iG. Okazało się, że te optymalne konfiguracje są nieosiągalne w standardowych symulacjach dynamiką molekularną jak również przy zastosowaniu różnych dodatkowych metod próbkowania rozszerzonego, które powinny pomóc w pokonaniu barier energetycznych. Metody te okazały się nieskuteczne ze względu na fakt, że niszczą kruche struktury niekanonicznych form iM i Gq.

Dlatego zaproponowano procedurę obliczeniową, która pozwala na efektywne próbkowanie przestrzeni konfiguracyjnej dwóch (lub więcej) złożonych elementów układu, a jednocześnie nie wpływa na ich delikatną strukturę wewnętrzną. Można to osiągnąć poprzez (i) przeniesienie zasadniczych elementów układu do prostego, niejawnego modelu rozpuszczalnika, (ii) przeskalowanie krajobrazu energii potencjalnej tak, aby bariery energetyczne mogły zostać pokonane przez zastosowany czynnik termiczny, (iii) przekształcenie zasadniczych elementów układu w bryły sztywne i przeprowadzenia obliczeń zgodnie z dynamiką ciała sztywnego, (iv) zastosowanie czynników przyspieszających próbkowanie przestrzeni konfiguracyjnej układu, takich jak zwiększenie temperatury symulacji i przeprowadzenie symulacji wymiany replik. Takie podejście pozwala szybko uzyskać struktury, które są znacznie bliższe konfiguracjom termodynamicznie optymalnym niż te, otrzymane z bardzo długich obliczeń standardową dynamiką molekularną.

Stosując powyższą procedurę, przeanalizowano konfiguracje iG i nanorurek sfunkcjonalizowanych guaniną. W wyniku przeprowadzonych obliczeń można stwierdzić, że preferowane konfiguracje tych struktur zachodzą, gdy fCNT znajduje się w połączeniu Gq, iM i dupleksu DNA oraz gdy iG zostaje unieruchomione na powierzchni nanorurki. Brak grup funkcyjnych guaniny na końcówkach nanorurek prowadzi do swobodnego ruchu iG po powierzchni CNT. Prowadzi to do ogólnego wniosku, że obecność grup funkcyjnych guanin sprzyja konfiguracjom z końcówkami nanorurek blisko struktur Gq i iM. To z kolei oznacza, że taki rodzaj funkcjonalizacji CNT sprawia, że nanorurki są w stanie selektywnie atakować swoją końcówką części DNA zawierające Gq i iM. Brak funkcjonalizacji grupami guaninowymi prowadzi do niespecyficznego ułożenia tych elementów układu.

W przeprowadzonych badaniach nie stwierdzono stabilizującego wpływu CNT na strukturę iM w obojętnym pH, będącego efektem fizycznego oddziaływania między tymi dwoma układami. Stwierdzono jednak, że pogorszenie iM przy neutralnym pH jest w pewnym momencie utrudnione ze względu na obecność albo bogatych w guaninę nici komplementarnych lub struktury Gq albo nanorurek węglowych. Struktura przestrzenna iM pogarsza się szybko i spontanicznie, aż do momentu utraty wszystkich wiązań wodorowych w parach C:C Hoogsteena. Następnie struktura ta staje się statyczna, ale nie można jej nazwać i-motifem, ponieważ jej charakterystyczne czynniki w postaci par Hoogsteena nie istnieją. Zatem obserwowana w literaturze stabilizacja iM przez karboksylowane CNT jest najprawdopodobniej spowodowana przeniesieniem protonów

z grup karboksylowych z funkcjonalizowanej CNT i tworzeniem pół-protonowanych cytozyn. Następnie kompleks iM-CNT staje się wysoce stabilny dzięki równowadze kwasowo-zasadowej między karboksylowaną CNT a nieprotonowanymi cytozynami. Jest bardzo prawdopodobne, że karboksylowana nanorurka również preferencyjnie atakuje część DNA, zawierającą Gq+iM (lub tylko fragmenty DNA bogate w cytozynę) swoimi końcówkami. Dlatego taki czynnik chemiczny jak transfer protonów jest wysoce możliwy, gdy protonowana reszta karboksylowa zbliża się do nieprotonowanej cytozyny. Wtedy bardzo prawdopodobna jest stabilizacja, a nawet inicjacja formowania się iM.

9. Analiza procesu protonacji telomerowych fragmentów DNA przez karboksylowane nanorurki węglowe

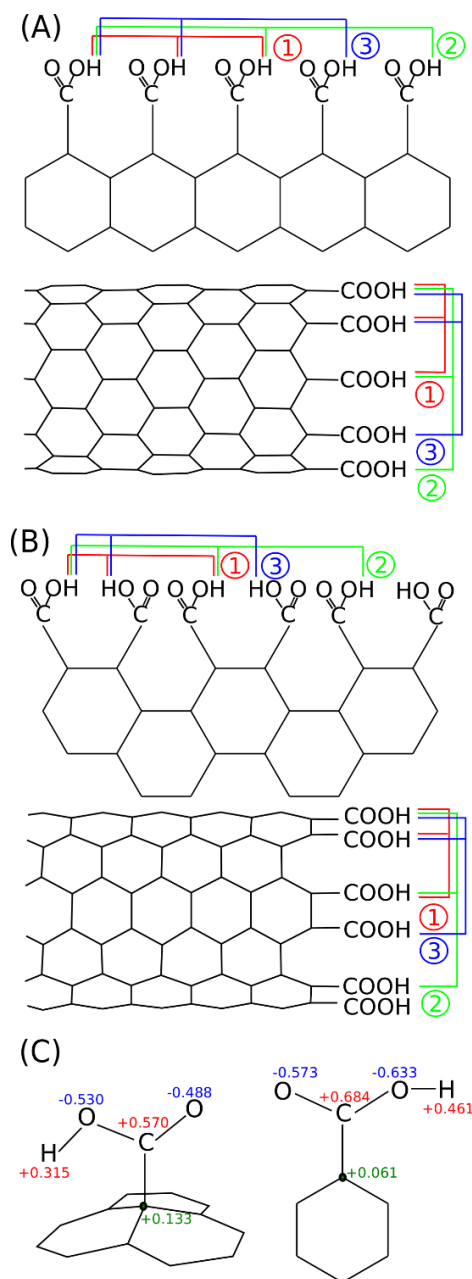
Jak już wielokrotnie omawiano, w części telomerowej DNA, zbudowanej z wysoce powtarzalnych sekwencji par zasad, mogą tworzyć się niekanoniczne struktury G-quadrupleksu i i-motifu. Jednakże, aby w nici bogatej w cytozynę utworzyła się struktura i-motifu, muszą pojawić się pary zasad cytozyna:cytozyna protonowana, C:C⁺. Zatem kluczowym czynnikiem koniecznym do formowania się tej niekanonicznej struktury iM jest protonowanie triad cytozynowych. W powyżej opisanych badaniach stwierdzono, że obserwowana w literaturze indukcja tworzenia iM w wyniku interakcji z karboksylowanymi jednościennej CNT (Li i in. 2006) nie jest bezpośrednio związana ze szczególną geometrią nanorurek węglowych. Jest zatem wysoce prawdopodobne, że efekt ten jest związany ze zwiększoną zdolnością do protonowania triad cytozyny przez kwasowe grupy karboksylowe nanorurek. Motywacją do wykonania poniżej opisanych badań była więc potrzeba fundamentalnego zrozumienia procesów molekularnych, odpowiedzialnych za stabilizację iM w wyniku oddziaływania z karboksylowanymi nanorurkami węglowymi. W badaniach tych skupiono się na analizie prawdopodobieństwa przeniesienia protonów z grup karboksylowych do cytozyn w obrębie nici bogatej w cytozynę w telomerowym duplekcie DNA. Za pomocą dynamiki molekularnej przeanalizowano geometryczny dostęp grup karboksylowych do miejsca występowania trzech sąsiadujących ze sobą cytozyn w obrębie bogatej w cytozynę nici dupleksu oraz wykonano kwantowo-chemiczną analizę reakcji przeniesienia protonu w wybranych, najbardziej optymalnych konfiguracjach geometrycznych.

9.1. Szczegóły dotyczące budowy i symulacji badanych układów

9.1.1. Nanorurki węglowe

W badaniach zastosowano dwa rodzaje nanorurek węglowych: typu zygzak o indeksach chiralnych typu (n,0) oraz nanorurki fotełowe o indeksach chiralnych typu (n,n). Oba typy nanorurek były funkcjonalizowane grupami karboksylowymi, zlokalizowanymi albo na ściankach bocznych nanorurek, albo na ich końcówkach. W zależności od lokalizacji grup funkcyjnych, generowanie topologii pola siłowego było

różne. W przypadku funkcjonalizacji końcówek zaczęto od cząsteczki wzorcowej, którą był kwas benzoesowy. Rys. 9.1. pokazuje schematyczne reprezentacje obu typów nanorurek funkcyjnalizowanych na końcówce z wyraźnie widocznymi fragmentami kwasu benzoesowego w strukturach.



Rys. 9.1. Schematyczne przedstawienie nanorurek zygzakowatych (A) i fotelowych (B) z sfunkcjonalizowaną końcówką. Triady grup karboksylowych oznaczone cyframi ①, ② i ③ reprezentują możliwe kombinacje tych grup, wykorzystywanych do dokowania do triad cytozyny w duplekcie DNA. Liczba ① oznacza, że podjęto próbę dokowania przy użyciu bezpośrednio sąsiadujących grup COOH, ② oznacza, że co druga grupa jest używana do dokowania, a ③ oznacza, że triada składa się z dwóch sąsiednich grup, a trzecia pochodzi z najbliższego sąsiedztwa. (C) Cząsteczki wzorcowe dla grup karboksylowych na ścianie bocznej i na wierzchołku stosowane do wyznaczenia ładunków cząstkowych i topologii składowych pola sił, które mają być wszczepione do nanorurki.

Cząsteczka kwasu benzoowego została wykorzystana do wyznaczenia ładunków punktowych na poszczególnych atomach przy użyciu omawianej już procedury RESP (Vanquelef i in. 2011), a ich wartości przedstawione są na Rys. 9.1. C. Topologia pola siłowego z wierzchołkową grupą -COOH została wygenerowana przy użyciu skryptu AcPyPe, (Sousa da Silva i Vranken 2012) podobnie jak w rozdziale 7.1. Grupy karboksylowe rozmieszczono na obwodzie nanorurki według schematu przedstawionego na Rys. 9.1. W zależności od chiralności CNT struktura atomowa końcówki nanorurki różni się, co prowadzi do odmiennego rozmieszczenia grup COOH. Dodatkowo przyjęto, że grupy karboksylowe mogą przyłączać się do krawędzi nanorurki z różną częstością - prowadząc do różnych gęstości grup COOH na obwodzie CNT. Różne sekwencje ułożenia grup COOH są oznaczone na Rys. 9.1 symbolami (1) - każdy węgiel obsadzony grupą COOH, (2) - co drugi węgiel obsadzony grupą COOH oraz (3) - dwa kolejne i co drugi węgiel obsadzony grupą COOH. W ten sposób uzyskano trzy różne geometrie grup COOH użyte w dalszym kroku do ataku na triady cytozyn w obrębie dupleksu DNA.

Funkcjonalizację ścian bocznych CNT przeprowadzono według tej samej procedury. Jednak w tym przypadku cząsteczką szablonem był fragment, zbudowany z trzech sąsiednich pierścieni benzenowych z grupą COOH połączoną z centralnym atomem węgla, jak pokazano na Rys. 9.1.C (po lewej stronie). Przy funkcjonalizacji przyjęto, że gęstość grup karboksylowych na ścianach bocznych wynosi 2% całkowitej liczby atomów węgla w nanorurce.

Badane układy dzielą się na funkcjonalizowane na końcówce i funkcjonalizowane na ścianie bocznej. Układy funkcjonalizowane na końcówce miały następujące chiralności: (5,0), (7,0), (10,0), (15,0), (3,3), (4,4), (6,6), (7,7) i (9,9). Każda z wymienionych chiralności była testowana przy użyciu omawianych trzech różnych sekwencji ułożenia grup karboksylowych w końcówce nanorurki. Znaczenie etykiet ①, ② i ③ wyjaśniono w opisie Rys. 9.1.

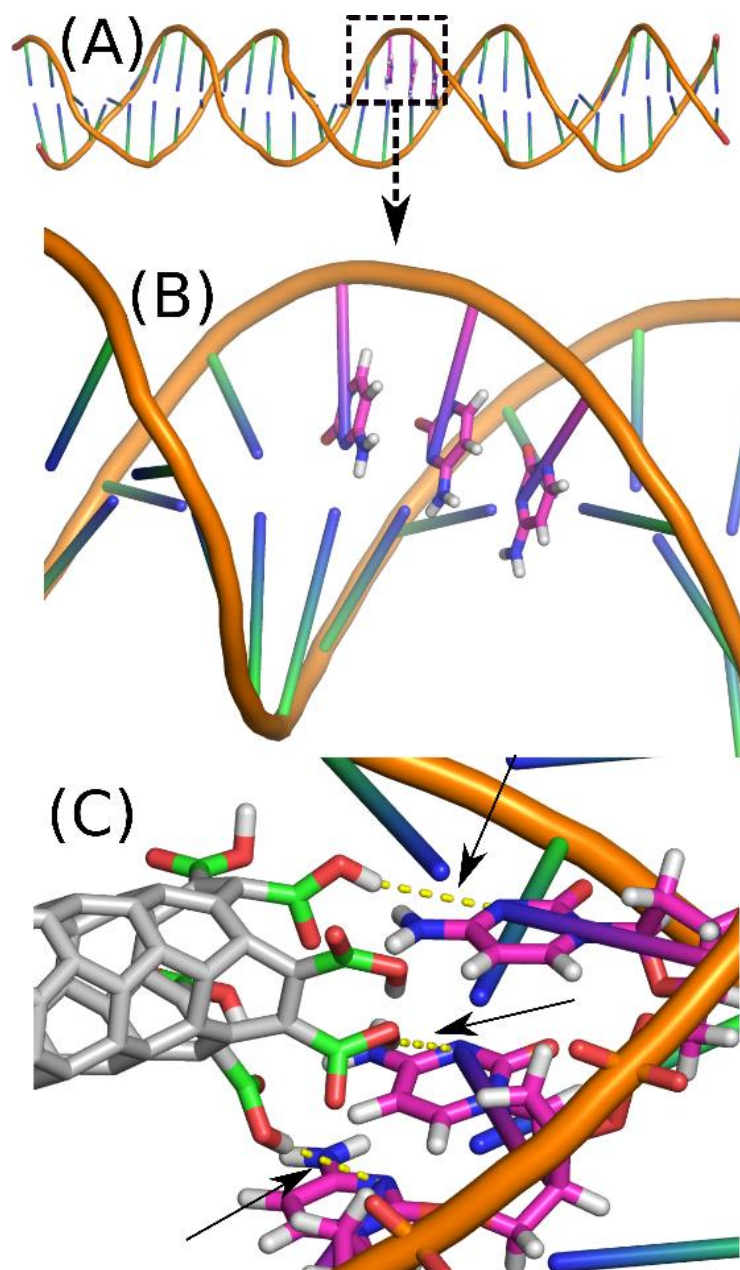
Nazwy badanych układów składają się z trzech liczb, pierwsze dwie w nawiasach oznaczają chiralność nanorurki, a trzecia oznacza sekwencję grup karboksylowych użytych do dokowania. Na przykład układ (5,0)1 oznacza CNT z chiralnością (5,0) i sekwencją ① zdefiniowaną na Rys. 9.1.

Układy funkcjonalizowane na ścianach bocznych składają się z nanorurek o takich samych chiralnościach jak powyżej plus dwie dodatkowe (20,0) i (11,11). Ponieważ w tym przypadku do dokowania używano tylko jednej grupy karboksylowej

(zlokalizowanej mniej więcej w środku nanorurki), liczba różnych układów wynosi $12 \times 3 = 36$, gdyż próby dokowania odbywały się dla każdej z trzech cytozyn w triadzie. Nazwy tych układów ustalono za pomocą indeksów chiralnych i cyfry 1,2 lub 3, która oznacza cytozynę, do której następuje próba dokowania. Na przykład nazwa (5,0)2 oznacza nanorurkę (5,0) przyciąganą do cytozyny w środku triady. Cyfry 1 i 3 oznaczają odpowiednio cytozynę na lewo (1) lub na prawo (3) od cytozyny środkowej. Tak więc ta sama nazwa układu dla nanorurek funkcjonalizowanych na końcówce i ścianie bocznej oznacza inną sytuację fizyczną.

9.1.2. Helisa Watsona-Cricka

Próby dokowania przeprowadzono przy użyciu standardowej struktury dupleksu DNA. Architekturę molekularną tej struktury wygenerowano za pomocą programu `fd_helix.c` dostępnego na stronie internetowej grupy Davida A. Case. Prawoskrętna podwójna helisa B-DNA została wygenerowana przy użyciu sekwencji (TTAGGG):(CCCTAA) powtórzonej pięć razy. Powstały dupleks składał się z 60 zasad azotowych. Struktura ta jest pokazana na Rys.9.2 A. Sekwencja trzech sąsiednich cytozyn w środku dupleksu Watsona-Cricka (WC), została wybrana jako kieszeń do dokowania nanorurki funkcjonalizowanej COOH (Rys.9.2 B.). Atomy azotu, do których protony mogą być potencjalnie przyłączone w pH kwaśnym oznaczono kolorem niebieskim na końcach różowo-niebieskich pałeczek. Jak widać, te atomy azotu są dostępne od strony szerokiego rowka dupleksu. Rys. 9.2 C przedstawia przykład dokowania dla nanorurki ze sfunkcjonalizowaną końcówką typu (3,3)3. Strzałki na Rys. 9.2 C. pokazują pary atomów $\text{OH} \cdots \text{N}$, pomiędzy którymi może zachodzić transfer protonów.



Rys. 9.2. (A) Schematyczne przedstawienie całej struktury dupleksu WC zastosowanej w badaniu. (B) Powiększony przekrój dupleksu WC z sekwencją trzech cytozyn, które są podatne na protonację. (C) Przykład wyniku dokowania dla układu (3,3)3. Zaznaczone strzałkami, żółte przerywane linie, oznaczają pary wodór-azot, pomiędzy którymi rozważany jest transfer protonu.

9.1.3. Szczegóły obliczeniowe dotyczące dynamiki molekularnej

Wszystkie obliczenia prezentowane w tym rozdziale przeprowadzono przy użyciu pakietu obliczeniowego LAMMPS. Rozmiary pudełek symulacyjnych wynosiły około $100\text{\AA} \times 100\text{\AA} \times 100\text{\AA}$, a całkowita ilość atomów wynosiła 80 000-100 000 w zależności od danego układu. Liczba cząstek wody wynosiła 26 000 – 30 000, a algorytm SHAKE był używany do usztywniania cząsteczek wody. Układy zawierały również odpowiednie

ilości jonów Na^+ i Cl^- , aby skompensować ładunek szkieletu fosforanowego i wytworzyć siłę jonową roztworu $0,15 \text{ mol L}^{-1}$. Obliczenia przeprowadzono w zespole NPT z krokiem całkowania 2 fs, a odległość odcięcia dla oddziaływań międzyatomowych wynosiła 12 \AA . Periodyczne warunki brzegowe zastosowano we wszystkich kierunkach, a oddziaływania elektrostatyczne sumowano stosując metodę pppm (ang. Particle–Particle–Mesh), będącą modyfikacją algorytmu sumowania Ewalda. Ciśnienie i temperaturę kontrolowano za pomocą barostatu Nose-Hoover’a.

Początkowo dupleks DNA i funkcjonalizowana nanorurka węglowa zostały umieszczone w pewnej odległości (większej niż zakres oddziaływania) oraz zostały poddane relaksacji i równowagowaniu w wodzie. W trakcie równowagowania oba związki były unieruchomione w swoich początkowych pozycjach. Dupleks DNA był traktowany jako ciało sztywne zarówno na etapie równowagowania, jak i podczas procesów dokowania. Okazało się to konieczne, ponieważ w przeciwnym razie podczas zderzenia nanorurki z dupleksem DNA, obszar zderzenia DNA był silnie deformowany pod wpływem pędu nanorurki. Oczywiście prowadziłoby to do uzyskania sztucznie dobrych dopasowań grup karboksylowych i atomów azotu na bardzo krótkich odległościach między nimi i co za tym idzie zafałszowania obrazu geometrycznego. Dlatego sztywna struktura dupleksu DNA prawidłowo przedstawia geometryczny dostęp sfunkcjonalizowanej nanorurki do wewnętrznej sekwencji triad cytozyny. Ponadto dane literaturowe sugerują, że dsDNA jest rzeczywiście stosunkowo sztywną strukturą, gdy weźmie się pod uwagę jego interakcję z jednościennejmi CNTs (Santosh i in. 2012).

Procesy dokowania przeprowadzano zgodnie z następującą procedurą. W przypadku nanorurek z funkcjonalną końcówką, do każdego atomu wodoru należącego do danego zestawu (1), (2) lub (3) układu grup karboksylowych była dołączona sprężyna. Drugie końce sprężyn zostały przymocowane do punktów poruszających się w kierunku trzech atomów azotu należących do reszt cytozyny, jak pokazano na Rys. 9.2.B. Punkty te poruszały się ze stałymi prędkościami tak dobranymi, aby poruszające się punkty mogły osiągnąć cel w ciągu 2 ns. Stałe siłowe dla sprężyn były dobrane tak, aby znaleźć optymalną siłę prowadzącą do skutecznego przeciągnięcia nanorurki i jednocześnie minimalnego zaburzenia naturalnego ruchu obiektów związanego z potencjałami międzyatomowymi. Wartość tej stałej wynosiła $0,8 \text{ eV \AA}^{-2}$. Podczas przeciągania CNT w kierunku triad cytozyny monitorowano pracę związaną z siłami, przeciwko którym postępował ruch. Monitorowano również odległości między

wodorami z grup COOH i azotami w obrębie pierścieni cytozyny, w rezultacie skonstruowano wykresy pracy w funkcji odległości dla każdej pary H-N.

W przypadku CNTs funkcjonalizowanych na ścianach bocznych, sprężyny były umieszczone pomiędzy wodorem z grupy karboksylowej, zlokalizowanej gdzieś w środkowej części nanorurki, a punktem przesuwanym się w kierunku jednej z cytozyn w duplesie WC. Ta sama procedura obliczeniowa została zastosowana do pomiaru pracy związanej z przeciąganiem CNT. W tym przypadku, jak wspomniano, użyto tylko jednej pary H-N, ponieważ założono, że protonowanie może być w tym przypadku sekwencyjne. Oznacza to, że cytozyny mogą być protonowane jedna po drugiej podczas ślizgania się CNT w szerokim rowku duplesu. Wiele grup karboksylowych ze ściany bocznej może więc niezależnie zbliżać się do triad cytozyn. W przeciwieństwie do tego, funkcjonalizacja na wierzchołku wymaga jednoczesnego uderzenia grup karboksylowych w triady cytozyn, aby nastąpiło ich skuteczne sprotonowanie.

9.1.4. Szczegóły dotyczące obliczeń kwantowo-chemicznych

Głównym celem obliczeń kwantowo-chemicznych było sprawdzenie czy przeniesienie protonu z grupy karboksylowej do azotu z pierścienia cytozyny jest możliwe w kilku konkretnych przypadkach. Takie obliczenia kwantowo-chemiczne przeprowadzono tylko dla dwóch wybranych układów, różniących się zasadniczo lokalizacją grup COOH, tj. na ścianie bocznej lub na końcu nanorurki. Współrzędne atomowe obu układów zaczerpnięto z wyników symulacji dynamiki molekularnej. Dodatkowo do obliczeń na poziomie kwantowym wybierano tylko ich najważniejsze fragmenty ze względu na rozmiar i ilość atomów w układach.

Uprozczone struktury wybrane do obliczeń kwantowo-chemicznych zawierały odpowiednio 572 i 545 atomów dla obu układów. Dla tak dużych układów wykonanie obliczeń ab initio lub DFT energii i jej gradientu, niezbędnych do optymalizacji geometrii, byłoby bardzo czasochłonne. Dlatego układy te opisano za pomocą mieszanego zbioru baz funkcyjnych: dokładniejszego dla najważniejszej części układu i mniej dokładnego na pozostałych atomach. Te dwa zestawy baz funkcyjnych zostały wybrane jako 6-31g-dp i STO-2g (Francl i in. 1982). Baza funkcyjna 6-31g-dp została użyta dla zespołu atomów należących do „centrum aktywnego” danego układu, natomiast STO-2g dla pozostałych atomów. Centrum aktywne powinno jednak zawierać możliwe wszystkie istotne atomy tak aby właściwie odwzorować ścieżkę reakcji. Jednocześnie

liczba tych atomów powinna być możliwie niewielka. Dlatego w przypadku nanorurki funkcjonalizowanej na ścianie bocznej, wybrano jako rozsądny kompromis między dokładnością, a wydajnością obliczeniową, wszystkie atomy w odległości 5 Å albo od atomu wodoru (z grupy COOH), albo od atomu azotu (w obrębie pierścienia cytozyny), oba biorące udział w rozważanej reakcji przeniesienia protonu. W rezultacie całkowita liczba atomów w centrum aktywnym wyniosła 75.

W przypadku nanorurki funkcjonalizowanej na końcówce, zawierającej trzy grupy karboksylowe, centrum aktywne musi zawierać wszystkie te grupy wraz z trzema odpowiednimi pierścieniami cytozyny. Stosując tę samą koncepcję wybierania atomów do miejsca aktywnego, uzyskano obszar zawierający 133 atomy. Atomy te znajdowały się w odległości mniejszej niż 5 Å od któregośkolwiek z atomów wodorów i azotu, biorących udział w reakcjach przeniesienia protonów.

Analiza energetyczna ścieżki reakcji wymaga wyznaczenia wartości energii układu w conajmniej trzech punktach powierzchni energii potencjalnej (PES): struktura początkowa (minimum lokalne), struktura końcowa (minimum lokalne) i łączący je stan przejściowy (punkt siodłowy). W tym celu zastosowano metodę, opierającą się na zastosowaniu siły zewnętrznej, która wypycha wodór (z grupy karboksylowej) w kierunku azotu (w pierścieniu cytozyny). Jest to tzw. metoda wymuszonej optymalizacji geometrii (EGO) (Wolinski i Baker 2010). W metodzie EGO wykonywana jest standardowa optymalizacja geometrii, ale z dodatkowymi siłami zewnętrznymi działającymi na wybrane atomy. Metoda ta została ostatnio z powodzeniem zastosowana do badania reakcji przeniesienia protonów w cząsteczce 2-metylofuranu (Brzyska i Woliński 2020). Tak więc, w każdej parze „grupa karboksylowa - pierścień cytozynowy”, w której ma zachodzić reakcja przeniesienia protonu, przyłożono do wybranego wodoru siłę zewnętrzną rzędu 0,050-0,100 au (1 au = 82 400 pN), popychającą go w kierunku danego azotu. Podczas optymalizacji geometrii wodór przemieszcza się wzdłuż ścieżki o najniższej energii na PES, od grupy karboksylowej w kierunku azotu w pierścieniu cytozyny. W każdym cyklu optymalizacji zmienia się struktura i energia układu, co widać na tzw. wykresie historii optymalizacji geometrii (wykres EGO). Taki wykres pokazuje barierę energetyczną, którą trzeba pokonać siłami zewnętrznymi, aby przesunąć układ od struktury początkowej do końcowej. Obecność takiej bariery energetycznej na wykresie EGO wskazuje na trwałą zmianę strukturalną układu molekularnego. Należy jednak pamiętać, że każda konstrukcja z wykresu EGO reprezentuje strukturę naprężoną z uwagi na istnienie sił zewnętrznych. Taką naprężoną strukturę należy następnie zrzutować na

zwykły PES, tj. dokonać optymalizacji geometrii bez żadnych sił zewnętrznych. Każda struktura z wykresu EGO przed maksimum energii po relaksacji powróci do struktury początkowej, podczas gdy struktury za barierą energetyczną przejdą do nowego lokalnego minimum, w analizowanym przypadku do końcowego produktu, związanego z reakcją przeniesienia protonu. Struktura, która odpowiada maksimum energii na wykresie EGO, stanowi zwykle dobry punkt wyjścia do poszukiwań stanu przejściowego.

Wszystkie obliczenia przedstawione w niniejszym rozdziale zostały wykonane na poziomie DFT, z potencjałem wymiennie-korelacyjnym B3LYP, przy użyciu zestawu baz funkcyjnych 6-31g-dp/STO-2g. Obliczenia te zostały wykonane przy użyciu programów PQS i PQSViewer (Baker i in. 2009). Wybór funkcjonału B3LYP podyktowany był jego wcześniejszym zastosowaniem w badaniach właściwości CNT (Matsuda, Tahir-Kheli, i Goddard 2010) oraz telomerowych fragmentów DNA, w tym ich niekanonicznych form (Jissy i Datta 2014).

9.2. Wyniki obliczeń i ich dyskusja

9.2.1. Rezultaty dokowania otrzymane przy użyciu dynamiki molekularnej

Wyniki dokowania nanorurek, funkcjonalizowanych grupami karboksylowanymi, do kieszeni triady cytozyny, zebrano i przedstawiono w Tabeli 9.1. Wymagana była duża liczba (36) układów, ponieważ początkowo trudno było przewidzieć, jak wrażliwe są wyniki na układ grup karboksylowych lub chiralność nanorurek.

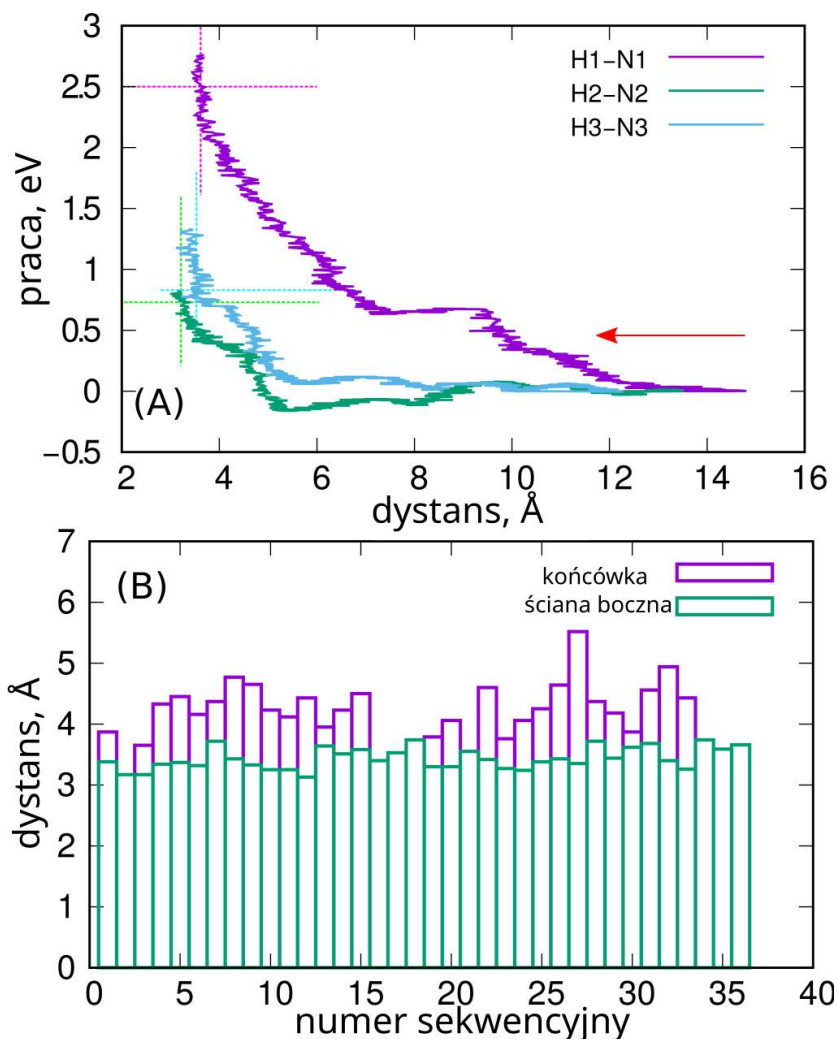
W tej tabeli przedstawiono minimalne odległości znalezione między wodorami z grup karboksylowych i azotami z aromatycznych pierścieni cytozyny. Wyznaczenie tych odległości oparto na analizie wyników symulacji smd. Rys. 9.3.A przedstawia przykładowy wykres pracy w funkcji odległości, uzyskany dla nanorurki z funkcjonalną końcówką, tj. dla układu (3,3)3. Podobne wykresy uzyskano również dla nanorurek z funkcjonalną ścianą boczną, chociaż w takich przypadkach każdy azot w triadzie cytozyny był testowany w osobnej symulacji.

Tabela 9.1. Wyniki dokowania nanorurek z grupami karboksylowymi: wartości minimalnych odległości i wykonanych prac, zarejestrowanych podczas przeciągania nanorurek w kierunku atomów azotu w obrębie triad cytozyny.

Nr	Nazwa układu	Średnica CNT, Å	Minimalna odległość pomiędzy wodorem a azotem, Å				Praca związana z przyciąganiem, eV				
			na końcówce			ściana boczna	na końcówce			ściana boczna	
			1	2	3		1	2	3		
1	(5.0)1	4.2	3.87	3.21	3.36	3.38	2.5	0.3	1.8	0.4	
2	(5.0)2					3.17				1.0	
3	(5.0)3			3.58	3.65	3.45	3.17	1.7	1.6	1.6	0.3
4	(7.0)1	5.8	4.33	3.48	3.36	3.34	3.3	0.7	2.3	0.7	
5	(7.0)2			4.45	3.94	4.16	3.37	3.4	2.5	2.1	1.0
6	(7.0)3			4.16	3.50	3.57	3.32	1.7	0.9	0.7	0.2
7	(10.0)1	7.9	4.37	3.73	3.58	3.72	5.7	0.5	3.2	2.6	
8	(10.0)2			4.77	3.61	4.37	3.43	4.5	0.3	3.5	1.6
9	(10.0)3			4.16	3.82	4.65	3.33	4.2	1.4	1.9	2.3
10	(12.0)1	9.4	4.23	3.79	3.62	3.25	4.1	2.7	0.4	1.9	
11	(12.0)2			4.00	4.12	3.96	3.25	4.0	1.0	3.3	1.3
12	(12.0)3			4.15	4.02	4.43	3.13	3.0	2.9	2.4	0.4
13	(15.0)1	11.6	3.95	3.73	3.25	3.64	1.7	1.3	0.6	2.8	
14	(15.0)2			4.23	3.41	3.92	3.51	6.2	0.7	2.7	2.0
15	(15.0)3			4.50	3.72	3.52	3.58	4.7	0.1	0.9	1.3
16	(20.0)1	15.7				3.40				2.2	
17	(20.0)2					3.53				1.9	
18	(20.0)3					3.74				2.0	
19	(3.3)1	4.4	3.79	3.26	3.38	3.30	2.5	1.0	1.1	1.4	
20	(3.3)2			3.92	4.06	3.65	3.30	2.7	3.4	1.9	0.8
21	(3.3)3			3.55	3.23	3.50	3.55	2.5	0.7	0.8	1.4
22	(4.4)1	5.8	4.60	3.38	3.53	3.42	3.1	1.5	1.8	0.3	
23	(4.4)2			3.76	3.35	3.43	3.27	2.2	2.9	1.8	1.1
24	(4.4)3			4.06	3.31	3.50	3.24	4.1	1.3	0.9	0.8
25	(6.6)1	8.1	4.25	3.24	4.18	3.38	3.1	1.2	3.6	0.4	
26	(6.6)2			4.64	3.52	4.30	3.43	4.5	2.5	5.7	1.0
27	(6.6)3			5.52	4.03	3.79	3.35	4.2	5.4	2.1	1.0
28	(7.7)1	9.8	4.16	4.37	3.58	3.72	4.1	4.8	-0.5	1.5	
29	(7.7)2			4.18	3.59	3.76	3.44	3.6	1.4	3.1	1.5
30	(7.7)3			3.59	3.87	3.59	3.62	3.2	1.7	3.1	1.2
31	(9.9)1	12.6	4.56	3.78	3.40	3.68	5.5	1.6	-0.1	2.1	
32	(9.9)2			4.94	4.04	4.80	3.40	3.6	2.8	3.0	1.6
33	(9.9)3			4.23	4.30	4.43	3.26	4.3	3.7	2.4	1.9
34	(11.11)1	15.3				3.74				3.5	
35	(11.11)2					3.59				2.1	
36	(11.11)3					3.66				5.0	

Idea określenia najlepszego możliwego dostępu grup karboksylowych do kieszeni cytozynowej polega na jednoczesnej analizie minimalnych dystansów pomiędzy atomami wodoru i azotu jak również minimalnej pracy temu towarzyszącej. Podczas przeciągania, prace obliczone dla każdej pary H-N są stosunkowo niewielkie na odległościach większych niż około 6 Å. Jednak zaczynają one gwałtownie rosnać, gdy atom wodoru napotyka przeszkody steryczne, ponieważ siła z którą następuje ruch musi być wtedy zwiększona. W pewnym momencie ruch atomu wodoru jest całkowicie zablokowany, ponieważ przeszkód sterycznych nie da się już pokonać i obserwujemy „skoki” na wykresach z Rys. 9.1A. Odległości, odpowiadające tym skokom, uważa się za najbliższe możliwe przy danej kombinacji chiralności nanorurek i sekwencji grup karboksylowych. Wartości prac, od których zaczynają się skoki, są również interesującą informacją, ponieważ informują o tym, jak "łatwo" można uzyskać daną konfigurację.

Rys. 9.3B. przedstawia wyniki z Tabeli 9.1. w łatwiejszej do analizy formie graficznej. Dla CNT funkcjonalizowanych na końcach przedstawiono jedynie największą wartość odległości znaną w danej triadzie. Jest to wystarczające do podjęcia decyzji co do użyteczności danego układu, gdyż najtrudniejszy element decyduje o użyteczności całego zespołu elementów. Zakładamy tutaj, że im mniejsza odległość na jaką mogą zbliżyć się atomy H i N, tym bardziej prawdopodobny jest transfer protonu, a pomyślnie protonowanie ma miejsce tylko wtedy, gdy trzy cytozyny są sprotonowane jednocześnie. W przypadku nanorurki z funkcjonalizowaną ścianą boczną mamy jedną parę minimalnych wartości odległości i pracy, gdyż w takim przypadku protonacja poszczególnych cytozyn w triadzie zachodzi niezależnie.



Rys. 9.3. (A) Przykładowy wykres pracy w funkcji odległości dla układu (3,3)3, wykorzystanego do określenia minimalnych odległości między H-N przedstawionymi w Tabeli 9.1. Krzyżyk na każdym wykresie pokazuje punkt, w którym praca zaczyna gwałtownie rosnąć – współrzędne tego punktu to wartości odległości i pracy z Tabeli 9.1. Czerwona strzałka wskazuje kierunek przeciągania. (B) Minimalne odległości z Tabeli 9.1; dla nanorurek z funkcjonalizowaną końcówką do wykreślenia wybrano jedynie maksymalną odległość, znaną w zestawie trzech par.

Analiza danych z Tabeli 9.1. i wykresu 9.3B. prowadzi do kilku interesujących wniosków. Mianowicie widzimy, że sekwencja grup karboksylowych (1), (2) lub (3) ma pewien wpływ na najlepszy możliwy dostęp tych grup do triad cytozyny. Jednak efekt ten jest mniejszy niż można by oczekiwać, ponieważ prawie wszystkie wartości minimalnych odległości mieszczą się w zakresie 3-5 Å. Podobnie chiralność i średnica nanorurek mają jedynie umiarkowany wpływ i wydaje się, że nanorurki funkcjonalizowane na końcach o pośrednich średnicach 8-9 Å są najmniej skuteczne. Wydaje się, że nanorurki funkcjonalizowane na ściankach bocznych są ogólnie bardziej skuteczne niż te z funkcjonalizacją końcówką, a różnice między różnymi nanorurkami są jeszcze mniej wyraźne.

Ogólną tendencją, popartą głównie wyznaczonymi wartościami prac jest to, że wąskie nanorurki mają łatwiejszy dostęp do cytozyny w duplesie DNA niż szersze. Funkcjonalizacja ściany bocznej jest również bardziej efektywna z punktu widzenia dostępu grup karboksylowych do cytozyn. Może to wspierać eksperymentalne obserwacje Chen'a i wsp. (Chen i in. 2012), którzy odkryli różne efekty interakcji jednościennej i wielościennej nanorurek z telomerowymi sekwencjami DNA. Zdecydowanie ważnym czynnikiem, odpowiedzialnym za aktywność nanorurek jednościennej i brak aktywności nanorurek wielościennej, jest średnica nanorurki. Maksymalne średnice badanych nanorurek ograniczają się do nanorurek (20,0) typu zygzak lub (11,11) o strukturze fotelowej, które mają średnice około 15 Å. W obu przypadkach uzyskano dość małe wartości minimalnych odległości między grupą karboksylową a cytozynami, ale jednocześnie nakład pracy potrzebny do osiągnięcia tych stanów jest duży. Wspomniane małe odległości uzyskano kosztem pewnej deformacji ścian bocznych nanorurki w sąsiedztwie grupy karboksylowej. Efekt ten powinien zniknąć dla znacznie szerszych i twardszych wielościennej nanorurek, co powinno prowadzić do znacznego wzrostu minimalnych odległości jak i prac związanych z ich osiągnięciem.

Ogólny wniosek płynący z prób dokowania przy pomocy dynamiki molekularnej jest taki, że bez względu na sekwencję grup karboksylowych na końcówce nanorurki lub chiralność/średnicę nanorurki (do ok. 15 Å), grupy karboksylowe są w stanie uzyskać dostęp do cytozyny, przez szeroki rowek z mniej więcej taką samą skutecznością. Kolejnym pytaniem jest zatem, czy w tej konfiguracji może wystąpić bezpośrednie przeniesienie protonu, prowadzące do protonowanych cytozyn i zjonizowanej karboksylowanej nanorurki.

Analiza kwantowo-chemiczna wszystkich przypadków, przedstawionych w Tabeli 9.1., byłaby niezwykle czasochłonna. Dlatego skupiono się tylko na dwóch układach: 20 i 21, odpowiadających nanorurkom (3,3) o strukturze fotelowej, które zostały wybrane ze względu na najlepsze cechy zobrazowane danymi dokowania w Tabeli 9.1. Układy te zapewniają bliski kontakt wodorów z grup karboksylowych i azotu z cytozyny. Co więcej, w tych dwóch przypadkach koszt energii związany z dotarciem do tych bliskich kontaktów był najniższy w porównaniu z innymi przypadkami. Tak więc w układzie nr. 20 skupiono się na nanorurce z funkcjonalną ścianą boczną, podczas gdy w układzie 21 wzięto pod uwagę nanorurkę sfunkcjonalizowaną na końcach. Układ 21, jak pokazano na Rys. 9.3B, reprezentuje wprost najlepszą możliwą konfiguracją grup

karboksylowych w triadzie cytozyn. Z kolei układ 20 reprezentuje z grubsza podobny dostęp grupy karboksylowej do triady cytozyny jak inne układy, ale wybrano go ze względu na małe rozmiary nanorurki i taką samą chiralność jak w układzie 21.

Te dwa układy poddano dodatkowym obliczeniom dynamiki molekularnej z nieznacznie zmodyfikowanymi warunkami brzegowymi. Dupleksu DNA nie traktowano już jako bryłę sztywną, ale każdy atom był utrzymywany blisko swojego początkowego położenia dzięki przyłożeniu zewnętrznych sił sprężystych przy użyciu potencjału harmonicznego o stałej siłowej $0,01 \text{ eV } \text{Å}^{-2}$. Zastosowanie tego potencjału pozwala na pewien ruch i relaksację atomów, ale zapewnia utrzymanie nienaruszonego dupleksu DNA podczas interakcji z CNT. W celu zachowania odległości między grupami COOH nanorurki a cytozynami zastosowano dodatkowy potencjał harmoniczny między atomami H-N. Symulacje przeprowadzono przy liniowo malejącej temperaturze od 310 do 10 K, aby uzyskać rozluźnienie struktury, z geometriami zbliżonymi do stanów podstawowych. Uzyskane struktury zostały następnie wykorzystane do przygotowania plików wyjściowych do obliczeń metodami chemii kwantowej.

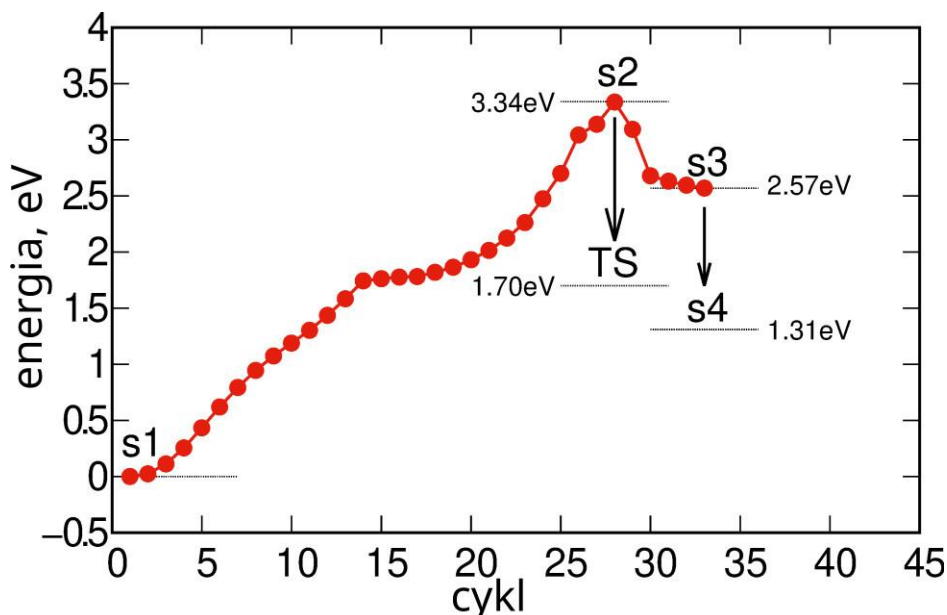
9.2.2. Kwantowo-chemiczna analiza reakcji przenoszenia protonów

Układy w Tabeli 9.1. różnią się głównie chiralnością CNT. Parametr ten ma wpływ na właściwości chemiczne CNT, co objawia się głównie wartością przerwy energetycznej pasma wzbronionego i może wpływać na reaktywność nanorurek. Nanorurki o małej średnicy są bardziej reaktywne niż szersze, zatem wykonując obliczenia kwantowe dla układów z wąskimi nanorurkami (3,3) uzyskamy układy o potencjalnie najwyższej reaktywności spośród zestawionych w tabeli 9.1.

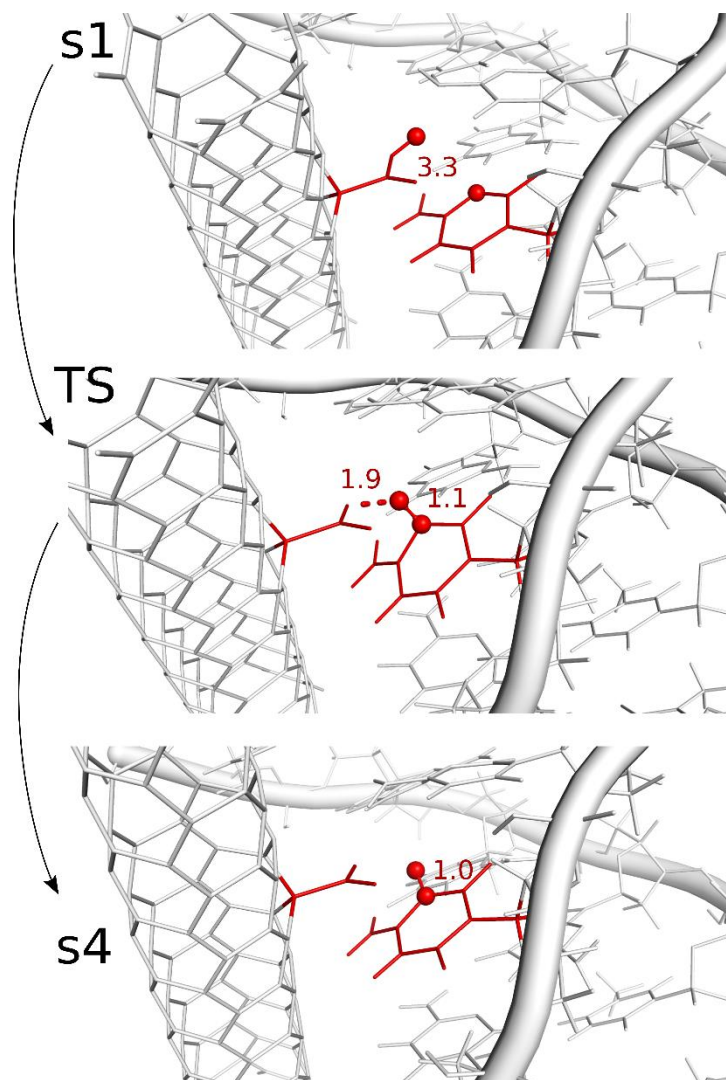
Ponieważ rozważane układy są zbyt duże do obliczeń metodami chemii kwantowej, należało wybrać tylko najważniejsze ich części czyli dyskutowane już wcześniej centra aktywne. Zatem do obliczeń wzięto tylko 14 reszduów z dupleksu odpowiadających 14 segmentom fosforanowo-cukrowym, z których 7 było bogatych w C, podczas gdy pozostałe 7 było komplementarnymi fragmentami bogatymi w G. CNTs zostały również skrócone do 60 najbliższych atomów węgla, w przypadku układu 21 z sfunkcjonalizowaną końcówką i do 100 najbliższych atomów węgla, w przypadku układu 20 z funkcyjnymi ścianami bocznymi. Z układów usunięto wodę i jony, a wszystkie przerwane wiązania w DNA i CNT zostały nasycone atomami wodoru. Brak cząsteczek wody, w postaci modelu jawnego, w układzie można postrzegać jako zbyt daleko idące uproszczenie, jednakże zamiarem badań było sprawdzenie, czy możliwy jest

bezpośredni transfer protonu z karboksylowanej nanorurki do cytozyny. Protonowanie cytozyn w kwaśnym pH jest dobrze znanym faktem doświadczalnym, dlatego możliwe jest również, że grupy karboksylowe częściowo dysocjują i służą jako źródło protonów, które pośrednio protonują cytozyny w iM. Zatem bezpośredni transfer protonów jest kolejną ścieżką i wyjaśnia specyficzną rolę CNTs w stabilizacji iM. Z drugiej strony, jawne uwzględnienie cząsteczek wody jest technicznie niemożliwe z punktu widzenia czasu obliczeń.

W przeprowadzonych badaniach rozważono najpierw reakcję przeniesienia protonu dla CNT z sfunkcjonalizowaną ścianą boczną (3,3), tj. układ numer 20. Zasadnicze wyniki dotyczące mechanizmu reakcji podsumowano na Rys. 9.4, natomiast Rys. 9.5. przedstawia konfigurację najważniejszych stanów układu w trakcie reakcji. W układzie nr 20 rozważany jest transport jednego protonu. Jest to zatem koncepcyjnie dość jasny proces, którego kolejne etapy są przedstawione jako stany s1-s4 na Rys. 9.4. Stan s1 jest stanem początkowym, uzyskanym w wyniku optymalizacji geometrii, wykorzystując jako stan wyjściowy stan, pobrany bezpośrednio z obliczeń MD. Jego graficzną reprezentację pokazano na Rys. 9.5. Warto wspomnieć, że stan s1 nie różni się zbytnio od jego początkowej konfiguracji, będącej stanem z końca obliczeń MD; wartość pierwiastka ze średniego kwadratowego odchylenia (RMSD) między nimi wyniosła 0,39 Å.



Rys. 9.4. Wykres EGO dla reakcji przeniesienia protonu w przypadku nanorurki (3,3) z funkcjonalną ścianą boczną. Znaczenie stanów s1-s4 i TS wyjaśniono w tekście. ($1 \text{ eV} = 96,5 \text{ kJ mol}^{-1} = 39 \text{ kT}$ w temperaturze pokojowej).



Rys. 9.5. Konfiguracje najważniejszych stanów układu nr. 20, tj. nanorurka z sfunkcjonalizowaną ścianą boczną, podczas reakcji przeniesienia protonu. Kolorem czerwonym zaznaczono fragmenty układu, bezpośrednio biorące udział w reakcji, kule czerwone reprezentują parę wodór-azot, pomiędzy którymi zachodzi reakcja, a liczby oznaczają odległości między nimi wyrażone w angstromach.

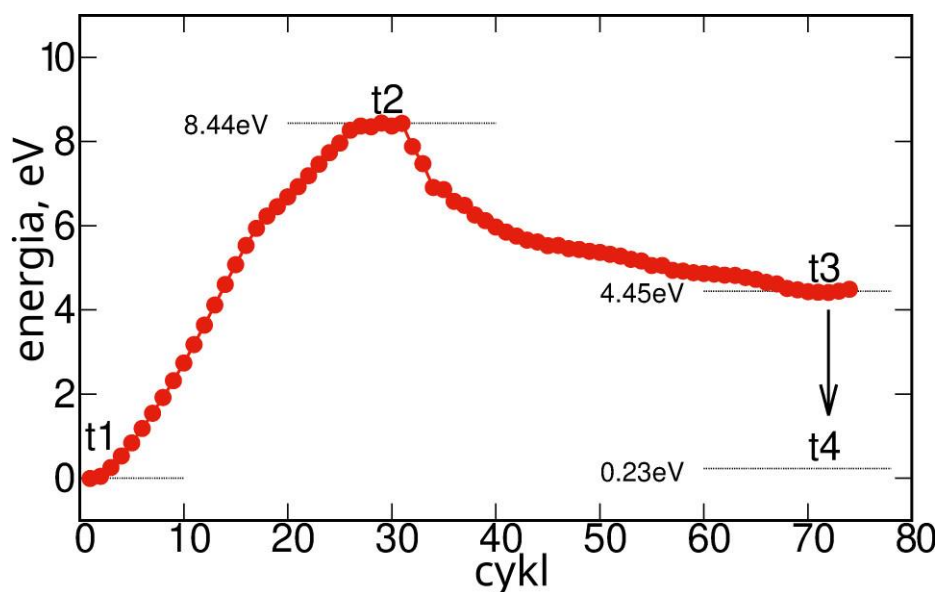
Obliczenia EGO rozpoczęto od stanu s1 i w kolejnych cyklach optymalizacji z siłą zewnętrzną 0,075 au układ ewoluował do stanu s2. Jak widać na wykresie EGO, stan s2 jest stanem maksymalnej energii odpowiadającej znacznemu przemieszczeniu wodoru z początkowej pozycji, ale nadal dość daleko od produktu reakcji, czyli protonowanego azotu w pierścieniu cytozyny. Kontynuacja przebiegu EGO doprowadziła ostatecznie do pierwszego minimum energii (s3), które jest bardzo bliskie pożądanemu produktowi reakcji przeniesienia protonu.

Oba stany na wykresie EGO, odpowiadające maksimum energii (s2) i minimum energii (s3), reprezentują struktury naprężone, spowodowane obecnością sił zewnętrznych. Stanowią bardzo dobry punkt wyjścia do poszukiwania stanu

prześciowego i geometrii końcowego produktu przeniesienia protonów. W kolejnym kroku należy je ponownie zoptymalizować bez przykładania sił zewnętrznych. Zatem ponowna optymalizacja stanu s3 doprowadziła do końcowego produktu przeniesienia protonów s4, natomiast ponowna optymalizacja s2 doprowadziła do uzyskania geometrii stanu przejściowego TS dla reakcji s1 → s4.

Strukturę stanu s4 pokazano na Rys. 9.5. W związku z tym uzyskano stabilną protonowaną cytozynę z odległością między N i H równą 1,0 Å w cząsteczce DNA i zdeprotonowaną grupę karboksylową w nanorurce węglowej. Jak widać na Rys. 9.4, stany s1 i s4 (substrat i produkt) oddziela bariera o energii 1,31 eV (126 kJ mol⁻¹), a to oznacza, że reakcja jest endotermiczna i wymaga dostarczenia znacznej ilości energii.

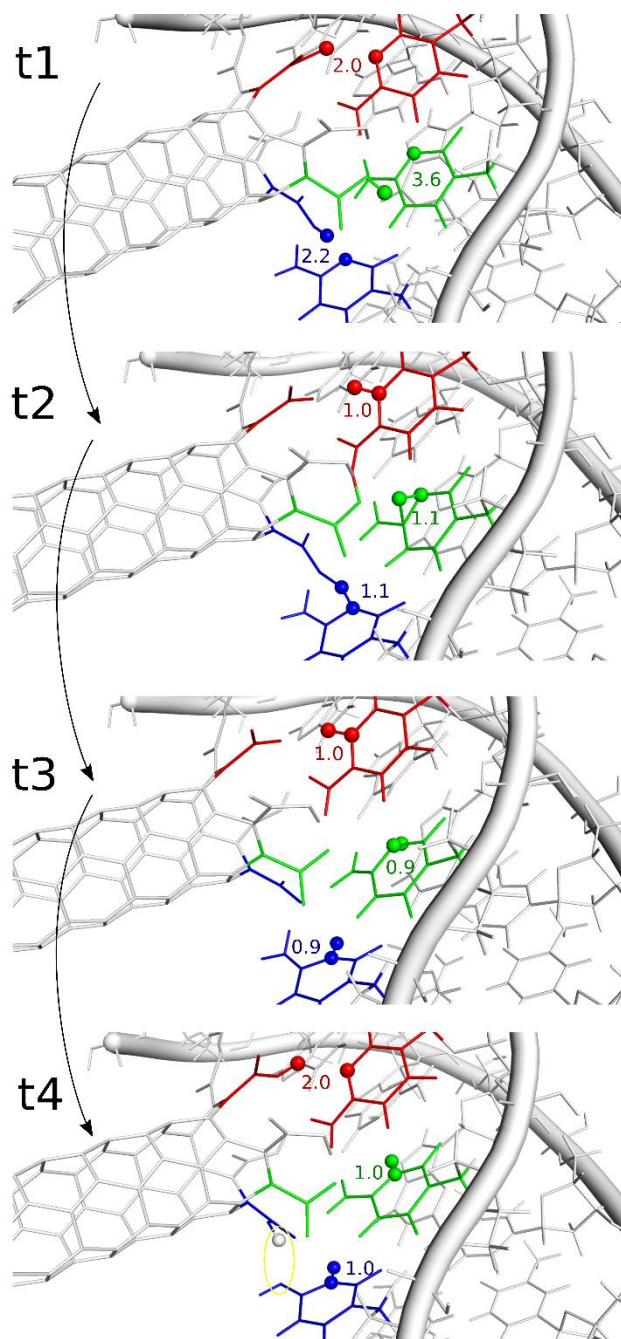
Na Rys. 9.5. pokazano również strukturę stanu przejściowego TS. Energia TS w stosunku do s1 wynosi 1,70 eV (162 kJ mol⁻¹). Oznacza to, że jest bardzo mało prawdopodobne, aby ta reakcja mogła zachodzić w warunkach normalnych. Tunelowanie kwantowo-chemiczne (Castro i Karney 2020), które jest dodatkową ścieżką reakcji dla lekkich atomów, takich jak proton, wydaje się również nie działać co jest prawdopodobnie związane z dużą odległością (3,3 Å w stanie s1), jaką miałby przebyć proton.



Rys. 9.6. Wykresy EGO dla trzech reakcji przeniesienia protonu w przypadku nanorurek z sfunkcjonalizowaną końcówką (3,3). Znaczenie stanów t1, t2, t3 i t4 wyjaśniono w tekście (1 eV = 96,5 kJ mol⁻¹ = 39 kT w temperaturze pokojowej).

W drugim układzie (nr. 21) obliczenia kwantowo-chemiczne miały odpowiedzieć na pytanie, czy możliwe jest jednoczesne przeniesienie trzech protonów z trzech grup karboksylowych, zlokalizowanych na końcówce nanorurki do odpowiadających im

trzech cytozyn. W tym przypadku mamy więc do czynienia z problemem trzech równoległych reakcji, które w zasadzie mogą być przynajmniej częściowo sprzężone. Do modelowania tego procesu wykorzystano również metodę EGO z siłami zewnętrznymi, przyłożonymi jednocześnie do trzech wodorów karboksylowych. Otrzymane wyniki podsumowano na Rys. 9.6. i Rys. 9.7.



Rys. 9.7. Konfiguracje najważniejszych stanów układu nr. 21, tj. z nanorurką z sfunkcjonalizowaną końcówką, podczas reakcji przeniesienia protonu. Kolor czerwony, zielony i niebieski wyróżniają fragmenty układu, które bezpośrednio biorą udział w reakcji; różne kolory służą do rozróżnienia poszczególnych par wodorów-azot (kulki), a liczby oznaczają odległości między nimi w angstrmach. Żółta pętla pokazuje obszar, w którym nastąpiła reprotonacja grup karboksylowych.

Podobnie jak poprzednio, strukturą startową był stan, uzyskany z klasycznych symulacji MD, który następnie poddano standardowej optymalizacji geometrii. Otrzymana struktura t1, pokazana na Rys. 9.7, różni się tylko nieznacznie od początkowego stanu MD (RMSD między nimi wynosi 0,5 Å) i jest punktem wyjścia do obliczeń EGO. Wyniki obliczeń EGO przedstawiono na Rys. 9.6. Podczas wymuszonego transferu wodorów w kierunku azotu uzyskano maksimum energii w cyklu 33, a punkt ten odpowiada strukturze t2 pokazanej na Rys. 9.7. Tuż po tym punkcie energia monotonicznie spada do minimum t3 w cyklu 72. W tym momencie możemy zobaczyć trzy protonowane cytozyny w odległości N-H około 1,0 Å i trzy zjonizowane reszty karboksylowe, co jest oczekiwanym produktem reakcji na Rys. 9.7. Jak omówiono w podrozdziale 9.1.4., ta naprężona struktura t3 powinna być następnie rozluźniona, tj. ponownie zoptymalizowana z wyłączonymi siłami zewnętrznymi, aby uzyskać lokalne minimum energii na PES, odpowiadające końcowej stabilnej strukturze. Po tym etapie uzyskano końcowy stan t4 pokazany na Rys. 9.7.

Na Rys. 9.7. widać, że stan t3 nie przetrwał po usunięciu sił zewnętrznych, a jego rozluźniona struktura t4 nie jest już pożądanym produktem przeniesienia protonów. Czerwona para H-N na Rys. 9.7. uległa rozkładowi, a atom wodoru powrócił do swojej grupy karboksylowej w odległości 2,0 Å między nimi. Co więcej, niebieska para H-N zachowała swoje wiązanie z cytozyną, ale jeden wodór z sąsiedniej grupy aminowej, połączony z pierścieniem cytozyny, odłączył się i ponownie sprotonował grupę karboksylową (szara kulka w żółtej pętli na Rys. 9.7.). Zatem końcowy stan t4 dla niebieskich atomów nadal reprezentuje nieprotonowaną cytozynę z tautomerycznym przegrupowaniem atomów wodoru. Dlatego jednoczesne przeniesienie trzech protonów do trzech pierścieni cytozyny nie powiodło się. Stało się tak głównie z powodu atomu wodoru z czerwonej pary H-N, który powrócił do swojej macierzystej grupy karboksylowej. Pozostałe dwa wodory (niebieski i zielony) zostały pomyślnie przeniesione, ale stan końcowy t4 nie reprezentuje oczekiwanej triady protonowanych cytozyn. Z tego powodu stan t4 nie może spontanicznie zwinąć się w i-motif, ponieważ nie może on wytworzyć niezbędnych wiązań wodorowych (do wygenerowania trzech par Hoogsteena).

Ogólny wniosek dotyczący reakcji przeniesienia protonu z nanorurki z funkcjonalizowaną końcówką do triad cytozyny jest następujący: ta reakcja nie może zachodzić spontanicznie w normalnych warunkach.

9.3. Podsumowanie wyników

Karboksylowane jednościenne nanorurki węglowe są w stanie selektywnie indukować i stabilizować ludzki telomeryczny i-motif (Li i in. 2006). Ponadto hamują aktywność telomerazy, co może wiązać się z selektywną stabilizacją i-motifu, a następnie indukują tworzenie G-quadrupleksów również przy pH obojętnym (Chen i in. 2012). Badania opisane w niniejszej pracy koncentrowały się na jednym z możliwych mechanizmów tego zjawiska, jakim jest bezpośredni transfer protonów z grup karboksylowych do triad cytozyn, w obrębie telomerowego fragmentu dsDNA.

Podsumowując należy stwierdzić, że bezpośrednia reakcja przeniesienia protonu czy to z nanorurki z sfunkcjonalizowaną ścianą boczną, czy z nanorurki z sfunkcjonalizowaną końcówką jest bardzo mało prawdopodobne. Pozornie łatwy dostęp grup karboksylowych do kieszeni cytozynowej, stwierdzony w symulacjach dynamiki molekularnej, nie zapewnia bezpośredniego protonowania cytozyn. Obecność wody wydaje się być konieczna albo jako nośnik protonów, albo jako katalizator, który umożliwia przenoszenie protonów w roztworze wodnym. Rolą karboksylowanych nanorurek węglowych jest prawdopodobnie bycie źródłem protonów, które za pomocą katalitycznego działania wody pośrednio protonują cytozyny. Niestety uwzględnienie cząsteczek wody w postaci modelu jawnego w obliczeniach QM dla tego typu układów jest niemożliwe i nie można potwierdzić tej hipotezy obliczeniowo. Z drugiej strony proces ten zachodzi, ponieważ był obserwowany eksperymentalnie, a badania zaprezentowane w powyższym rozdziale dostarczają dowodów na to, że mechanizm bezpośredniego przenoszenia protonów jest w tym przypadku raczej mało prawdopodobny.

10. Podsumowanie

Przedstawiona praca skupia się na badaniach teoretycznych, opartych na symulacjach metodą dynamiki molekularnej oraz częściowo na obliczeniach kwantowo-chemicznych, układów złożonych z fragmentów DNA, zawierających niekanoniczne formy w postaci struktur i-motifu i G-quadrupleksu oraz jednościennych nanorurek węglowych. Obliczenia MD zostały oparte na modelu all-atom i jawnej obecności rozpuszczalnika. W przeprowadzonych badaniach zastosowano klasyczne pole siłowe Amber, a do opisu nanorurek węglowych zastosowano reaktywny potencjał AIREBO, który jest najbardziej realistycznym polem siłowym dla materiałów węglowych. Zastosowanie metod dynamiki molekularnej pozwoliło na obserwowanie zjawisk, które dla tego typu układów są trudno mierzalne eksperymentalnie. Najważniejsze wyniki streszczono poniżej.

1. Wyznaczenie prac niezbędnych do rozwinięcia badanych struktur niekanonicznych DNA oraz pierwsza analiza ich wzajemnego wpływu na siebie pozwoliło stwierdzić, że struktura Gq jest strukturą wysoce stabilną, niezależnie od użytego podczas badań pH oraz obecności iM. Z kolei na stabilność komplementarnej struktury iM duży wpływ mają nie tylko wartości pH, ale także obecność struktury Gq. W pH kwaśnym praca potrzebna do rozwinięcia struktury iM jest porównywalna z pracą zmierzoną podczas rozwijania Gq, z kolei w pH neutralnym praca ta jest znacznie mniejsza, ale nadal niezerowa. Oznacza to, że iM w tych warunkach mimo niewielkiej stabilności, nadal nie rozwija się spontanicznie, dzięki obecności komplementarnego Gq. Dodatkowo stwierdzono, że na efekt ten większy wpływ ma nieuporządkowana, częściowo rozwinięta struktura Gq niż jego nienaruszona forma (rozdział 6).
2. Analiza interakcji krótkiego fragmentu DNA w postaci iM z nanorurkami węglowymi pozwoliła odkryć, że zarówno protonowana jak i nieprotonowana forma iM adsorbuje się na powierzchni CNT. Adsorpcja ta nie jest jednak w żadnym stopniu specyficzna i iM swobodnie porusza się po powierzchni nanorurki, przy czym w większości badanych układów iM układał się w stosunku do powierzchni CNT orientacją dolną. Adsorpcja jak i średnica czy funkcjonalizacja końcówek CNT nie wpłynęły w żadnym stopniu na protonowaną formę iM. Z kolei podczas badań adsorpcji nieprotonowanego iM na powierzchni

CNT stwierdzono, że wąskie nanorurki szybciej i w większym stopniu przyczyniają się do degradacji struktury iM niż szersze CNT. Nie zaobserwowano stabilizacji struktury przestrzennej iM w wyniku interakcji z nanorurką (rozdział 7)

3. Zaproponowano dedykowaną procedurę obliczeniową, umożliwiającą efektywne próbkowanie przestrzeni konfiguracyjnej dwóch złożonych ciał, tj. nanorurki i fragmentu DNA, zawierającego struktury iM i Gq przy jednoczesnym braku destrukcyjnego wpływu tej metody na delikatne struktury wewnętrzne tych form DNA. Stosując powyższą metodę odkryto, że obecność guaninowych grup funkcyjnych CNT sprzyja konfiguracjom z końcówkami nanorurek blisko struktur Gq i iM, co może zostać w przyszłości wykorzystane do dostarczania substancji aktywnych w te obszary DNA. Dodatkowo w badaniach nie stwierdzono stabilizującego wpływu CNT na strukturę iM, stanowiącego element większej struktury DNA, tj. iG w obojętnym pH, będącego efektem fizycznego oddziaływania między tymi dwoma strukturami (rozdział 8)
4. Na podstawie dostępnych informacji literaturowych, sugerujących możliwość stabilizacji struktury iM w pH obojętnym w wyniku interakcji z nanorurkami sfunkcjonalizowanymi grupami karboksylowanymi, przebadano możliwość bezpośredniego transferu protonów z grup funkcyjnych CNT do triad cytozyn, w obrębie telomerowego fragmentu DNA. Wykonane badania pozwoliły stwierdzić, że bezpośrednia reakcja przeniesienia protonu czy to z nanorurki z sfunkcjonalizowaną ścianą boczną, czy z nanorurki z sfunkcjonalizowaną końcówką jest bardzo mało prawdopodobne. Wspomniana w literaturze rola karboksylowanych nanorurek węglowych w stabilizacji iM jest prawdopodobnie związana ze źródłem protonów, które za pomocą katalitycznego działania wody pośrednio protonują cytozyny (rozdział 9).

Otrzymane wyniki mają duże znaczenie w poszerzeniu wiedzy o właściwościach niekanonicznych form DNA oraz ich interakcji z nanorurkami węglowymi. Potencjowanie wiedzy ta może przynieść korzyści dla rozwoju dyscypliny badawczej dotyczącej badań fundamentalnych, projektowania, a nawet wdrażania do badań *in vitro/in vivo* układów nośników leków antynowotworowych.

Bibliografia

- Abdelhamid, Mahmoud As, László Fábíán, Colin J. MacDonald, Myles R. Cheesman, Andrew J. Gates, i Zoë Ae Waller. 2018. „Redox-Dependent Control of i-Motif DNA Structure Using Copper Cations”. *Nucleic Acids Research* 46(12):5886–93. doi: 10.1093/nar/gky390.
- Abiri, Ardavan, Marc Lavigne, Masoud Rezaei, Sanaz Nikzad, Peyman Zare, Jean-Louis Mergny, i Hamid-Reza Rahimi. 2021. „Unlocking G-Quadruplexes as Antiviral Targets”. *Pharmacological Reviews* 73(3):897–923. doi:10.1124/pharmrev.120.000230.
- Abou Assi, Hala, Miguel Garavís, Carlos González, i Masad J. Damha. 2018. „i-Motif DNA: structural features and significance to cell biology”. *Nucleic Acids Research* 46(16):8038–56. doi: 10.1093/nar/gky735.
- Ahamed, Ashiq, Lili Liang, Ming Yang Lee, Johan Bobacka, i Grzegorz Lisak. 2021. „Too Small to Matter? Physicochemical Transformation and Toxicity of Engineered NTiO₂, NSiO₂, NZnO, Carbon Nanotubes, and NAg”. *Journal of Hazardous Materials* 404:124107. doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.124107.
- Alba, Joan Josep, Anna Sadurní, i Raimundo Gargallo. 2016. „Nucleic Acid I-Motif Structures in Analytical Chemistry”. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 46(5):443–54. doi: 10.1080/10408347.2016.1143347.
- Allison, Lizabeth A. 2009. *Podstawy biologii molekularnej*. 1. wyd. Warszawa: Wydawnictwo Uniwersytetu Warszawskiego.
- Anantha, N. V., M. Azam, i R. D. Sheardy. 1998. „Porphyrin Binding to Quadrupled T4G4”. *Biochemistry* 37(9):2709–14. doi: 10.1021/bi973009v.
- Andersen, Hans C. 1983. „Rattle: A “Velocity” Version of the Shake Algorithm for Molecular Dynamics Calculations”. *Journal of Computational Physics* 52(1):24–34. doi: 10.1016/0021-9991(83)90014-1.
- Anzar, Nigar, Rahil Hasan, Manshi Tyagi, Neelam Yadav, i Jagriti Narang. 2020. „Carbon Nanotube - A Review on Synthesis, Properties and Plethora of Applications in the Field of Biomedical Science”. *Sensors International* 1:100003. doi: 10.1016/j.sintl.2020.100003.
- Asamitsu, Sefan, Toshikazu Bando, i Hiroshi Sugiyama. 2019. „Ligand Design to Acquire Specificity to Intended G-Quadruplex Structures”. *Chemistry (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)* 25(2):417–30. doi: 10.1002/chem.201802691.
- Asamitsu, Sefan, Shunsuke Obata, Zutao Yu, Toshikazu Bando, i Hiroshi Sugiyama. 2019. „Recent Progress of Targeted G-Quadruplex-Preferred Ligands Toward Cancer Therapy”. *Molecules (Basel, Switzerland)* 24(3):E429. doi: 10.3390/molecules24030429.
- Azqhandi, Mohammad Hossein Ahmadi, Bahman Vasheghani Farahani, i Nasibe Dehghani. 2017. „Encapsulation of Methotrexate and Cyclophosphamide in Interpolymer Complexes Formed between Poly Acrylic Acid and Poly Ethylene Glycol on Multi-Walled Carbon Nanotubes as Drug Delivery Systems”. *Materials Science &*

- Engineering. C, *Materials for Biological Applications* 79:841–47. doi: 10.1016/j.msec.2017.05.089.
- Baker, Jon, Krzysztof Wolinski, Massimo Malagoli, Don Kinghorn, Pawel Wolinski, Gábor Magyarfalvi, Svein Saebo, Tomasz Janowski, i Peter Pulay. 2009. „Quantum Chemistry in Parallel with PQS”. *Journal of Computational Chemistry* 30(2):317–35. doi: 10.1002/jcc.21052.
- Balasubramanian, Shankar, Laurence H. Hurley, i Stephen Neidle. 2011. „Targeting G-Quadruplexes in Gene Promoters: A Novel Anticancer Strategy?” *Nature Reviews. Drug Discovery* 10(4):261–75. doi: 10.1038/nrd3428.
- Barczak, Wojciech, i Błażej Rubiś. 2012. „Długość telomerów jako marker prognostyczny w raku piersi i raku płuca.” *NOWOTWORY Journal of Oncology* 62(5):376–84.
- Basu-Dutt, Sharmistha, Marilyn L. Minus, Rahul Jain, Dhriti Nepal, i Satish Kumar. 2012. „Chemistry of Carbon Nanotubes for Everyone”. *Journal of Chemical Education* 89(2):221–29. doi: 10.1021/ed1005163.
- Bates, Paula J., Damian A. Laber, Donald M. Miller, Shelia D. Thomas, i John O. Trent. 2009. „Discovery and Development of the G-Rich Oligonucleotide AS1411 as a Novel Treatment for Cancer”. *Experimental and Molecular Pathology* 86(3):151–64. doi:10.1016/j.yexmp.2009.01.004.
- Benabou, S., A. Aviñó, R. Eritja, C. González, i R. Gargallo. 2014. „Fundamental Aspects of the Nucleic Acid I-Motif Structures”. *RSC Advances* 4(51):26956–80. doi:10.1039/C4RA02129K.
- Besch, Robert, Carine Giovannangeli, i Klaus Degitz. 2004. „Triplex-Forming Oligonucleotides - Sequence-Specific DNA Ligands as Tools for Gene Inhibition and for Modulation of DNA-Associated Functions”. *Current Drug Targets* 5(8):691–703. doi: 10.2174/1389450043345100.
- Bhavsar-Jog, Yogini P., Eric Van Dornshuld, Tracy A. Brooks, Gregory S. Tschumper, i Randy M. Wadkins. 2014. „Epigenetic Modification, Dehydration, and Molecular Crowding Effects on the Thermodynamics of i-Motif Structure Formation from C-Rich DNA”. *Biochemistry* 53(10):1586–94. doi: 10.1021/bi401523b.
- Blasco, Maria A. 2007. „Telomere Length, Stem Cells and Aging”. *Nature Chemical Biology* 3(10):640–49. doi: 10.1038/nchembio.2007.38.
- Boubeta, Fernando Martín, Rocío María Contestín García, Ezequiel Norberto Lorenzo, Leonardo Boechi, Dario Estrin, Mariela Sued, i Mehrnoosh Arrar. 2019. „Lessons Learned about Steered Molecular Dynamics Simulations and Free Energy Calculations”. *Chemical Biology & Drug Design* 93(6):1129–38. doi: 10.1111/cbdd.13485.
- Brenner, Donald W., Olga A. Shenderova, Judith A. Harrison, Steven J. Stuart, Boris Ni, i Susan B. Sinnott. 2002. „A Second-Generation Reactive Empirical Bond Order (REBO) Potential Energy Expression for Hydrocarbons”. *Journal of Physics: Condensed Matter* 14(4):783–802. doi: 10.1088/0953-8984/14/4/312.
- Brooks, B. R., C. L. Brooks, A. D. Mackerell, L. Nilsson, W. Yang, i D. M. York. 2009. „CHARMM: The Biomolecular Simulation Program”. *Journal of Computational Chemistry* 30(10):1545–1614. doi: 10.1002/jcc.21287.
- Brown, Robert V., Ting Wang, Venkateshwar Reddy Chappeta, Guanhui Wu, Buket Onel, Reena Chawla, Hector Quijada, Sara M. Camp, Eddie T. Chiang, Quinea R. Lassiter,

- Carmen Lee, Shivani Phanse, Megan A. Turnidge, Ping Zhao, Joe G. N. Garcia, Vijay Gokhale, Danzhou Yang, i Laurence H. Hurley. 2017. „The Consequences of Overlapping G-Quadruplexes and i-Motifs in the Platelet-Derived Growth Factor Receptor β Core Promoter Nuclease Hypersensitive Element Can Explain the Unexpected Effects of Mutations and Provide Opportunities for Selective Targeting of Both Structures by Small Molecules To Downregulate Gene Expression”. *Journal of the American Chemical Society* 139(22):7456–75. doi: 10.1021/jacs.6b10028.
- Brzyska, Agnieszka, i Krzysztof Woliński. 2020. „Driving Proton Transfer Reactions in the 2-Methylfuran Ring with External Forces”. *New Journal of Chemistry* 44(21):8784–95. doi: 10.1039/D0NJ00508H.
- Bukowiecka-Matusiak, M., i L. A. Wozniak. 2006. „Struktura DNA od A do Z - biologiczne implikacje różnorodności strukturalnej DNA”. *Postępy Biochemii* 52(3):229–38.
- Burger, Angelika M., Fangping Dai, Christoph M. Schultes, Anthony P. Reszka, Michael J. Moore, John A. Double, i Stephen Neidle. 2005. „The G-Quadruplex-Interactive Molecule BRACO-19 Inhibits Tumor Growth, Consistent with Telomere Targeting and Interference with Telomerase Function”. *Cancer Research* 65(4):1489–96. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-2910.
- Case, David A., Thomas E. Cheatham, Tom Darden, Holger Gohlke, Ray Luo, Kenneth M. Merz, Alexey Onufriev, Carlos Simmerling, Bing Wang, i Robert J. Woods. 2005. „The Amber Biomolecular Simulation Programs”. *Journal of Computational Chemistry* 26(16):1668–88. doi: 10.1002/jcc.20290.
- Castro, Claire, i William L. Karney. 2020. „Heavy-Atom Tunneling in Organic Reactions”. *Angewandte Chemie* 132(22):8431–42. doi: 10.1002/ange.201914943.
- Celtikci, Basak, Gulnihal Kulaksiz Erkmén, i Zeliha Gunnur Dikmen. 2021. „Regulation and Effect of Telomerase and Telomeric Length in Stem Cells”. *Current Stem Cell Research & Therapy* 16(7):809–23. doi: 10.2174/1574888X15666200422104423.
- Chen, Chi-Hau, i Ruey-Jien Chen. 2011. „Prevalence of Telomerase Activity in Human Cancer”. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan Yi Zhi* 110(5):275–89. doi: 10.1016/S0929-6646(11)60043-0.
- Chen, Frederic Y. H., Soyoung Park, Haruka Otomo, Sohei Sakashita, i Hiroshi Sugiyama. 2014. „Investigation of B-Z Transitions with DNA Oligonucleotides Containing 8-Methylguanine”. *Artificial DNA, PNA & XNA* 5(1):e28226. doi: 10.4161/adna.28226.
- Chen, Ming, Shuang Zhou, Yi Zhu, Yingzhu Sun, Guangming Zeng, Chunping Yang, Piao Xu, Ming Yan, Zhifeng Liu, i Wei Zhang. 2018. „Toxicity of Carbon Nanomaterials to Plants, Animals and Microbes: Recent Progress from 2015-Present”. *Chemosphere* 206:255–64. doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.05.020.
- Chen, Yong, Konggang Qu, Chuanqi Zhao, Li Wu, Jinsong Ren, Jiasi Wang, i Xiaogang Qu. 2012. „Insights into the Biomedical Effects of Carboxylated Single-Wall Carbon Nanotubes on Telomerase and Telomeres”. *Nature Communications* 3:1074. doi: 10.1038/ncomms2091.
- Chen, Yu-Shuan, i Ging-Ho Hsiue. 2013. „Directing Neural Differentiation of Mesenchymal Stem Cells by Carboxylated Multiwalled Carbon Nanotubes”. *Biomaterials* 34(21):4936–44. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.03.063.

- Cheung, William, Francesco Pontoriero, Oleh Taratula, Alex M. Chen, i Huixin He. 2010. „DNA and Carbon Nanotubes as Medicine”. *Advanced Drug Delivery Reviews* 62(6):633–49. doi: 10.1016/j.addr.2010.03.007.
- Choi, Gyeongrak, Jong Won Lee, Ju Young Cha, Young-Ju Kim, Yeon-Sun Choi, Mark J. Schulz, Chang Kwon Moon, Kwon Tack Lim, Sung Yong Kim, i Inpil Kang. 2016. „A Spray-On Carbon Nanotube Artificial Neuron Strain Sensor for Composite Structural Health Monitoring”. *Sensors (Basel, Switzerland)* 16(8):E1171. doi: 10.3390/s16081171.
- Choi, Jungkweon, Sooyeon Kim, Takashi Tachikawa, Mamoru Fujitsuka, i Tetsuro Majima. 2011. „PH-Induced Intramolecular Folding Dynamics of i-Motif DNA”. *Journal of the American Chemical Society* 133(40):16146–53. doi: 10.1021/ja2061984.
- Choi, Jungkweon, i Tetsuro Majima. 2011. „Conformational Changes of Non-B DNA”. *Chemical Society Reviews* 40(12):5893–5909. doi: 10.1039/c1cs15153c.
- Chou, Shan-Ho, Ko-Hsin Chin, i Andrew H. J. Wang. 2003. „Unusual DNA Duplex and Hairpin Motifs”. *Nucleic Acids Research* 31(10):2461–74. doi: 10.1093/nar/gkg367.
- Christen, Markus, Philippe H. Hünenberger, Dirk Bakowies, Riccardo Baron, Roland Bürgi, Daan P. Geerke, Tim N. Heinz, Mika A. Kastenholtz, Vincent Kräutler, Chris Oostenbrink, Christine Peter, Daniel Trzesniak, i Wilfred F. van Gunsteren. 2005. „The GROMOS Software for Biomolecular Simulation: GROMOS05”. *Journal of Computational Chemistry* 26(16):1719–51. doi: 10.1002/jcc.20303.
- Conde, João, Nuria Oliva, Mariana Atilano, Hyun Seok Song, i Natalie Artzi. 2016. „Self-Assembled RNA-Triple-Helix Hydrogel Scaffold for MicroRNA Modulation in the Tumour Microenvironment”. *Nature Materials* 15(3):353–63. doi: 10.1038/nmat4497.
- Costa, Pedro M., Maxime Bourgoignon, Julie T. W. Wang, i Khuloud T. Al-Jamal. 2016. „Functionalised Carbon Nanotubes: From Intracellular Uptake and Cell-Related Toxicity to Systemic Brain Delivery”. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 241:200–219. doi: 10.1016/j.jconrel.2016.09.033.
- Cui, Jingjing, Phillip Waltman, Vu H. Le, i Edwin A. Lewis. 2013. „The Effect of Molecular Crowding on the Stability of Human C-MYC Promoter Sequence I-Motif at Neutral PH”. *Molecules (Basel, Switzerland)* 18(10):12751–67. doi: 10.3390/molecules181012751.
- Dai, Jixun, Megan Carver, Chandanamali Punchihewa, Roger A. Jones, i Danzhou Yang. 2007. „Structure of the Hybrid-2 Type Intramolecular Human Telomeric G-Quadruplex in K⁺ Solution: Insights into Structure Polymorphism of the Human Telomeric Sequence”. *Nucleic Acids Research* 35(15):4927–40. doi: 10.1093/nar/gkm522.
- Datta, H. J., P. P. Chan, K. M. Vasquez, R. C. Gupta, i P. M. Glazer. 2001. „Triplex-Induced Recombination in Human Cell-Free Extracts. Dependence on XPA and HsRad51”. *The Journal of Biological Chemistry* 276(21):18018–23. doi: 10.1074/jbc.M011646200.
- Day, Henry A., Camille Huguin, i Zoë A. E. Waller. 2013. „Silver Cations Fold I-Motif at Neutral PH”. *Chemical Communications (Cambridge, England)* 49(70):7696–98. doi: 10.1039/c3cc43495h.
- Day, Henry A., Pavlos Pavlou, i Zoë A. E. Waller. 2014. „I-Motif DNA: Structure, Stability and Targeting with Ligands”. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 22(16):4407–18. doi: 10.1016/j.bmc.2014.05.047.

- De Cian, Anne, Elsa Delemos, Jean-Louis Mergny, Marie-Paule Teulade-Fichou, i David Monchaud. 2007. „Highly Efficient G-Quadruplex Recognition by Bisquinolinium Compounds”. *Journal of the American Chemical Society* 129(7):1856–57. doi: 10.1021/ja067352b.
- De Vivo, Marco, Matteo Masetti, Giovanni Bottegoni, i Andrea Cavalli. 2016. „Role of Molecular Dynamics and Related Methods in Drug Discovery”. *Journal of Medicinal Chemistry* 59(9):4035–61. doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b01684.
- Debnath, Manish, Shirsendu Ghosh, Ajay Chauhan, Rakesh Paul, Kankan Bhattacharyya, i Jyotirmayee Dash. 2017. „Preferential Targeting of I-Motifs and G-Quadruplexes by Small Molecules”. *Chemical Science* 8(11):7448–56. doi: 10.1039/c7sc02693e.
- Delorme, Michael P., Yukihiro Muro, Toshihiro Arai, Deborah A. Banas, Steven R. Frame, Kenneth L. Reed, i David B. Warheit. 2012. „Ninety-Day Inhalation Toxicity Study with a Vapor Grown Carbon Nanofiber in Rats”. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology* 128(2):449–60. doi: 10.1093/toxsci/kfs172.
- Deng, Xiaoyong, Fei Wu, Zhen Liu, i Man Luo. 2009. „The Splenic Toxicity of Water Soluble Multi-Walled Carbon Nanotubes in Mice”. *Carbon* 47(6):1421–28. doi: 10.1016/j.carbon.2008.12.032.
- Deo, Randhir Prakash, Joseph Wang, Ines Block, Ashok Mulchandani, Kanchan A. Joshi, Marek Trojanowicz, Fritz Scholz, Wilfred Chen, i Yuehe Lin. 2005. „Determination of Organophosphate Pesticides at a Carbon Nanotube/Organophosphorus Hydrolase Electrochemical Biosensor”. *Analytica Chimica Acta* 530(2):185–89. doi: 10.1016/j.aca.2004.09.072.
- Dexheimer, Thomas S., Daekyu Sun, i Laurence H. Hurley. 2006. „Deconvoluting the Structural and Drug-Recognition Complexity of the G-Quadruplex-Forming Region Upstream of the Bcl-2 P1 Promoter”. *Journal of the American Chemical Society* 128(16):5404–15. doi: 10.1021/ja0563861.
- Dong, Yuanchen, Zhongqiang Yang, i Dongsheng Liu. 2014. „DNA Nanotechnology Based on i-Motif Structures”. *Accounts of Chemical Research* 47(6):1853–60. doi: 10.1021/ar500073a.
- Du, Jia, Shutao Wang, Hong You, i Xuesong Zhao. 2013. „Understanding the Toxicity of Carbon Nanotubes in the Environment Is Crucial to the Control of Nanomaterials in Producing and Processing and the Assessment of Health Risk for Human: A Review”. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 36(2):451–62. doi: 10.1016/j.etap.2013.05.007.
- Dupradeau, François-Yves, Adrien Pigache, Thomas Zaffran, Corentin Savineau, Rodolphe Lelong, Nicolas Grivel, Dimitri Lelong, Wilfried Rosanski, i Piotr Cieplak. 2010. „The R.E.D. Tools: Advances in RESP and ESP Charge Derivation and Force Field Library Building”. *Physical Chemistry Chemical Physics: PCCP* 12(28):7821–39. doi: 10.1039/c0cp00111b.
- Dutta, Debasish, Manish Debnath, Diana Müller, Rakesh Paul, Tania Das, Irene Bessi, Harald Schwalbe, i Jyotirmayee Dash. 2018. „Cell Penetrating Thiazole Peptides Inhibit C-MYC Expression via Site-Specific Targeting of c-MYC G-Quadruplex”. *Nucleic Acids Research* 46(11):5355–65. doi: 10.1093/nar/gky385.

- Dzatko, Simon, Michaela Krafcikova, Robert Hänsel-Hertsch, Tomas Fessler, Radovan Fiala, Tomas Loja, Daniel Krafcik, Jean-Louis Mergny, Silvie Foldynova-Trantirkova, i Lukas Trantirek. 2018. „Evaluation of the Stability of DNA I-Motifs in the Nuclei of Living Mammalian Cells”. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* 57(8):2165–69. doi: 10.1002/anie.201712284.
- Eatemadi, Ali, Hadis Daraee, Hamzeh Karimkhanloo, Mohammad Kouhi, Nosratollah Zarghami, Abolfazl Akbarzadeh, Mozghan Abasi, Younes Hanifehpour, i Sang Woo Joo. 2014. „Carbon Nanotubes: Properties, Synthesis, Purification, and Medical Applications”. *Nanoscale Research Letters* 9(1):393. doi: 10.1186/1556-276X-9-393.
- Fedoroff, O. Y., A. Rangan, V. V. Chemeris, i L. H. Hurley. 2000. „Cationic Porphyrins Promote the Formation of I-Motif DNA and Bind Peripherally by a Nonintercalative Mechanism”. *Biochemistry* 39(49):15083–90. doi: 10.1021/bi001528j.
- Felsenfeld, G., David R. Davies, i Alexander Rich. 1957. „FORMATION OF A THREE-STRANDED POLYNUCLEOTIDE MOLECULE”. *Journal of the American Chemical Society* 79(8):2023–24. doi: 10.1021/ja01565a074.
- Fiorin, Giacomo, Michael L. Klein, i Jérôme Hénin. 2013. „Using collective variables to drive molecular dynamics simulations”. *Molecular Physics* 111(22–23):3345–62. doi: 10.1080/00268976.2013.813594.
- Fleming, Aaron M., Yun Ding, R. Aaron Rogers, Judy Zhu, Julia Zhu, Ashlee D. Burton, Connor B. Carlisle, i Cynthia J. Burrows. 2017. „4n-1 Is a «Sweet Spot» in DNA i-Motif Folding of 2'-Deoxycytidine Homopolymers”. *Journal of the American Chemical Society* 139(13):4682–89. doi: 10.1021/jacs.6b10117.
- Foo, Mu Ee, i Subash C. B. Gopinath. 2017. „Feasibility of Graphene in Biomedical Applications”. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* 94:354–61. doi: 10.1016/j.biopha.2017.07.122.
- Franci, Michelle M., William J. Pietro, Warren J. Hehre, i J. Stephen Binkley. 1982. „Self-consistent molecular orbital methods. XXIII. A polarization-type basis set for second-row elements”. *The Journal of Chemical Physics* 77(7):3654–65. doi: 10.1063/1.444267.
- Frank-Kamenetskii, M. D., i S. M. Mirkin. 1995. „Triplex DNA Structures”. *Annual Review of Biochemistry* 64:65–95. doi: 10.1146/annurev.bi.64.070195.000433.
- Fujisawa, Kazunori, Hee Jou Kim, Su Hyeon Go, Hiroyuki Muramatsu, Takuya Hayashi, Morinobu Endo, Thomas Ch Hirschmann, Mildred S. Dresselhaus, Yoong Ahm Kim, i Paulo T. Araujo. 2016. „A Review of Double-Walled and Triple-Walled Carbon Nanotube Synthesis and Applications”. *Applied Sciences* 6(4):109. doi: 10.3390/app6040109.
- Galindo-Murillo, Rodrigo, James C. Robertson, Marie Zgarbová, Jiří Šponer, Michal Otyepka, Petr Jurečka, i Thomas E. Cheatham. 2016. „Assessing the Current State of Amber Force Field Modifications for DNA”. *Journal of Chemical Theory and Computation* 12(8):4114–27. doi: 10.1021/acs.jctc.6b00186.
- Gao, Ru-Ru, Shuo Shi, Ying Zhu, Hai-Liang Huang, i Tian-Ming Yao. 2016. „A RET-Supported Logic Gate Combinatorial Library to Enable Modeling and Implementation of Intelligent Logic Functions”. *Chemical Science* 7(3):1853–61. doi: 10.1039/C5SC03570H.

- Garabedian, Alyssa, David Butcher, Jennifer L. Lippens, Jaroslava Miksovska, Prem P. Chapagain, Daniele Fabris, Mark E. Ridgeway, Melvin A. Park, i Francisco Fernandez-Lima. 2016. „Structures of the Kinetically Trapped I-Motif DNA Intermediates”. *Physical Chemistry Chemical Physics: PCCP* 18(38):26691–702. doi: 10.1039/c6cp04418b.
- Garg, A., H. D. Chalak, M. O. Belarbi, A. M. Zenkour, i R. Sahoo. 2021. „Estimation of Carbon Nanotubes and Their Applications as Reinforcing Composite Materials—An Engineering Review”. *Composite Structures* 272:114234. doi: 10.1016/j.compstruct.2021.114234.
- Gatto, B., M. Palumbo, i C. Sissi. 2009. „Nucleic Acid Aptamers Based on the G-Quadruplex Structure: Therapeutic and Diagnostic Potential”. *Current Medicinal Chemistry* 16(10):1248–65. doi: 10.2174/092986709787846640.
- Gavathiotis, Evripidis, i Mark S. Searle. 2003. „Structure of the Parallel-Stranded DNA Quadruplex d(TTAGGGT)₄ Containing the Human Telomeric Repeat: Evidence for A-Tetrad Formation from NMR and Molecular Dynamics Simulations”. *Organic & Biomolecular Chemistry* 1(10):1650–56. doi: 10.1039/b300845m.
- Ge, Cuicui, Fang Lao, Wei Li, Yufeng Li, Chunying Chen, Yang Qiu, Xueying Mao, Bai Li, Zhifang Chai, i Yuliang Zhao. 2008. „Quantitative Analysis of Metal Impurities in Carbon Nanotubes: Efficacy of Different Pretreatment Protocols for ICPMS Spectroscopy”. *Analytical Chemistry* 80(24):9426–34. doi: 10.1021/ac801469b.
- Gehring, K., J. L. Leroy, i M. Guéron. 1993. „A Tetrameric DNA Structure with Protonated Cytosine.Cytosine Base Pairs”. *Nature* 363(6429):561–65. doi: 10.1038/363561a0.
- Gellert, M., M. N. Lipsett, i D. R. Davies. 1962. „Helix Formation by Guanylic Acid”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 48:2013–18. doi: 10.1073/pnas.48.12.2013.
- Ghasemi, Amir, Hamed Amiri, Hossein Zare, Maryam Masroor, Akbar Hasanzadeh, Ali Beyzavi, Amir R. Aref, Mahdi Karimi, i Michael R. Hamblin. 2017. „Carbon Nanotubes in Microfluidic Lab-on-a-Chip Technology: Current Trends and Future Perspectives”. *Microfluidics and Nanofluidics* 21(9):151. doi: 10.1007/s10404-017-1989-1.
- Gholamine, Babak, Isaac Karimi, Amir Salimi, Parisa Mazdarani, i Lora A. Becker. 2017. „Neurobehavioral Toxicity of Carbon Nanotubes in Mice”. *Toxicology and Industrial Health* 33(4):340–50. doi: 10.1177/0748233716644381.
- Ghosh, A., i M. Bansal. 2003. „A Glossary of DNA Structures from A to Z”. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 59(4):620–26. doi: 10.1107/S0907444903003251.
- Gregory Gatto Jeremy M. Berg, Lubert Stryer. 2019. *Biochemistry*. 9th ed. 2019 edition. New York: MACMILLAN.
- Guerrini, Luca, i Ramon A. Alvarez-Puebla. 2021. „Structural Recognition of Triple-Stranded DNA by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy”. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)* 11(2). doi: 10.3390/nano11020326.
- Guo, Qing, Xian-Tao Shen, Yuan-Yuan Li, i Shun-Qing Xu. 2017. „Carbon Nanotubes-Based Drug Delivery to Cancer and Brain”. *Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical Sciences = Hua Zhong Ke Ji Da Xue Xue Bao. Yi Xue Ying De Wen Ban = Huazhong Keji Daxue Xuebao. Yixue Yingdewen Ban* 37(5):635–41. doi: 10.1007/s11596-017-1783-z.

- Han, Sung Gu, Rodney Andrews, i C. Gary Gairola. 2010. „Acute Pulmonary Response of Mice to Multi-Wall Carbon Nanotubes”. *Inhalation Toxicology* 22(4):340–47. doi: 10.3109/08958370903359984.
- Han, Xusi, Woong-Hee Shin, Charles W. Christoffer, i Genki Terashi. 2019. „Study of the Variability of the Native Protein Structure”. S. 606–19 w *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology*, zredagowane przez K. Nakai i C. Schönbach. Oxford: Academic Press.
- Harsha, P. J., Nagarani Thotakura, Manish Kumar, Saurabh Sharma, Anupama Mittal, Rajneet Kaur Khurana, Bhupinder Singh, Poonam Negi, i Kaiser Raza. 2019. „A Novel PEGylated Carbon Nanotube Conjugated Mangiferin: An Explorative Nanomedicine for Brain Cancer Cells”. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 53:101186. doi: 10.1016/j.jddst.2019.101186.
- He, Hua, Lien Ai Pham-Huy, Pierre Dramou, Deli Xiao, Pengli Zuo, i Chuong Pham-Huy. 2013. „Carbon Nanotubes: Applications in Pharmacy and Medicine”. *BioMed Research International* 2013:578290. doi: 10.1155/2013/578290.
- Helfenstein, Maria, Michele Miragoli, Stephan Rohr, Loretta Müller, Peter Wick, Martin Mohr, Peter Gehr, i Barbara Rothen-Rutishauser. 2008. „Effects of Combustion-Derived Ultrafine Particles and Manufactured Nanoparticles on Heart Cells in Vitro”. *Toxicology* 253(1–3):70–78. doi: 10.1016/j.tox.2008.08.018.
- Heller, Daniel A., Esther S. Jeng, Tsun-Kwan Yeung, Brittany M. Martinez, Anthonie E. Moll, Joseph B. Gastala, i Michael S. Strano. 2006. „Optical Detection of DNA Conformational Polymorphism on Single-Walled Carbon Nanotubes”. *Science (New York, N.Y.)* 311(5760):508–11. doi: 10.1126/science.1120792.
- Hirashima, Kyotaro, i Hiroyuki Seimiya. 2015. „Telomeric Repeat-Containing RNA/G-Quadruplex-Forming Sequences Cause Genome-Wide Alteration of Gene Expression in Human Cancer Cells in Vivo”. *Nucleic Acids Research* 43(4):2022–32. doi: 10.1093/nar/gkv063.
- Hospital, Adam, Josep Ramon Goñi, Modesto Orozco, i Josep L. Gelpí. 2015. „Molecular Dynamics Simulations: Advances and Applications”. *Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry: AABC* 8:37–47. doi: 10.2147/AABC.S70333.
- Hosseinpour, Mina, Vahid Azimirad, Maryam Alimohammadi, Parviz Shahabi, Mina Sadighi, i Ghazaleh Ghamkhari Nejad. 2016. „The Cardiac Effects of Carbon Nanotubes in Rat”. *BioImpacts: BI* 6(2):79–84. doi: 10.15171/bi.2016.11.
- Hu, Yuwei, Alessandro Ceconello, Andrea Idili, Francesco Ricci, i Itamar Willner. 2017. „Triplex DNA Nanostructures: From Basic Properties to Applications”. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* 56(48):15210–33. doi: 10.1002/anie.201701868.
- Hudecki, Andrzej, Dorota Łyko-Morawska, Wirginia Likus, Magdalena Skonieczna, Jarosław Markowski, Renata Wilk, Aleksandra Kolano-Burian, Wojciech Maziarz, Jolanta Adamska, i Marek J. Łos. 2019. „Composite Nanofibers Containing Multiwall Carbon Nanotubes as Biodegradable Membranes in Reconstructive Medicine”. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)* 9(1):E63. doi: 10.3390/nano9010063.
- Huppert, Julian L., i Shankar Balasubramanian. 2007. „G-Quadruplexes in Promoters throughout the Human Genome”. *Nucleic Acids Research* 35(2):406–13. doi: 10.1093/nar/gkl1057.

- Hurley, Laurence H. 2002. „DNA and Its Associated Processes as Targets for Cancer Therapy”. *Nature Reviews. Cancer* 2(3):188–200. doi: 10.1038/nrc749.
- Ivani, Ivan, Pablo D. Dans, Agnes Noy, Alberto Pérez, Sarah A. Harris, David A. Case, i Modesto Orozco. 2016. „Parmbc1: A Refined Force Field for DNA Simulations”. *Nature Methods* 13(1):55–58. doi: 10.1038/nmeth.3658.
- Jagusiak, Anna, Katarzyna Chlopas, Grzegorz Zemanek, Pawel Wolski, i Tomasz Panczyk. 2020. „Controlled Release of Doxorubicin from the Drug Delivery Formulation Composed of Single-Walled Carbon Nanotubes and Congo Red: A Molecular Dynamics Study and Dynamic Light Scattering Analysis”. *Pharmaceutics* 12(7):E622. doi: 10.3390/pharmaceutics12070622.
- Jain, Aklank, Guliang Wang, i Karen M. Vasquez. 2008. „DNA Triple Helices: Biological Consequences and Therapeutic Potential”. *Biochimie* 90(8):1117–30. doi: 10.1016/j.biochi.2008.02.011.
- Jang, Min-Hee, i Yu Sik Hwang. 2018. „Effects of Functionalized Multi-Walled Carbon Nanotubes on Toxicity and Bioaccumulation of Lead in *Daphnia Magna*”. *PloS One* 13(3):e0194935. doi: 10.1371/journal.pone.0194935.
- Jarzynski, C. 1997. „Nonequilibrium Equality for Free Energy Differences”. *Physical Review Letters* 78(14):2690–93. doi: 10.1103/PhysRevLett.78.2690.
- Jeyamohan, Prashanti, Takashi Hasumura, Yutaka Nagaoka, Yasuhiko Yoshida, Toru Maekawa, i D. Sakthi Kumar. 2013. „Accelerated killing of cancer cells using a multifunctional single-walled carbon nanotube-based system for targeted drug delivery in combination with photothermal therapy”. *International Journal of Nanomedicine* 8:2653–67. doi: 10.2147/IJN.S46054.
- Jissy, A. K., i Ayan Datta. 2014. „Design and Applications of Noncanonical DNA Base Pairs”. *The Journal of Physical Chemistry Letters* 5(1):154–66. doi: 10.1021/jz402352d.
- Joachimi, Astrid, Armin Benz, i Jörg S. Hartig. 2009. „A Comparison of DNA and RNA Quadruplex Structures and Stabilities”. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17(19):6811–15. doi: 10.1016/j.bmc.2009.08.043.
- Johnson, Robert R., Axel Kohlmeyer, A. T. Charlie Johnson, i Michael L. Klein. 2009. „Free Energy Landscape of a DNA-Carbon Nanotube Hybrid Using Replica Exchange Molecular Dynamics”. *Nano Letters* 9(2):537–41. doi: 10.1021/nl802645d.
- Joshi, Pratik, Rupesh Mishra, i Roger J. Narayan. 2021. „Biosensing Applications of Carbon-Based Materials”. *Current Opinion in Biomedical Engineering* 18:100274. doi: 10.1016/j.cobme.2021.100274.
- Karimi, Ali, Mohammad Erfan, Seyed Alireza Mortazavi, Fatemeh Ghorbani-Bidkorbeh, Farzad Kobarfard, i Farshad H. Shirazi. 2019. „Functionalisation of Carbon Nanotubes by Methotrexate and Study of Synchronous Photothermal Effect of Carbon Nanotube and Anticancer Drug on Cancer Cell Death”. *IET Nanobiotechnology* 13(1):52–57. doi: 10.1049/iet-nbt.2018.5085.
- Karimi, Mahdi, Sajad Bahrami, Hamed Mirshekari, Seyed Masoud Moosavi Basri, Amirala Bakhshian Nik, Amir R. Aref, Mohsen Akbari, i Michael R. Hamblin. 2016. „Microfluidic Systems for Stem Cell-Based Neural Tissue Engineering”. *Lab on a Chip* 16(14):2551–71. doi: 10.1039/c6lc00489j.

- Karplus, Martin, i J. Andrew McCammon. 2002. „Molecular Dynamics Simulations of Biomolecules”. *Nature Structural Biology* 9(9):646–52. doi: 10.1038/nsb0902-646.
- Kästner, Johannes. 2011. „Umbrella Sampling”. *WIREs Computational Molecular Science* 1(6):932–42. doi: 10.1002/wcms.66.
- Kavosi, Arghavan, Saeideh Hosseini Ghale Noei, Samaneh Madani, Solmaz Khalighfard, Saeed Khodayari, Hamid Khodayari, Malihe Mirzaei, Mohammad Reza Kalhori, Majid Yavarian, Ali Mohammad Alizadeh, i Mojtaba Falahati. 2018. „The Toxicity and Therapeutic Effects of Single-and Multi-Wall Carbon Nanotubes on Mice Breast Cancer”. *Scientific Reports* 8(1):8375. doi: 10.1038/s41598-018-26790-x.
- Kendrick, Samantha, Hyun-Jin Kang, Mohammad P. Alam, Manikandadas M. Madathil, Prashansa Agrawal, Vijay Gokhale, Danzhou Yang, Sidney M. Hecht, i Laurence H. Hurley. 2014. „The Dynamic Character of the BCL2 Promoter I-Motif Provides a Mechanism for Modulation of Gene Expression by Compounds That Bind Selectively to the Alternative DNA Hairpin Structure”. *Journal of the American Chemical Society* 136(11):4161–71. doi: 10.1021/ja410934b.
- Kim, Byul G., i Tigran V. Chalikian. 2016. „Thermodynamic Linkage Analysis of PH-Induced Folding and Unfolding Transitions of i-Motifs”. *Biophysical Chemistry* 216:19–22. doi: 10.1016/j.bpc.2016.06.001.
- Kim, Mu-Yong, Hariprasad Vankayalapati, Kazuo Shin-Ya, Konstanty Wierzba, i Laurence H. Hurley. 2002. „Telomestatin, a Potent Telomerase Inhibitor That Interacts Quite Specifically with the Human Telomeric Intramolecular g-Quadruplex”. *Journal of the American Chemical Society* 124(10):2098–99. doi: 10.1021/ja017308q.
- Krishnan-Ghosh, Yamuna, Elaine Stephens, i Shankar Balasubramanian. 2005. „PNA Forms an I-Motif”. *Chemical Communications (Cambridge, England)* (42):5278–80. doi: 10.1039/b510405j.
- Kudlicki, Andrzej S. 2016. „G-Quadruplexes Involving Both Strands of Genomic DNA Are Highly Abundant and Colocalize with Functional Sites in the Human Genome”. *PloS One* 11(1):e0146174. doi: 10.1371/journal.pone.0146174.
- Kumar, Sandeep, Monika Nehra, Deepak Kedia, Neeraj Dilbaghi, K. Tankeshwar, i Ki-Hyun Kim. 2018. „Carbon Nanotubes: A Potential Material for Energy Conversion and Storage”. *Progress in Energy and Combustion Science* 64:219–53. doi: 10.1016/j.pecs.2017.10.005.
- Lane, Andrew N., J. Brad Chaires, Robert D. Gray, i John O. Trent. 2008. „Stability and Kinetics of G-Quadruplex Structures”. *Nucleic Acids Research* 36(17):5482–5515. doi: 10.1093/nar/gkn517.
- Lannes, Laurie, Saheli Halder, Yamuna Krishnan, i Harald Schwalbe. 2015. „Tuning the PH Response of I-Motif DNA Oligonucleotides”. *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology* 16(11):1647–56. doi: 10.1002/cbic.201500182.
- Lee, Ae-Ree, Na-Hyun Kim, Yeo-Jin Seo, Seo-Ree Choi, i Joon-Hwa Lee. 2018. „Thermodynamic Model for B-Z Transition of DNA Induced by Z-DNA Binding Proteins”. *Molecules (Basel, Switzerland)* 23(11). doi: 10.3390/molecules23112748.
- Lee, Jeongwoo, Myunghun Kim, Chang Kook Hong, i Sang Eun Shim. 2007. „Measurement of the Dispersion Stability of Pristine and Surface-Modified Multiwalled Carbon

- Nanotubes in Various Nonpolar and Polar Solvents". *Measurement Science and Technology* 18(12):3707–12. doi: 10.1088/0957-0233/18/12/005.
- Li, Haipeng, Xiwen Sun, Yuanjun Li, Baoe Li, Chunyong Liang, i Hongshui Wang. 2019. „Preparation and Properties of Carbon Nanotube (Fe)/Hydroxyapatite Composite as Magnetic Targeted Drug Delivery Carrier". *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications* 97:222–29. doi: 10.1016/j.msec.2018.11.042.
- Li, Tao, Damian Ackermann, Anna M. Hall, i Michael Famulok. 2012. „Input-Dependent Induction of Oligonucleotide Structural Motifs for Performing Molecular Logic". *Journal of the American Chemical Society* 134(7):3508–16. doi: 10.1021/ja2108883.
- Li, Xi, Yinghua Peng, Jinsong Ren, i Xiaogang Qu. 2006. „Carboxyl-Modified Single-Walled Carbon Nanotubes Selectively Induce Human Telomeric i-Motif Formation". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(52):19658–63. doi: 10.1073/pnas.0607245103.
- Liang, Geyu, Lihong Yin, i Juan Zhang. 2010. „Effects of Subchronic Exposure to Multi-Walled Carbon Nanotubes on Mice". *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 73(7):463–70. doi: 10.1080/15287390903523378.
- Liao, Susan, Guofu Xu, Wei Wang, Fumio Watari, Fuzhai Cui, Seeram Ramakrishna, i Casey K. Chan. 2007. „Self-Assembly of Nano-Hydroxyapatite on Multi-Walled Carbon Nanotubes". *Acta Biomaterialia* 3(5):669–75. doi: 10.1016/j.actbio.2007.03.007.
- Liu, Dongsheng, i Shankar Balasubramanian. 2003. „A Proton-Fuelled DNA Nanomachine". *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* 42(46):5734–36. doi: 10.1002/anie.200352402.
- Liu, Shufang, Jindong Chen, Ke Zhang, Shurong Wu, Rutao Liu, i Xibao Gao. 2014. „Cytotoxicity of carboxyl carbon nanotubes on human embryonic lung fibroblast cells and its mechanism". *Journal of Experimental Nanoscience* 9(2):210–20. doi: 10.1080/17458080.2012.674217.
- Liu, Ying, Yuliang Zhao, Baoyun Sun, i Chunying Chen. 2013. „Understanding the Toxicity of Carbon Nanotubes". *Accounts of Chemical Research* 46(3):702–13. doi: 10.1021/ar300028m.
- Lu, Quinn, John M. Teare, Howard Granok, Marci J. Swede, Jenny Xu, i Sarah C. R. Elgin. 2003. „The Capacity to Form H-DNA Cannot Substitute for GAGA Factor Binding to a (CT)N*(GA)_n Regulatory Site". *Nucleic Acids Research* 31(10):2483–94. doi: 10.1093/nar/gkg369.
- Lu, Weisi, Yi Zhang, Dan Liu, Zhou Songyang, i Ma Wan. 2013. „Telomeres-Structure, Function, and Regulation". *Experimental Cell Research* 319(2):133–41. doi: 10.1016/j.yexcr.2012.09.005.
- Ma, Dik-Lung, Maria Hiu-Tung Kwan, Daniel Shiu-Hin Chan, Paul Lee, Hui Yang, Victor Pui-Yan Ma, Li-Ping Bai, Zhi-Hong Jiang, i Chung-Hang Leung. 2011. „Crystal Violet as a Fluorescent Switch-on Probe for i-Motif: Label-Free DNA-Based Logic Gate". *The Analyst* 136(13):2692–96. doi: 10.1039/c1an15091j.
- Madannejad, Rasoul, Nahid Shoaie, Fatemeh Jahanpeyma, Mohammad Hasan Darvishi, Mostafa Azimzadeh, i Hamidreza Javadi. 2019. „Toxicity of Carbon-Based Nanomaterials: Reviewing Recent Reports in Medical and Biological Systems". *Chemico-Biological Interactions* 307:206–22. doi: 10.1016/j.cbi.2019.04.036.

- Maizels, Nancy. 2015. „G4-Associated Human Diseases”. *EMBO Reports* 16(8):910–22. doi: 10.15252/embr.201540607.
- Makarov, Vladimir L., Yoko Hirose, i John P. Langmore. 1997. „Long G Tails at Both Ends of Human Chromosomes Suggest a C Strand Degradation Mechanism for Telomere Shortening”. *Cell* 88(5):657–66. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81908-X.
- Malliavin, T. E., J. Gau, K. Snoussi, i J. L. Leroy. 2003. „Stability of the I-Motif Structure Is Related to the Interactions between Phosphodiester Backbones”. *Biophysical Journal* 84(6):3838–47. doi: 10.1016/S0006-3495(03)75111-X.
- Marx, J. L. 1985. „Z-DNA: Still Searching for a Function”. *Science (New York, N.Y.)* 230(4727):794–96. doi: 10.1126/science.2997919.
- Matsuda, Yuki, Jamil Tahir-Kheli, i William A. Goddard. 2010. „Definitive Band Gaps for Single-Wall Carbon Nanotubes”. *The Journal of Physical Chemistry Letters* 1(19):2946–50. doi: 10.1021/jz100889u.
- Menezes, Beatriz Rossi Canuto de, Karla Faquine Rodrigues, Beatriz Carvalho da Silva Fonseca, Renata Guimarães Ribas, Thaís Larissa do Amaral Montanheiro, i Gilmar Patrocínio Thim. 2019. „Recent Advances in the Use of Carbon Nanotubes as Smart Biomaterials”. *Journal of Materials Chemistry. B* 7(9):1343–60. doi: 10.1039/c8tb02419g.
- Mergny, J. L., i L. Lacroix. 1998. „Kinetics and Thermodynamics of I-DNA Formation: Phosphodiester versus Modified Oligodeoxynucleotides”. *Nucleic Acids Research* 26(21):4797–4803. doi: 10.1093/nar/26.21.4797.
- Métifiot, Mathieu, Samir Amrane, Simon Litvak, i Marie-Line Andreola. 2014. „G-Quadruplexes in Viruses: Function and Potential Therapeutic Applications”. *Nucleic Acids Research* 42(20):12352–66. doi: 10.1093/nar/gku999.
- Miyoshi, Daisuke, Shizuka Matsumura, Shu-Ichi Nakano, i Naoki Sugimoto. 2004. „Duplex Dissociation of Telomere DNAs Induced by Molecular Crowding”. *Journal of the American Chemical Society* 126(1):165–69. doi: 10.1021/ja036721q.
- Modi, Souvik, Swetha M G, Debanjan Goswami, Gagan D. Gupta, Satyajit Mayor, i Yamuna Krishnan. 2009. „A DNA Nanomachine That Maps Spatial and Temporal PH Changes inside Living Cells”. *Nature Nanotechnology* 4(5):325–30. doi: 10.1038/nnano.2009.83.
- Mohajeri, Mohammad, Behzad Behnam, i Amirhossein Sahebkar. 2018. „Biomedical Applications of Carbon Nanomaterials: Drug and Gene Delivery Potentials”. *Journal of Cellular Physiology* 234(1):298–319. doi: 10.1002/jcp.26899.
- Mohanta, Debashish, Soma Patnaik, Sanchit Sood, i Nilanjan Das. 2019. „Carbon Nanotubes: Evaluation of Toxicity at Biointerfaces”. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 9(5):293–300. doi: 10.1016/j.jpha.2019.04.003.
- Moon, Sung Ung, Jihee Kim, Kiran Kumar Bokara, Jong Youl Kim, Dongwoo Khang, Thomas J. Webster, i Jong Eun Lee. 2012. „Carbon Nanotubes Impregnated with Subventricular Zone Neural Progenitor Cells Promotes Recovery from Stroke”. *International Journal of Nanomedicine* 7:2751–65. doi: 10.2147/IJN.S30273.
- Morgan, Rhianna K., Harshul Batra, Vanessa C. Gaerig, Jennifer Hockings, i Tracy A. Brooks. 2016. „Identification and Characterization of a New G-Quadruplex Forming Region within the KRAS Promoter as a Transcriptional Regulator”. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1859(2):235–45. doi: 10.1016/j.bbagr.2015.11.004.

- Morimoto, Yasuo, Masami Hirohashi, i Norihiro Kobayashi. 2012. „Pulmonary Toxicity of Well-Dispersed Single-Wall Carbon Nanotubes after Inhalation”. *Nanotoxicology* 6(7):766–75. doi: 10.3109/17435390.2011.620719.
- Moser, H. E., i P. B. Dervan. 1987. „Sequence-Specific Cleavage of Double Helical DNA by Triple Helix Formation”. *Science (New York, N.Y.)* 238(4827):645–50. doi: 10.1126/science.3118463.
- Muller, Julie, Ilse Decordier, Peter H. Hoet, Noömi Lombaert, Leen Thomassen, François Huaux, Dominique Lison, i Micheline Kirsch-Volders. 2008. „Clastogenic and Aneugenic Effects of Multi-Wall Carbon Nanotubes in Epithelial Cells”. *Carcinogenesis* 29(2):427–33. doi: 10.1093/carcin/bgm243.
- Murali, Vasanth S., Ruhung Wang, Carole A. Mikoryak, Paul Pantano, i Rockford K. Draper. 2016. „The Impact of Subcellular Location on the near Infrared-Mediated Thermal Ablation of Cells by Targeted Carbon Nanotubes”. *Nanotechnology* 27(42):425102. doi: 10.1088/0957-4484/27/42/425102.
- Murphy, Fiona A., Craig A. Poland, Rodger Duffin, Khuloud T. Al-Jamal, Hanene Ali-Boucetta, Antonio Nunes, Fiona Byrne, Adrielle Prina-Mello, Yuri Volkov, Shouping Li, Stephen J. Mather, Alberto Bianco, Maurizio Prato, William Macnee, William A. Wallace, Kostas Kostarelos, i Ken Donaldson. 2011. „Length-Dependent Retention of Carbon Nanotubes in the Pleural Space of Mice Initiates Sustained Inflammation and Progressive Fibrosis on the Parietal Pleura”. *The American Journal of Pathology* 178(6):2587–2600. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.02.040.
- Murray, Ashley R., Elena R. Kisin, Alexey V. Tkach, Naveena Yanamala, Robert Mercer, Shih-Houng Young, Bengt Fadeel, Valerian E. Kagan, i Anna A. Shvedova. 2012. „Factoring-in Agglomeration of Carbon Nanotubes and Nanofibers for Better Prediction of Their Toxicity versus Asbestos”. *Particle and Fibre Toxicology* 9:10. doi: 10.1186/1743-8977-9-10.
- Nakanishi, Chuya, i Hiroyuki Seimiya. 2020. „G-Quadruplex in Cancer Biology and Drug Discovery”. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 531(1):45–50. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.03.178.
- Narita, Nobuyo, Yasuhiro Kobayashi, Hiroaki Nakamura, Kazuhiro Maeda, Akihiro Ishihara, Toshihide Mizoguchi, Yuki Usui, Kaoru Aoki, Masayuki Simizu, Hiroyuki Kato, Hidehiro Ozawa, Nobuyuki Udagawa, Morinobu Endo, Naoyuki Takahashi, i Naoto Saito. 2009. „Multiwalled Carbon Nanotubes Specifically Inhibit Osteoclast Differentiation and Function”. *Nano Letters* 9(4):1406–13. doi: 10.1021/nl8030746.
- Narwal, Vinay, Ritu Deswal, Bhawna Batra, Vijay Kalra, Ritu Hooda, Minakshi Sharma, i J. S. Rana. 2019. „Cholesterol Biosensors: A Review”. *Steroids* 143:6–17. doi: 10.1016/j.steroids.2018.12.003.
- Neidle, Stephen, red. 1999. *Oxford Handbook of Nucleic Acid Structure*. Illustrated edition. Oxford ; New York: Oxford University Press.
- Ni, Jiangfeng, i Yan Li. 2016. „Carbon Nanomaterials in Different Dimensions for Electrochemical Energy Storage”. *Advanced Energy Materials* 6(17):1600278. doi: 10.1002/aenm.201600278.

- Nikolova, Evgenia N., Eunae Kim, Abigail A. Wise, Patrick J. O'Brien, Ioan Andricioaei, i Hashim M. Al-Hashimi. 2011. „Transient Hoogsteen Base Pairs in Canonical Duplex DNA”. *Nature* 470(7335):498–502. doi: 10.1038/nature09775.
- Oostenbrink, Chris, Alessandra Villa, Alan E. Mark, i Wilfred F. van Gunsteren. 2004. „A Biomolecular Force Field Based on the Free Enthalpy of Hydration and Solvation: The GROMOS Force-Field Parameter Sets 53A5 and 53A6”. *Journal of Computational Chemistry* 25(13):1656–76. doi: 10.1002/jcc.20090.
- Pagano, Bruno, Carlo A. Mattia, Luigi Cavallo, Seiichi Uesugi, Concetta Giancola, i Franca Fraternali. 2008. „Stability and Cations Coordination of DNA and RNA 14-Mer G-Quadruplexes: A Multiscale Computational Approach”. *The Journal of Physical Chemistry. B* 112(38):12115–23. doi: 10.1021/jp804036j.
- Palisoc, Shirley Tiong, Michelle Tiamzon Natividad, Nico De Jesus, i Joshua Carlos. 2018. „Highly Sensitive AgNP/MWCNT/Nafion Modified GCE-Based Sensor for the Determination of Heavy Metals in Organic and Non-Organic Vegetables”. *Scientific Reports* 8(1):17445. doi: 10.1038/s41598-018-35781-x.
- Palumbo, SunMi L., Scot W. Ebbinghaus, i Laurence H. Hurley. 2009. „Formation of a Unique End-to-End Stacked Pair of G-Quadruplexes in the HTERT Core Promoter with Implications for Inhibition of Telomerase by G-Quadruplex-Interactive Ligands”. *Journal of the American Chemical Society* 131(31):10878–91. doi: 10.1021/ja902281d.
- Panczyk, Tomasz, Patrycja Wojton, i Pawel Wolski. 2019. „Mechanism of Unfolding and Relative Stabilities of G-Quadruplex and I-Motif Noncanonical DNA Structures Analyzed in Biased Molecular Dynamics Simulations”. *Biophysical Chemistry* 250:106173. doi: 10.1016/j.bpc.2019.106173.
- Panczyk, Tomasz, Pawel Wolski, i Leszek Lajtar. 2016. „Coadsorption of Doxorubicin and Selected Dyes on Carbon Nanotubes. Theoretical Investigation of Potential Application as a PH-Controlled Drug Delivery System”. *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids* 32(19):4719–28. doi: 10.1021/acs.langmuir.6b00296.
- Park, Sanghyun, i Klaus Schulten. 2004. „Calculating Potentials of Mean Force from Steered Molecular Dynamics Simulations”. *The Journal of Chemical Physics* 120(13):5946–61. doi: 10.1063/1.1651473.
- Patel, Dinshaw J., Anh Tuân Phan, i Vitaly Kuryavyi. 2007. „Human Telomere, Oncogenic Promoter and 5'-UTR G-Quadruplexes: Diverse Higher Order DNA and RNA Targets for Cancer Therapeutics”. *Nucleic Acids Research* 35(22):7429–55. doi: 10.1093/nar/gkm711.
- Patlolla, Anita, Brionna Knighten, i Paul Tchounwou. 2010. „Multi-Walled Carbon Nanotubes Induce Cytotoxicity, Genotoxicity And Apoptosis In Normal Human Dermal Fibroblast Cells”. *Ethnicity & disease* 20(1 Suppl 1):S1-65–72.
- Pendino, F., I. Tarkanyi, C. Dudognon, J. Hillion, M. Lanotte, J. Aradi, i E. Ségal-Bendirdjian. 2006. „Telomeres and Telomerase: Pharmacological Targets for New Anticancer Strategies?” *Current Cancer Drug Targets* 6(2):147–80. doi: 10.2174/156800906776056482.
- Peng, Lian-Mao, Zhiyong Zhang, i Chenguang Qiu. 2019. „Carbon Nanotube Digital Electronics”. *Nature Electronics* 2(11):499–505. doi: 10.1038/s41928-019-0330-2.

- Peng, Yinghua, Xiaohui Wang, Yi Xiao, Lingyan Feng, Chao Zhao, Jinsong Ren, i Xiaogang Qu. 2009. „I-Motif Quadruplex DNA-Based Biosensor for Distinguishing Single- and Multiwalled Carbon Nanotubes”. *Journal of the American Chemical Society* 131(38):13813–18. doi: 10.1021/ja9051763.
- Perrone, Rosalba, Elena Butovskaya, Sara Lago, Alfredo Garzino-Demo, Christophe Pannecouque, Giorgio Palù, i Sara N. Richter. 2016. „The G-Quadruplex-Forming Aptamer AS1411 Potently Inhibits HIV-1 Attachment to the Host Cell”. *International Journal of Antimicrobial Agents* 47(4):311–16. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2016.01.016.
- Phan, Anh Tuân, i Jean-Louis Mergny. 2002. „Human telomeric DNA: G-quadruplex, i-motif and Watson–Crick double helix”. *Nucleic Acids Research* 30(21):4618–25. doi: 10.1093/nar/gkf597.
- Platella, Chiara, Claudia Riccardi, Daniela Montesarchio, Giovanni N. Roviello, i Domenica Musumeci. 2017. „G-Quadruplex-Based Aptamers against Protein Targets in Therapy and Diagnostics”. *Biochimica Et Biophysica Acta. General Subjects* 1861(5 Pt B):1429–47. doi: 10.1016/j.bbagen.2016.11.027.
- Plimpton, Steve. 1995. „Fast Parallel Algorithms for Short-Range Molecular Dynamics”. *Journal of Computational Physics* 117(1):1–19. doi: 10.1006/jcph.1995.1039.
- Popov, Valentin N. 2004. „Carbon Nanotubes: Properties and Application”. *Materials Science and Engineering: R: Reports* 43(3):61–102. doi: 10.1016/j.mser.2003.10.001.
- Prasek, Jan, Jana Drbohlavova, Jana Chomoucka, Jaromir Hubalek, Ondrej Jasek, Vojtech Adam, i Rene Kizek. 2011. „Methods for Carbon Nanotubes Synthesis—Review”. *Journal of Materials Chemistry* 21(40):15872–84. doi: 10.1039/C1JM12254A.
- Pugazhendhi, Arivalagan, Thomas Nesakumar Jebakumar Immanuel Edison, Bharath Kumar Velmurugan, Joe Antony Jacob, i Indira Karuppusamy. 2018. „Toxicity of Doxorubicin (Dox) to Different Experimental Organ Systems”. *Life Sciences* 200:26–30. doi: 10.1016/j.lfs.2018.03.023.
- Punbusayakul, Niramol, Saikat Talapatra, Pulickel M. Ajayan, i Werasak Surareungchai. 2013. „Label-Free as-Grown Double Wall Carbon Nanotubes Bundles for Salmonella Typhimurium Immunoassay”. *Chemistry Central Journal* 7:102. doi: 10.1186/1752-153X-7-102.
- Qu, Guangbo, Yuhong Bai, Yi Zhang, Qing Jia, Weidong Zhang, i Bing Yan. 2009. „The effect of multiwalled carbon nanotube agglomeration on their accumulation in and damage to organs in mice”. *Carbon* 47(8):2060–69. doi: 10.1016/j.carbon.2009.03.056.
- Rajendran, Arivazhagan, Shu-ichi Nakano, i Naoki Sugimoto. 2010. „Molecular Crowding of the Cosolutes Induces an Intramolecular I-Motif Structure of Triplet Repeat DNA Oligomers at Neutral PH”. *Chemical Communications (Cambridge, England)* 46(8):1299–1301. doi: 10.1039/b922050j.
- Ramírez, C. L., M. A. Martí, i A. E. Roitberg. 2016. „Steered Molecular Dynamics Methods Applied to Enzyme Mechanism and Energetics”. *Methods in Enzymology* 578:123–43. doi: 10.1016/bs.mie.2016.05.029.
- Rankin, Sarah, Anthony P. Reszka, Julian Huppert, Mire Zloh, Gary N. Parkinson, Alan K. Todd, Sylvain Ladame, Shankar Balasubramanian, i Stephen Neidle. 2005. „Putative DNA Quadruplex Formation within the Human C-Kit Oncogene”. *Journal of the American Chemical Society* 127(30):10584–89. doi: 10.1021/ja050823u.

- Redondo-Gómez, Carlos, Rocío Leandro-Mora, Daniela Blanch-Bermúdez, Christopher Espinoza-Araya, David Hidalgo-Barrantes, i José Vega-Baudrit. 2020. „Recent Advances in Carbon Nanotubes for Nervous Tissue Regeneration”. *Advances in Polymer Technology* 2020:e6861205. doi: 10.1155/2020/6861205.
- Reyes-Reyes, E. Merit, Francesca R. Šalipur, Mitra Shams, Matthew K. Forsthoefel, i Paula J. Bates. 2015. „Mechanistic Studies of Anticancer Aptamer AS1411 Reveal a Novel Role for Nucleolin in Regulating Rac1 Activation”. *Molecular Oncology* 9(7):1392–1405. doi: 10.1016/j.molonc.2015.03.012.
- Reyes-Reyes, E. Merit, Yun Teng, i Paula J. Bates. 2010. „A New Paradigm for Aptamer Therapeutic AS1411 Action: Uptake by Macropinocytosis and Its Stimulation by a Nucleolin-Dependent Mechanism”. *Cancer Research* 70(21):8617–29. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0920.
- Richmond, Timothy J., i Curt A. Davey. 2003. „The Structure of DNA in the Nucleosome Core”. *Nature* 423(6936):145–50. doi: 10.1038/nature01595.
- Rode, Anuja, Sanjay Sharma, i Dinesh K. Mishra. 2018. „Carbon Nanotubes: Classification, Method of Preparation and Pharmaceutical Application”. *Current Drug Delivery* 15(5):620–29. doi: 10.2174/1567201815666171221124711.
- Rodriguez, Raphaël, Sebastian Müller, Justin A. Yeoman, Chantal Trentesaux, Jean-François Riou, i Shankar Balasubramanian. 2008. „A Novel Small Molecule That Alters Shelterin Integrity and Triggers a DNA-Damage Response at Telomeres”. *Journal of the American Chemical Society* 130(47):15758–59. doi: 10.1021/ja805615w.
- Rohloff, John C., Amy D. Gelinis, Thale C. Jarvis, Urs A. Ochsner, Daniel J. Schneider, Larry Gold, i Nebojsa Janjic. 2014. „Nucleic Acid Ligands With Protein-like Side Chains: Modified Aptamers and Their Use as Diagnostic and Therapeutic Agents”. *Molecular Therapy. Nucleic Acids* 3:e201. doi: 10.1038/mtna.2014.49.
- Romanowska, Julia, Nathalie Reuter, i Joanna Trylska. 2013. „Comparing Aminoglycoside Binding Sites in Bacterial Ribosomal RNA and Aminoglycoside Modifying Enzymes”. *Proteins* 81(1):63–80. doi: 10.1002/prot.24163.
- Rosenberg, Jonathan E., Richard M. Bambury, Eliezer M. Van Allen, Harry A. Drabkin, Primo N. Lara, Andrea L. Harzstark, Nikhil Wagle, Robert A. Figlin, Gregory W. Smith, Levi A. Garraway, Toni Choueiri, Fredrik Erlandsson, i Damian A. Laber. 2014. „A Phase II Trial of AS1411 (a Novel Nucleolin-Targeted DNA Aptamer) in Metastatic Renal Cell Carcinoma”. *Investigational New Drugs* 32(1):178–87. doi: 10.1007/s10637-013-0045-6.
- Roxbury, Daniel, Anand Jagota, i Jeetain Mittal. 2013. „Structural Characteristics of Oligomeric DNA Strands Adsorbed onto Single-Walled Carbon Nanotubes”. *The Journal of Physical Chemistry. B* 117(1):132–40. doi: 10.1021/jp309523a.
- Roxo, Carolina, Weronika Kotkowiak, i Anna Pasternak. 2019. „G-Quadruplex-Forming Aptamers-Characteristics, Applications, and Perspectives”. *Molecules (Basel, Switzerland)* 24(20):E3781. doi: 10.3390/molecules24203781.
- Ruggiero, Emanuela, i Sara N. Richter. 2020. „Viral G-Quadruplexes: New Frontiers in Virus Pathogenesis and Antiviral Therapy”. *Annual Reports in Medicinal Chemistry* 54:101–31. doi: 10.1016/bs.armc.2020.04.001.

- Russo Krauss, Irene, Sneha Ramaswamy, Stephen Neidle, Shozeb Haider, i Gary N. Parkinson. 2016. „Structural Insights into the Quadruplex-Duplex 3' Interface Formed from a Telomeric Repeat: A Potential Molecular Target”. *Journal of the American Chemical Society* 138(4):1226–33. doi: 10.1021/jacs.5b10492.
- Saeednia, Leyla, Li Yao, Kim Cluff, i Ramazan Asmatulu. 2019. „Sustained Releasing of Methotrexate from Injectable and Thermosensitive Chitosan-Carbon Nanotube Hybrid Hydrogels Effectively Controls Tumor Cell Growth”. *ACS Omega* 4(2):4040–48. doi: 10.1021/acsomega.8b03212.
- Saha, Puja, Deepanjan Panda, Diana Müller, Arunabha Maity, Harald Schwalbe, i Jyotirmayee Dash. 2020. „In Situ Formation of Transcriptional Modulators Using Non-Canonical DNA i-Motifs”. *Chemical Science* 11(8):2058–67. doi: 10.1039/d0sc00514b.
- Santos, Tiago, Gilmar F. Salgado, Eurico J. Cabrita, i Carla Cruz. 2021. „G-Quadruplexes and Their Ligands: Biophysical Methods to Unravel G-Quadruplex/Ligand Interactions”. *Pharmaceuticals* 14(8):769. doi: 10.3390/ph14080769.
- Santosh, Mogurampelly, Swati Panigrahi, Dhananjay Bhattacharyya, A. K. Sood, i Prabal K. Maiti. 2012. „Unzipping and Binding of Small Interfering RNA with Single Walled Carbon Nanotube: A Platform for Small Interfering RNA Delivery”. *The Journal of Chemical Physics* 136(6):065106. doi: 10.1063/1.3682780.
- Saranathan, Nandhini, i Perumal Vivekanandan. 2019. „G-Quadruplexes: More Than Just a Kink in Microbial Genomes”. *Trends in Microbiology* 27(2):148–63. doi: 10.1016/j.tim.2018.08.011.
- Sato, Yuta, Kazuhiro Yanagi, Yasumitsu Miyata, Kazu Suenaga, Hiromichi Kataura, i Sumio Iijima. 2008. „Chiral-Angle Distribution for Separated Single-Walled Carbon Nanotubes”. *Nano Letters* 8(10):3151–54. doi: 10.1021/nl801364g.
- Satpathi, Sagar, Konoya Das, i Partha Hazra. 2018. „Silica Nano-Channel Induced i-Motif Formation and Stabilization at Neutral and Alkaline PH”. *Chemical Communications (Cambridge, England)* 54(51):7054–57. doi: 10.1039/c8cc02811g.
- Satpathi, Sagar, Subrahmanyam Sappati, Konoya Das, i Partha Hazra. 2019. „Structural Characteristics Requisite for the Ligand-Based Selective Detection of i-Motif DNA”. *Organic & Biomolecular Chemistry* 17(21):5392–99. doi: 10.1039/c9ob01020c.
- Schroeder, Vera, Suchol Savagatrup, Maggie He, Sibö Lin, i Timothy M. Swager. 2019. „Carbon Nanotube Chemical Sensors”. *Chemical Reviews* 119(1):599–663. doi: 10.1021/acs.chemrev.8b00340.
- Sen, D., i W. Gilbert. 1988. „Formation of Parallel Four-Stranded Complexes by Guanine-Rich Motifs in DNA and Its Implications for Meiosis”. *Nature* 334(6180):364–66. doi: 10.1038/334364a0.
- Shahrokhian, Saeed, Raziieh Salimian, i Hamid Reza Kalhor. 2016. „A Simple Label-Free Electrochemical DNA Biosensor Based on Carbon Nanotube–DNA Interaction”. *RSC Advances* 6(19):15592–98. doi: 10.1039/C5RA20907B.
- Shammas, Masood A. 2011. „Telomeres, Lifestyle, Cancer, and Aging”. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* 14(1):28–34. doi: 10.1097/MCO.0b013e32834121b1.
- Shao, Xiaolong, Weitong Zhang, Mubarak Ishaq Umar, Hei Yuen Wong, Zijing Seng, Yingpeng Xie, Yingchao Zhang, Liang Yang, Chun Kit Kwok, i Xin Deng. 2020. „RNA

- G-Quadruplex Structures Mediate Gene Regulation in Bacteria". *MBio* 11(1):e02926-19. doi: 10.1128/mBio.02926-19.
- Shin-ya, K., K. Wierzba, K. Matsuo, T. Ohtani, Y. Yamada, K. Furihata, Y. Hayakawa, i H. Seto. 2001. „Telomestatin, a Novel Telomerase Inhibitor from *Streptomyces Anulatus*”. *Journal of the American Chemical Society* 123(6):1262–63. doi: 10.1021/ja005780q.
- Shu, Bing, Jiaojiao Cao, Guotao Kuang, Jun Qiu, Meiling Zhang, Yan Zhang, Mingxue Wang, Xiaoya Li, Shuangshuang Kang, Tian-Miao Ou, Jia-Heng Tan, Zhi-Shu Huang, i Ding Li. 2018. „Syntheses and Evaluation of New Acridone Derivatives for Selective Binding of Oncogene C-Myc Promoter i-Motifs in Gene Transcriptional Regulation”. *Chemical Communications (Cambridge, England)* 54(16):2036–39. doi: 10.1039/c8cc00328a.
- Sinden, Richard R. 2012. *DNA Structure and Function*. 1st edition. Academic Press.
- Sindhikara, Daniel, Yilin Meng, i Adrian E. Roitberg. 2008. „Exchange Frequency in Replica Exchange Molecular Dynamics”. *The Journal of Chemical Physics* 128(2):024103. doi: 10.1063/1.2816560.
- Singh, Nandita, Jinhu Chen, Krzysztof K. Koziol, Keith R. Hallam, Dawid Janas, Avinash J. Patil, Ally Strachan, Jonathan G Hanley, i Sameer S. Rahatekar. 2016. „Chitin and Carbon Nanotube Composites as Biocompatible Scaffolds for Neuron Growth”. *Nanoscale* 8(15):8288–99. doi: 10.1039/c5nr06595j.
- Singh, Prabhpreet, V. Venkatesh, N. Nagapradeep, Sandeep Verma, i Alberto Bianco. 2012. „G-Quartet Type Self-Assembly of Guanine Functionalized Single-Walled Carbon Nanotubes”. *Nanoscale* 4(6):1972–74. doi: 10.1039/c2nr11849a.
- Singh, Ravi, i Suzy V. Torti. 2013. „Carbon Nanotubes in Hyperthermia Therapy”. *Advanced Drug Delivery Reviews* 65(15):2045–60. doi: 10.1016/j.addr.2013.08.001.
- Sireesha, Merum, Veluru Jagadeesh Babu, A. Sandeep Kranthi Kiran, i Seeram Ramakrishna. 2018. „A review on carbon nanotubes in biosensor devices and their applications in medicine”. *Nanocomposites* 4(2):36–57. doi: 10.1080/20550324.2018.1478765.
- Soundararajan, Sridharan, Li Wang, Vijayalakshmi Sridharan, Weiwei Chen, Nigel Courtenay-Luck, David Jones, Eleanor K. Spicer, i Daniel J. Fernandes. 2009. „Plasma Membrane Nucleolin Is a Receptor for the Anticancer Aptamer AS1411 in MV4-11 Leukemia Cells”. *Molecular Pharmacology* 76(5):984–91. doi: 10.1124/mol.109.055947.
- Sousa da Silva, Alan W., i Wim F. Vranken. 2012. „ACPYPE - AnteChamber PYthon Parser Interface”. *BMC Research Notes* 5:367. doi: 10.1186/1756-0500-5-367.
- Spiwok, Wojtech, Zoran Sucur, i Petr Hosek. 2015. „Enhanced Sampling Techniques in Biomolecular Simulations”. *Biotechnology Advances* 33(6 Pt 2):1130–40. doi: 10.1016/j.biotechadv.2014.11.011.
- Stuart, Steven J., Alan B. Tutein, i Judith A. Harrison. 2000. „A reactive potential for hydrocarbons with intermolecular interactions”. *The Journal of Chemical Physics* 112(14):6472–86. doi: 10.1063/1.481208.
- Sukhodub, L. B., L. F. Sukhodub, Yu I. Prylutskyy, N. Yu Strutynska, L. L. Vovchenko, V. M. Soroca, N. S. Slobodyanik, N. G. Tsierkezos, i U. Ritter. 2018. „Composite Material Based on Hydroxyapatite and Multi-Walled Carbon Nanotubes Filled by Iron: Preparation, Properties and Drug Release Ability”. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications* 93:606–14. doi: 10.1016/j.msec.2018.08.019.

- Sun, Daekyu, i Laurence H. Hurley. 2009. „The Importance of Negative Superhelicity in Inducing the Formation of G-Quadruplex and i-Motif Structures in the c-Myc Promoter: Implications for Drug Targeting and Control of Gene Expression”. *Journal of Medicinal Chemistry* 52(9):2863–74. doi: 10.1021/jm900055s.
- Sun, Hanjun, Jinsong Ren, i Xiaogang Qu. 2016. „Carbon Nanomaterials and DNA: From Molecular Recognition to Applications”. *Accounts of Chemical Research* 49(3):461–70. doi: 10.1021/acs.accounts.5b00515.
- Taguchi, Masashige, Andre Ptitsyn, Eric S. McLamore, i Jonathan C. Claussen. 2014. „Nanomaterial-mediated Biosensors for Monitoring Glucose”. *Journal of Diabetes Science and Technology* 8(2):403–11. doi: 10.1177/1932296814522799.
- Tera, Masayuki, Keisuke Iida, Hiromichi Ishizuka, Motoki Takagi, Masami Suganuma, Takayuki Doi, Kazuo Shin-ya, i Kazuo Nagasawa. 2009. „Synthesis of a Potent G-Quadruplex-Binding Macrocyclic Heptaioxazole”. *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology* 10(3):431–35. doi: 10.1002/cbic.200800563.
- Terranova, M. L., V. Sessa, i M. Rossi. 2006. „The World of Carbon Nanotubes: An Overview of CVD Growth Methodologies”. *Chemical Vapor Deposition* 12(6):315–25. doi: 10.1002/cvde.200600030.
- Tian, Tian, Yu-Qi Chen, Shao-Ru Wang, i Xiang Zhou. 2018. „G-Quadruplex: A Regulator of Gene Expression and Its Chemical Targeting”. *Chem* 4(6):1314–44. doi: 10.1016/j.chempr.2018.02.014.
- Tlučková, Katarína, Maja Marušič, Petra Tóthová, Lubos Bauer, Primož Šket, Janez Plavec, i Viktor Víglašky. 2013. „Human Papillomavirus G-Quadruplexes”. *Biochemistry* 52(41):7207–16. doi: 10.1021/bi400897g.
- Tunuguntla, Ramya H., Robert Y. Henley, Yun-Chiao Yao, Tuan Anh Pham, Meni Wanunu, i Aleksandr Noy. 2017. „Enhanced Water Permeability and Tunable Ion Selectivity in Subnanometer Carbon Nanotube Porins”. *Science (New York, N.Y.)* 357(6353):792–96. doi: 10.1126/science.aan2438.
- Turel, Iztok, i Jakob Kljun. 2011. „Interactions of Metal Ions with DNA, Its Constituents and Derivatives, Which May Be Relevant for Anticancer Research”. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 11(21):2661–87. doi: 10.2174/156802611798040787.
- Turner, P. C., A. G. McLennan, A. D. Bates, i M. R. H. White. 2011. *Biologia molekularna - krótkie wykłady*. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa.
- Uo, Motohiro, Tsukasa Akasaka, Fumio Watari, Yoshinori Sato, i Kazuyuki Tohji. 2011. „Toxicity Evaluations of Various Carbon Nanomaterials”. *Dental Materials Journal* 30(3):245–63. doi: 10.4012/dmj.2010-039.
- Urankar, Rakhee N., Robert M. Lust, Erin Mann, Pranita Katwa, Xiaojia Wang, Ramakrishna Podila, Susana C. Hilderbrand, Benjamin S. Harrison, Pengyu Chen, Pu Chun Ke, Apparao M. Rao, Jared M. Brown, i Christopher J. Wingard. 2012. „Expansion of Cardiac Ischemia/Reperfusion Injury after Instillation of Three Forms of Multi-Walled Carbon Nanotubes”. *Particle and Fibre Toxicology* 9:38. doi: 10.1186/1743-8977-9-38.
- Usui, Yuki, Kaoru Aoki, Nobuyo Narita, Narumichi Murakami, Isao Nakamura, Koichi Nakamura, Norio Ishigaki, Hiroshi Yamazaki, Hiroshi Horiuchi, Hiroyuki Kato, Seiichi Taruta, Yoong Ahm Kim, Morinobu Endo, i Naoto Saito. 2008. „Carbon Nanotubes

- with High Bone-Tissue Compatibility and Bone-Formation Acceleration Effects". *Small* (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany) 4(2):240–46. doi: 10.1002/sml.200700670.
- Vanquelef, Enguerran, Sabrina Simon, Gaelle Marquant, Elodie Garcia, Geoffroy Klimerak, Jean Charles Delepine, Piotr Cieplak, i François-Yves Dupradeau. 2011. „R.E.D. Server: A Web Service for Deriving RESP and ESP Charges and Building Force Field Libraries for New Molecules and Molecular Fragments". *Nucleic Acids Research* 39(Web Server issue):W511–517. doi: 10.1093/nar/gkr288.
- Vasquez, K. M., L. Narayanan, i P. M. Glazer. 2000. „Specific Mutations Induced by Triplex-Forming Oligonucleotides in Mice". *Science* (New York, N.Y.) 290(5491):530–33. doi: 10.1126/science.290.5491.530.
- Vázquez-González, Margarita, i Itamar Willner. 2021. „Aptamer-Functionalized Hybrid Nanostructures for Sensing, Drug Delivery, Catalysis and Mechanical Applications". *International Journal of Molecular Sciences* 22(4). doi: 10.3390/ijms22041803.
- Vidu, Ruxandra, Masoud Rahman, Morteza Mahmoudi, Marius Enachescu, Teodor D. Poteca, i Ioan Opris. 2014. „Nanostructures: a platform for brain repair and augmentation". *Frontiers in Systems Neuroscience* 8:91. doi: 10.3389/fnsys.2014.00091.
- Virani, Needa A., Carole Davis, Patrick McKernan, Paul Hauser, Robert E. Hurst, Joel Slaton, Ricardo P. Silvy, Daniel E. Resasco, i Roger G. Harrison. 2018. „Phosphatidylserine Targeted Single-Walled Carbon Nanotubes for Photothermal Ablation of Bladder Cancer". *Nanotechnology* 29(3):035101. doi: 10.1088/1361-6528/aa9c0c.
- Wang, Junmei, Wei Wang, Peter A. Kollman, i David A. Case. 2006. „Automatic Atom Type and Bond Type Perception in Molecular Mechanical Calculations". *Journal of Molecular Graphics & Modelling* 25(2):247–60. doi: 10.1016/j.jmgm.2005.12.005.
- Wang, Lihua, Yanbo Wu, Tinggui Chen, i Chunying Wei. 2013. „The Interactions of Phenanthroline Compounds with DNAs: Preferential Binding to Telomeric Quadruplex over Duplex". *International Journal of Biological Macromolecules* 52:1–8. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2012.08.015.
- Wang, Wenmeng, Shuangli Hu, Yaru Gu, Yunxiao Yan, Daniel B. Stovall, Dangdang Li, i Guangchao Sui. 2020. „Human MYC G-Quadruplex: From Discovery to a Cancer Therapeutic Target". *Biochimica Et Biophysica Acta. Reviews on Cancer* 1874(2):188410. doi: 10.1016/j.bbcan.2020.188410.
- Wang, Zhen-Gang, Johann Elbaz, i Itamar Willner. 2011. „DNA Machines: Bipedal Walker and Stepper". *Nano Letters* 11(1):304–9. doi: 10.1021/nl104088s.
- Webb, Bradley A., Michael Chimenti, Matthew P. Jacobson, i Diane L. Barber. 2011. „Dysregulated PH: A Perfect Storm for Cancer Progression". *Nature Reviews. Cancer* 11(9):671–77. doi: 10.1038/nrc3110.
- Weiner, Scott J., Peter A. Kollman, David A. Case, i U. Chandra Singh. 1984. „A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins". *Journal of the American Chemical Society* 106(3):765–84. doi: 10.1021/ja00315a051.
- Weiner, Scott J., Peter A. Kollman, Dzung T. Nguyen, i David A. Case. 1986. „An All Atom Force Field for Simulations of Proteins and Nucleic Acids". *Journal of Computational Chemistry* 7(2):230–52. doi: 10.1002/jcc.540070216.
- Werder, T., J. H. Walther, R. L. Jaffe, T. Halicioglu, i P. Koumoutsakos. 2003. „On the Water–Carbon Interaction for Use in Molecular Dynamics Simulations of Graphite and

- Carbon Nanotubes". *The Journal of Physical Chemistry B* 107(6):1345–52. doi: 10.1021/jp0268112.
- Wick, Peter, Pius Manser, Ludwig K. Limbach, Ursula Dettlaff-Weglikowska, Frank Krumeich, Siegmund Roth, Wendelin J. Stark, i Arie Bruinink. 2007. „The Degree and Kind of Agglomeration Affect Carbon Nanotube Cytotoxicity". *Toxicology Letters* 168(2):121–31. doi: 10.1016/j.toxlet.2006.08.019.
- Wolinski, Krzysztof, i Jon Baker. 2010. „Geometry optimization in the presence of external forces: a theoretical model for enforced structural changes in molecules". *Molecular Physics* 108(14):1845–56. doi: 10.1080/00268976.2010.492795.
- Wolski, Paweł, Krzysztof Nieszporek, i Andrzej Tomasz Panczyk. 2020. „Carbon Nanotubes and Short Cytosine-Rich Telomeric DNA Oligomers as Platforms for Controlled Release of Doxorubicin-A Molecular Dynamics Study". *International Journal of Molecular Sciences* 21(10):E3619. doi: 10.3390/ijms21103619.
- Wolski, Paweł, Krzysztof Nieszporek, i Tomasz Panczyk. 2017. „Pegylated and Folic Acid Functionalized Carbon Nanotubes as pH Controlled Carriers of Doxorubicin. Molecular Dynamics Analysis of the Stability and Drug Release Mechanism". *Physical Chemistry Chemical Physics: PCCP* 19(13):9300–9312. doi: 10.1039/c7cp00702g.
- Wolski, Paweł, Krzysztof Nieszporek, i Tomasz Panczyk. 2019. „G-Quadruplex and I-Motif Structures within the Telomeric DNA Duplex. A Molecular Dynamics Analysis of Protonation States as Factors Affecting Their Stability". *The Journal of Physical Chemistry. B* 123(2):468–79. doi: 10.1021/acs.jpcc.8b11547.
- Wolski, Paweł, Krzysztof Nieszporek, i Tomasz Panczyk. 2021. „Cytosine-Rich DNA Fragments Covalently Bound to Carbon Nanotube as Factors Triggering Doxorubicin Release at Acidic pH. A Molecular Dynamics Study". *International Journal of Molecular Sciences* 22(16):8466. doi: 10.3390/ijms22168466.
- Wolski, Paweł, Patrycja Wojton, Krzysztof Nieszporek, i Tomasz Panczyk. 2019. „Interaction of Human Telomeric i-Motif DNA with Single-Walled Carbon Nanotubes: Insights from Molecular Dynamics Simulations". *The Journal of Physical Chemistry B* 123(49):10343–53. doi: 10.1021/acs.jpcc.9b07292.
- Wright, Elisé P., Mahmoud A. S. Abdelhamid, Michelle O. Ehiabor, Melanie C. Grigg, Kelly Irving, Nicole M. Smith, i Zoë A. E. Waller. 2020. „Epigenetic Modification of Cytosines Fine Tunes the Stability of I-Motif DNA". *Nucleic Acids Research* 48(1):55–62. doi: 10.1093/nar/gkz1082.
- Wright, Elisé P., Henry A. Day, Ali M. Ibrahim, Jeethendra Kumar, Leo J. E. Boswell, Camille Huguin, Clare E. M. Stevenson, Klaus Pors, i Zoë A. E. Waller. 2016. „Mitoxantrone and Analogues Bind and Stabilize I-Motif Forming DNA Sequences". *Scientific Reports* 6:39456. doi: 10.1038/srep39456.
- Wright, Elisé P., Julian L. Huppert, i Zoë A. E. Waller. 2017. „Identification of Multiple Genomic DNA Sequences Which Form I-Motif Structures at Neutral pH". *Nucleic Acids Research* 45(6):2951–59. doi: 10.1093/nar/gkx090.
- Wu, Xu, Jiao Chen, Min Wu, i Julia Xiaojun Zhao. 2015. „Aptamers: Active Targeting Ligands for Cancer Diagnosis and Therapy". *Theranostics* 5(4):322–44. doi: 10.7150/thno.10257.

- Xu, Lijun, Shanni Hong, Na Sun, Kewei Wang, Lu Zhou, Liya Ji, i Renjun Pei. 2016. „Berberine as a Novel Light-up i-Motif Fluorescence Ligand and Its Application in Designing Molecular Logic Systems”. *Chemical Communications* (Cambridge, England) 52(1):179–82. doi: 10.1039/c5cc08242k.
- Xue, Liang, Nihar Ranjan, i Dev P. Arya. 2011. „Synthesis and Spectroscopic Studies of the Aminoglycoside (Neomycin)--Perylene Conjugate Binding to Human Telomeric DNA”. *Biochemistry* 50(14):2838–49. doi: 10.1021/bi1017304.
- Yadav, Puja, Nayun Kim, Monika Kumari, Shalini Verma, Tarun Kumar Sharma, Vikas Yadav, i Amit Kumar. 2021. „G-Quadruplex Structures in Bacteria: Biological Relevance and Potential as an Antimicrobial Target”. *Journal of Bacteriology* 203(13):e0057720. doi: 10.1128/JB.00577-20.
- Yan, Yan, Ruizhi Wang, Yong Hu, Rongyue Sun, Tian Song, Xiangyang Shi, i Shimeng Yin. 2018. „Stacking of Doxorubicin on Folic Acid-Targeted Multiwalled Carbon Nanotubes for in Vivo Chemotherapy of Tumors”. *Drug Delivery* 25(1):1607–16. doi: 10.1080/10717544.2018.1501120.
- Yang, Bo, i M. T. Rodgers. 2014. „Base-Pairing Energies of Proton-Bound Heterodimers of Cytosine and Modified Cytosines: Implications for the Stability of DNA i-Motif Conformations”. *Journal of the American Chemical Society* 136(1):282–90. doi: 10.1021/ja409515v.
- Yang, Hualin, Wentao Xu, Xiongyan Liang, Yuying Yang, i Yu Zhou. 2020. „Carbon Nanotubes in Electrochemical, Colorimetric, and Fluorimetric Immunosensors and Immunoassays: A Review”. *Mikrochimica Acta* 187(4):206. doi: 10.1007/s00604-020-4172-4.
- Yang, L., S. Wang, T. Tian, i X. Zhou. 2012. „Advancements in Z-DNA: Development of Inducers and Stabilizers for B to Z Transition”. *Current Medicinal Chemistry* 19(4):557–68. doi: 10.2174/092986712798918806.
- Yang, Shuo, Wenyan Liu, i Risheng Wang. 2019. „Control of the Stepwise Assembly-Disassembly of DNA Origami Nanoclusters by PH Stimuli-Responsive DNA Triplexes”. *Nanoscale* 11(39):18026–30. doi: 10.1039/c9nr05047g.
- Yang, Yang, Gang Liu, Huajie Liu, Di Li, Chunhai Fan, i Dongsheng Liu. 2010. „An Electrochemically Actuated Reversible DNA Switch”. *Nano Letters* 10(4):1393–97. doi: 10.1021/nl100169p.
- You, Wanli, Zhiye Tang, i Chia-En A. Chang. 2019. „Potential Mean Force from Umbrella Sampling Simulations: What Can We Learn and What Is Missed?” *Journal of Chemical Theory and Computation* 15(4):2433–43. doi: 10.1021/acs.jctc.8b01142.
- Yu, Shiping, Qiang Li, Junli Wang, Jinglei Du, i Xuguang Liu. 2018. „A Targeted Drug Delivery System Based on Carbon Nanotubes Loaded with Lobaplatin toward Liver Cancer Cells”. *Journal of Materials Research* 33(17):2565–75. doi: 10.1557/jmr.2018.197.
- Yu, Yuanyuan, Chao Liang, Quaxia Lv, Defang Li, Xuegong Xu, Baoqin Liu, Aiping Lu, i Ge Zhang. 2016. „Molecular Selection, Modification and Development of Therapeutic Oligonucleotide Aptamers”. *International Journal of Molecular Sciences* 17(3):358. doi: 10.3390/ijms17030358.

- Zaccaria, Francesco, i Célia Fonseca Guerra. 2018. „RNA versus DNA G-Quadruplex: The Origin of Increased Stability”. *Chemistry (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)* 24(61):16315–22. doi: 10.1002/chem.201803530.
- Zanello, Laura P., Bin Zhao, Hui Hu, i Robert C. Haddon. 2006. „Bone Cell Proliferation on Carbon Nanotubes”. *Nano Letters* 6(3):562–67. doi: 10.1021/nl051861e.
- Zare, Hossein, Sepideh Ahmadi, Amir Ghasemi, Mohammad Ghanbari, Navid Rabiee, Mojtaba Bagherzadeh, Mahdi Karimi, Thomas J. Webster, Michael R. Hamblin, i Ebrahim Mostafavi. 2021. „Carbon Nanotubes: Smart Drug/Gene Delivery Carriers”. *International Journal of Nanomedicine* 16:1681–1706. doi: 10.2147/IJN.S299448.
- Zeraati, Mahdi, David B. Langley, Peter Schofield, Aaron L. Moyer, Romain Rouet, William E. Hughes, Tracy M. Bryan, Marcel E. Dinger, i Daniel Christ. 2018. „I-Motif DNA Structures Are Formed in the Nuclei of Human Cells”. *Nature Chemistry* 10(6):631–37. doi: 10.1038/s41557-018-0046-3.
- Zhang, Haiyuan, Haijia Yu, Jinsong Ren, i Xiaogang Qu. 2006. „Reversible B/Z-DNA Transition under the Low Salt Condition and Non-B-Form PolydApolydT Selectivity by a Cubane-like Europium-L-Aspartic Acid Complex”. *Biophysical Journal* 90(9):3203–7. doi: 10.1529/biophysj.105.078402.
- Zhang, Ping, Wenhui Yi, Jin Hou, Sweejiang Yoo, Weiqiu Jin, i Qisheng Yang. 2018. „A carbon nanotube-gemcitabine-lentinan three-component composite for chemophotothermal synergistic therapy of cancer”. *International Journal of Nanomedicine* 13:3069–80. doi: 10.2147/IJN.S165232.
- Zhang, Yi, Yuhong Bai, i Bing Yan. 2010. „Functionalized Carbon Nanotubes for Potential Medicinal Applications”. *Drug Discovery Today* 15(11):428–35. doi: 10.1016/j.drudis.2010.04.005.
- Zhao, Chao, Jinsong Ren, i Xiaogang Qu. 2008. „Single-Walled Carbon Nanotubes Binding to Human Telomeric i-Motif DNA under Molecular-Crowding Conditions: More Water Molecules Released”. *Chemistry (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)* 14(18):5435–39. doi: 10.1002/chem.200800280.
- Zhao, Chao, Yujun Song, Jinsong Ren, i Xiaogang Qu. 2009. „A DNA Nanomachine Induced by Single-Walled Carbon Nanotubes on Gold Surface”. *Biomaterials* 30(9):1739–45. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.12.034.
- Zhao, Chuanqi, Geng Qin, Jingsheng Niu, Zhao Wang, Chunyu Wang, Jinsong Ren, i Xiaogang Qu. 2021. „Targeting RNA G-Quadruplex in SARS-CoV-2: A Promising Therapeutic Target for COVID-19?” *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* 60(1):432–38. doi: 10.1002/anie.202011419.
- Zhao, Dandan, Haoran Tang, Hao Wang, Cheng Yang, i Yongxin Li. 2020. „Analytes Triggered Conformational Switch of I-Motif DNA inside Gold-Decorated Solid-State Nanopores”. *ACS Sensors* 5(7):2177–83. doi: 10.1021/acssensors.0c00798.
- Zheng, Ming, Anand Jagota, Michael S. Strano, Adelina P. Santos, Paul Barone, S. Grace Chou, Bruce A. Diner, Mildred S. Dresselhaus, Robert S. McLean, G. Bibiana Onoa, Georgii G. Samsonidze, Ellen D. Semke, Monica Usrey, i Dennis J. Walls. 2003. „Structure-Based Carbon Nanotube Sorting by Sequence-Dependent DNA Assembly”. *Science (New York, N.Y.)* 302(5650):1545–48. doi: 10.1126/science.1091911.

- Zhou, Jun, Chunying Wei, Guoqing Jia, Xiuli Wang, Zhaochi Feng, i Can Li. 2010. „Formation of I-Motif Structure at Neutral and Slightly Alkaline PH”. *Molecular BioSystems* 6(3):580–86. doi: 10.1039/b919600e.
- Zhou, Yan, Yi Fang, i Ramaraja P. Ramasamy. 2019. „Non-Covalent Functionalization of Carbon Nanotubes for Electrochemical Biosensor Development”. *Sensors* 19(2):392. doi: 10.3390/s19020392.
- Zhu, Rong, Maude Desroches, Bora Yoon, i Timothy M. Swager. 2017. „Wireless Oxygen Sensors Enabled by Fe(II)-Polymer Wrapped Carbon Nanotubes”. *ACS Sensors* 2(7):1044–50. doi: 10.1021/acssensors.7b00327.
- Zribi, B., E. Roy, A. Pallandre, S. Chebil, M. Koubaa, N. Mejri, H. Magdinier Gomez, C. Sola, H. Korri-Youssoufi, i A. M. Haghiri-Gosnet. 2016. „A Microfluidic Electrochemical Biosensor Based on Multiwall Carbon Nanotube/Ferrocene for Genomic DNA Detection of Mycobacterium Tuberculosis in Clinical Isolates”. *Biomicrofluidics* 10(1):014115. doi: 10.1063/1.4940887.