

Instytut Chemii Bioorganicznej

Polskiej Akademii Nauk

**Badania strukturalne kwadrupleksów RNA
utworzonych z trinukleotydowych powtórzeń
AGG i UGG**

Magdalena Małgowska

Pracę wykonano w Pracowni Biomolekularnego NMR
pod kierunkiem prof. dr hab. Zofii Gdaniec

Poznań, 2015

Serdecznie dziękuję Pani Prof. dr hab. Zofii Gdaniec za opiekę naukową, przekazaną wiedzę oraz możliwość ciągłego rozwoju. Dziękuję również za życzliwość, zaufanie i niezwykłą atmosferę, dzięki której już dziś wiem, że będę tęsknić za tym czasem.

Dziękuję również

Panu Prof. dr hab. Ryszardowi Kierzkowi za syntezę związków, które były przedmiotem moich badań oraz okazaną pomoc i wsparcie,

Pani dr Valérie Gabelica za owocną współpracę i przekazaną wiedzę dotyczącą wykorzystania spektrometrii mas do badań kwasów nukleinowych,

Pani dr hab. Elizie Wyszko oraz Pani dr Agnieszce Fedoruk-Wyszomirskiej za możliwość podglądania badanych przeze mnie kwadrupleksów w komórkowej rzeczywistości,

Wszystkim członkom Pracowni Biomolekularnego NMR za cudowny codzienny czas, a szczególnie dr Dorocie Gudanis za pomoc, cierpliwość oraz wszystkie odpowiedzi.

Moim przyjaciółkom Asi i Paulinie za radość życia oraz Oldze, bez której nic by się nie zadziało.

*Specjalne podziękowania pragnę złożyć moim
najbliższym – Rodzicom i Aleksandrowi – to dzięki
Wam wszystko jest możliwe!*

Część prezentowanych wyników została zawarta w publikacjach oraz w komunikatach konferencyjnych:

- 1) M. Małgowska, D. Gudanis, R. Kierzek, E. Wyszko, V. Gabelica, Z. Gdaniec
Distinctive structural motifs of RNA G-quadruplexes composed of AGG, CGG and UGG trinucleotide repeats
Nucleic Acids Res. 2014, vol. 42 (15), 10196-10207
- 2) M. Małgowska, D. Gudanis, Z. Gdaniec
G-quadruplex structures of AGG, CGG and UGG RNA repeats
BioTechnologia 2013, vol. 94(1)
- 3) M. Małgowska, D. Gudanis, A. Teubert, G. Dominiak, Z. Gdaniec
How to study G-quadruplex structures?
BioTechnologia 2012, vol. 93(4), 381-390
- 4) Z. Gdaniec, M. Małgowska, D. Gudanis, E. Wyszko, V. Gabelica, R. Kierzek
Distinctive structural motifs of RNA G-quadruplexes composed of AGG, CGG and UGG trinucleotide repeats
XXI Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, Poznań 2014
- 5) M. Małgowska, D. Gudanis, V. Gabelica, Z. Gdaniec
AGG, CGG and UGG Tandem Repeats RNA Sequences Fold into G-quadruplex Structures
IVth International Meeting on G-Quadruplex Nucleic Acids from Structure to Chemistry and Biology, Singapur 2013
- 6) M. Małgowska, D. Gudanis, Z. Gdaniec
G-quadruplex Structures of AGG, CGG and UGG RNA repeats
Konferencja międzynarodowa "Structural Biology of Plants and Microbes", Poznań 2013
- 7) M. Małgowska, D. Gudanis, Z. Gdaniec
Structural motifs of RNA G-quadruplexes composed of trinucleotide AGG, CGG and UGG repeats
Conformational Diversity and Applications of G- quadruplexes, COST Action Final Conference, Sitges 2012

- 8) M. Małgowska, A. Teubert, Z. Gdaniec
Structural studies of RNA quadruplex composed of two UGG repeats
VIIth Symposium on Nuclear Magnetic Resonance in Chemistry, Physics and Biological Sciences, Warszawa 2012
- 9) M. Małgowska, Z. Gdaniec
Structural studies of r(pUGGUGGU)
2nd Bio-NMR Annual User Meeting: Breakthroughs in NMR of structural biology, Portoroz 2012
- 10) M. Małgowska, D. Gudanis, Z. Gdaniec
Structural polymorphism of RNA quadruplexes formed by trinucleotide CGG, AGG and UGG repeats
Second Training School on G-Quadruplexes "Self-assembled guanosine structures for molecular electronic devices", Spa 2011
- 11) M. Małgowska, Z. Gdaniec
RNA quadruplexes formed by trinucleotide AGG and UGG tandem repeats studied by NMR and UV spectroscopy
Third International Meeting on G-Quadruplex and G-assembly, Sorrento 2011
- 12) M. Małgowska, D. Gudanis, Z. Gdaniec
Influence of different 5' and 3' caps on RNA quadruplex formation
VIth Symposium on Nuclear Magnetic Resonance in Chemistry, Physics and Biological Sciences, Warszawa 2010
- 13) M. Małgowska, D. Gudanis, Z. Gdaniec
The effect of chain length, modification and solution conditions on the structure of oligoribonucleotides tandem NGG repeats
EURASNET Interdisciplinary Focus Meeting, "Frontiers of Structural Biology of RNAs and RNPs", Poznań 2010

Spis treści

1. WPROWADZENIE	17
2. CEL PRACY	23
3. WSTĘP LITERATUROWY	27
3.1 RNA – budowa i konformacja	27
3.2 Struktura i funkcja G-kwadrupleksów	35
3.2.1. Budowa G-kwadrupleksów	35
3.2.2. Nietypowe motywy strukturalne kwadrupleksów.....	42
3.2.3. Funkcja biologiczna G-kwadrupleksu	49
3.3 Przegląd wybranych metod eksperymentalnych stosowanych w badaniach kwadrupleksów	51
3.3.1. Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego - NMR.....	51
3.3.2. Spektroskopia UV-Vis.....	64
3.3.3. Spektroskopia dichroizmu kołowego - CD	65
3.3.4. Spektrometria mas.....	66
3.3.5. Podsumowanie	71
4. WYNIKI BADAŃ WŁASNYCH	77
4.1. Optymalizacja warunków pomiaru widm NMR.....	77
4.2. Analiza widm ¹ H NMR, UV-Vis, CD i ESI-IMS-MS w obecności jonów K ⁺ , Na ⁺ i NH ₄ ⁺	82
4.2.1. Analiza widm ¹ H NMR	82
4.2.2. Spektroskopia UV-Vis.....	87
4.2.3. Spektroskopia dichroizmu kołowego (CD).....	91
4.2.4. Spektrometria mas ze źródłem jonizacji poprzez elektroroz-praszanie oraz z zastosowaniem trybu pomiaru mobilności jonów - ESI-IMS-MS.....	93
4.3. Ustalenie pofałdowania kwadrupleksów AGGAGGA i pUGGUGGU	105
4.3.1. AGGAGGA	105
4.3.2. pUGGUGGU	115
4.4. Badania w ekstrakcie z komórek HeLa	127
4.5. Badania z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej	129
5. DYSKUSJA WYNIKÓW	135
6. PODSUMOWANIE	151
7. MATERIAŁY I METODY	155
7.1. Synteza chemiczna i przygotowanie RNA do badań.....	155

7.2. Bufory stosowane do badań UV-Vis, CD i NMR:	158
7.3. Aparatura pomiarowa	158
7.4. Pomiar krzywych topnienia RNA.....	159
7.5. Pomiar absorpcyjnych widm różnicowych (TDS)	159
7.6. Pomiar widma dichroizmu kołowego (CD)	160
7.7. Spektrometria mas – ESI-IMS-MS.....	160
7.8. NMR	161
7.9. NMR w ekstrakcie z komórek HeLa	164
7.10. Badania transfekcji i lokalizacji subkomórkowej	165
8. LITERATURA	169
9. STRESZCZENIE.....	185
10. FINANSOWANIE	187
ZAŁĄCZNIKI.....	189

SPIS SKRÓTÓW:

A – adenozyzna

A-RNA – forma A kwasu rybonukleinowego

B-DNA – forma B kwasu deoksyrybonukleinowego

BrC – 5-bromocytozyna

BrG – 8-bromoguanozyna

BrU – 5-bromouracydyna

C – cytydyna

CD – spektroskopia dichroizmu kołowego (ang. *Circular Dichroism*)

C-MYC – protoonkogen kodujący białko Myc

COSY – ang. *CORrelation SpectroscopY*

DLS – dynamiczne rozpraszanie światła (ang. *Dynamic Light Scattering*)

DNA – kwas deoksyrybonukleinowy

ESI-MS – spektrometria mas z jonizacją za pomocą elektrozpraszania (ang. *Electrospray Mass Spectrometry*)

FAM – karboksyfluoresceina

FMR1 – gen (ang. *Fragile X Mental Retardation 1*)

G – guanozyna

GFL – 2'-fluoro-2'-deoksyguanozyna

HCV – wirus zapalenia wątroby typu C (WZW C, ang. *Hepatitis C Virus*)

HIV – wirus niedoboru odporności (ang. *Human Immunodeficiency Virus*)

HMBC – ang. *Heteronuclear Multiple Bond Coherence*

HSQC – ang. *Heteronuclear Single Quantum Correlation*

HSV – wirus opryszczki pospolitej (ang. *Herpes Simplex Virus*)

hTERT - podjednostka białkowa ludzkiej telomerazy (ang. *Telomerase Reverse Transcriptase*)

I – inozyna

IMS – spektrometria mobilności jonów (ang. *Ion Mobility Spectrometry*)

LNA – ang. *Locked Nucleic Acid*

mRNA – matrycowy RNA (ang. *messenger RNA*)

NMR – spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (ang. *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*)

NOE – ang. *Nuclear Overhauser Effect*

NOESY – ang. *Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy*

NRAS – onkogen Neuroblastoma RAS

OD – gęstość optyczna (ang. *Optical Density*)

PAGE – elektroforeza w żelu poliakrylamidowym (ang. *Poliacrylamide Gel Electrophoresis*)

PNA – kwas peptydonukleinowy (ang. *Peptide Nucleic Acid*)

RNA – kwas rybonukleinowy

SAXS – małokątowe rozpraszanie promieniowania rentgenowskiego (ang. *Small-Angle X-ray Scattering*)

T – tymidyna

TDS – absorpcyjne widmo różnicowe (ang. *Thermal Difference Spectra*)

TERRA – RNA, które zawiera powtórzenia telomerowe (ang. *Telomeric Repeat-containing RNA*)

TNRs – powtórzenia trinukleotydomowe (ang. *Trinucleotide Repeats*)

TREDS – grupa chorób neurodegeneracyjnych związana z niekontrolowaną ekspansją ciągów powtórzeń trinukleotydowych (ang. *Triplet Repeat Expansion Diseases*)

U – urydyna

UTR – rejon RNA nieulegający translacji (ang. *Untranslated Region*)

UV-Vis – spektroskopia UV-Vis

Z-RNA – forma Z kwasu rybonukleinowego

WPROWADZENIE

1. WPROWADZENIE

Poznanie struktury przestrzennej cząsteczek RNA stanowi ważny kierunek badań w naukach medycznych i genetycznych, ponieważ dopiero jej znajomość pozwala w pełni wyjaśnić funkcję tych biomolekuł. Ponadto dane strukturalne wykorzystuje się przy projektowaniu leków przeznaczonych na przykład do terapii chorób nowotworowych, infekcyjnych (np. HCV, HIV) i neurodegeneracyjnych.

Obiektem moich badań były kwadrupleksy RNA zbudowane z dwóch i czterech trinukleotydowych powtórzeń (TNRs, ang. *Trinucleotide Repeats*) AGG i UGG. TNRs należą do rodziny sekwencji mikrosatelitarnych, które występują w blisko 4% ludzkiego mRNA. Sekwencje typu TNRs wykazują silną tendencję do mutacji przejawiających się niekontrolowaną ekspansją ciągów powtórzeń. Prowadzą one do wielu schorzeń układu mięśniowo-szkieletowego i układu nerwowego, jak np. choroba Huntingtona, ataksja, czy syndrom łamliwego chromosomu X, znane pod wspólną nazwą TREDS (ang. *Triplet Repeat Expansion Diseases*) (1–3).

Analiza bioinformatyczna sekwencji ludzkich mRNA, przeprowadzona w Zakładzie Biomedycyny Molekularnej IChB PAN wykazała, że spośród wszystkich 1030 możliwych trinukleotydowych traktów, zawierających sześć lub więcej tandemowych powtórzeń, najczęściej występują powtórzenia sekwencji CGG (365 przypadków), CAG (301 przypadków) oraz AGG (169 przypadków). Dla kontrastu, takiej samej długości sekwencja zawierająca powtórzony motyw UGG występuje jedynie w 6 ludzkich transkryptach (4). Badania prowadzone w naszej Pracowni skupiają się wokół sekwencji bogatych w reszty guanozyny (powtórzenia AGG, CGG i UGG), potencjalnie skłonnych do formowania struktury G-kwadrupleksu. Analiza ludzkiego transkryptomu wykazała, że badane przez nas powtórzenia wykazują różną lokalizację w obrębie mRNA (4). Okazało się, że powtórzenia AGG występują głównie w rejonie otwartej ramki odczytu (ORF, ang. *Open reading frame*), powtórzenia CGG znajdują się najczęściej w rejonie nieulegającym translacji na końcu 5' (5'-UTR, ang. *Untranslated region*), a powtórzenia UGG są zlokalizowane również w rejonie nieulegającym translacji, ale na końcu 3' (3'-UTR). Różne rozmieszczenie tych powtórzeń sugeruje, że mogą one pełnić różne funkcje biologiczne. Jak dotąd, jedynie ekspansja powtórzeń CGG została zidentyfikowana jako genetyczne podłoże chorób neurodegeneracyjnych. Niekontrolowana ekspansja tych powtórzeń w rejonie 5'-UTR genu *FMR1*

proceeds to the manifestation of the fragile X chromosome syndrome, one of the most frequent occurring developmental disorders (5) and the fragile X chromosome syndrome (6).

The research team of Professor Włodzimierz Krzyżosiak (IChB PAN) conducted a structural analysis of RNA molecules composed of seven trinucleotide repeats, using biochemical (polyacrylamide gels under non-denaturing conditions, hydrolysis induced by sodium ions and selective hydrolysis in the presence of endogenous nucleases) and biophysical (UV-Vis and CD spectroscopy) techniques. Four structural families were distinguished: (i) forming stable or (ii) semi-stable hairpins, (iii) quadruplexes and (iv) repeat units devoid of a defined secondary structure (7). It was found that among 20 studied repeat units, representing all possible trinucleotide repeats occurring in the human transcriptome, only the (AGG)₁₇ and (UGG)₁₇ repeats have the ability to adopt a quadruplex structure, while the preferred form of the (CGG)₁₇ repeat is a hairpin structure (7, 3).

By the end of October 2014, in the RCSB PDB database (ang. *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics; Protein Data Bank*) only four structures of RNA molecules composed of trinucleotide repeats of the AGG, CGG or UGG type were deposited. Among them is one structure of an RNA molecule composed of four GGA repeats (quadruplex) (8) and three structures of RNA molecules composed of two CGG repeats (duplexes) (9). Unknown are the structures of RNA molecules composed of UGG repeats. A deeper understanding of the properties of this family of repeats, in particular structural differences between repeats with different numbers of the given motif, may help in the design of therapy against diseases associated with uncontrolled expansion of TNRs.

Quadruplex is a structural motif occurring both in DNA and RNA, whose sequences are rich in guanine residues (10). The motif arises from at least two interacting layers of G-tetrad (four guanines connected by a network of hydrogen bonds, arranged in one plane). Quadruplexes are characterized by an unusual structural polymorphism and still there is a lack of data concerning their structure and dynamics. Structural studies of quadruplexes, using

technikę NMR, skupiają się głównie wokół cząsteczek DNA. W bazie danych RCSB PDB, do końca października 2014 roku, zdeponowanych zostało 100 struktur kwadrupleksów DNA i tylko 5 struktur kwadrupleksów RNA, ustalonych metodami spektroskopii NMR. Ta niewielka liczba poznanych z rozdzielczością atomową struktur, obrazuje zarówno poziom obecnej wiedzy, jak i ogromny potencjał dla tego typu badań.

Analiza bioinformatyczna ludzkiego genomu zidentyfikowała ponad 370 000 sekwencji potencjalnie zdolnych do tworzenia kwadrupleksów DNA, obecnych m.in. w telomerach, regionach promotorowych onkogenów, czy tzw. gorących miejscach mutacji, a także kwadrupleksów RNA: w obrębie intronów i innych fragmentów mRNA nie ulegających translacji, czy telomerowego RNA (11, 12). Dowiedziono zarówno ich istnienia *in vivo* jak i ich potencjału funkcjonalnego (13–16). Struktury kwadrupleksu obecne w ludzkim RNA uznane zostały za atrakcyjne cele przy projektowaniu leków, z drugiej strony wykazano szereg interesujących aktywności biologicznych krótkich oligonukleotydów o potencjale do tworzenia kwadrupleksów, w tym antynowotworową, czy antywirusową (17, 18). Dla przykładu, ważną funkcję odgrywa kwadrupleks RNA zbudowany z czterech powtórzeń GGA (8). Udowodniono, że cząsteczka ta jest aptamerem przeciwko białkowemu cząstkom zakaźnym związanym z gąbczastą encefalopatią bydła (tzw. chorobą szalonych krów). Kwadrupleks ten specyficznie łączy się zarówno z nieaktywnym białkiem prionowym, jak i z jego formą chorobotwórczą, posiadającą konformację β -harmonijki (19).

Przeprowadzona przeze mnie w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej analiza strukturalna przyczyni się do poznania i głębszego zrozumienia funkcji fragmentów RNA o zróżnicowanej długości zbudowanych z powtórzeń trinukleotydowych motywów AGG i UGG.

CEL PRACY

2. CEL PRACY

Głównym celem niniejszej dysertacji było ustalenie topologii kwadrupleksów RNA zbudowanych z trinukleotydowych powtórzeń AGG i UGG. Praca ta stanowi uzupełnienie badań strukturalnych cząsteczek RNA zbudowanych z powtórzeń CGG, które były prowadzone w Pracowni Biomolekularnego NMR IChB PAN w momencie rozpoczęcia przeze mnie studium doktoranckiego. W ten sposób zidentyfikowane zostały motywy strukturalne, charakterystyczne dla każdego rodzaju powtórzeń, a część uzyskanych przez nas wyników została opublikowana w 2014 roku w *Nucleic Acids Research*, w pracy pod tytułem „Distinctive structural motifs of RNA G-quadruplexes composed of AGG, CGG and UGG trinucleotide repeats” (20), stanowiącej załącznik nr 1 do niniejszej rozprawy doktorskiej.

W czasie realizacji przedstawianej rozprawy wykorzystałam różnorodny wachlarz technik pomiarowych, takich jak spektroskopia UV-Vis, CD, NMR, spektrometria mas oraz obrazowanie za pomocą mikroskopii konfokalnej. Większość z tych technik została opisana w pracy przeglądowej, opublikowanej w kwartalniku *BioTechnologia* w 2012 roku (21), stanowiącej załącznik nr 2 do niniejszej dysertacji. Nawiązałam również współpracę z dr Valérie Gabelica, w ramach akcji COST MP0802 (ang. *European Cooperation in Science and Technology*, europejskiej organizacji promującej międzynarodową współpracę pomiędzy sektorami naukowymi i technologicznymi). Otrzymałam dofinansowanie na zrealizowanie projektu badawczego „Stoichiometry and kinetics of RNA G-quadruplexes composed of AGG, CGG and UGG trinucleotide repeats” z wykorzystaniem techniki ESI-IMS-MS na University of Liège w Belgii. Rozpoczęłam również współpracę z Pracownią Analiz Struktur Subkomórkowych IChB PAN, dzięki której możliwe było zarejestrowanie widm ^1H NMR w ekstrakcie z komórek HeLa, przeprowadzenie eksperymentów transfekcji komórek HeLa cząsteczkami RNA zbudowanymi z powtórzeń AGG i UGG, oraz obrazowanie wyników z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego.

Poza ustaleniem topologii badanych przeze mnie kwadrupleksów w swoich badaniach postanowiłam zbadać wpływ jonów K^+ , Na^+ i NH_4^+ na strukturę kwadrupleksu. Interesowało mnie również, czy struktura kwadrupleksu, którą obserwuję w czasie badań metodami spektroskopii NMR jest taka sama, jak struktura występująca w próbkach poddanych badaniom UV-Vis, CD i ESI-

IMS-MS. W tym celu wykonałam pomiary widm ^1H NMR dla tych samych roztworów, które jednocześnie były wykorzystywane do pomiarów widm UV-Vis i CD, zawierających 0.01 mM RNA. Dodatkowo przygotowałam próbki zawierające jony NH_4^+ , które są stosowane do badań ESI-IMS-MS. Według mojej wiedzy są to pierwsze badania NMR wykonane dla próbek kwadrupleksów o tak niskim stężeniu RNA. Z uwagi na bardzo małą czułość metody NMR w porównaniu do metod UV-Vis, CD i ESI-IMS-MS, takie badania nie były dotychczas wykonywane. Należy dodać, że przeprowadzenie tych badań było możliwe dzięki otrzymanemu dofinansowaniu w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka w celu stworzenia IChB PAN w Poznaniu infrastruktury do kompleksowych badań strukturalnych biomolekuł. Od 2011 roku nasza pracownia wyposażona jest w wysokorozdzielczy spektrometr NMR 700 MHz z głowicą kriogeniczną, dzięki której czułość metody wzrosła czterokrotnie. Niemniej jednak, aby otrzymać widmo ^1H NMR o zadowalającym stosunku sygnału do szumu, jego pomiar trwał około 14 godzin.

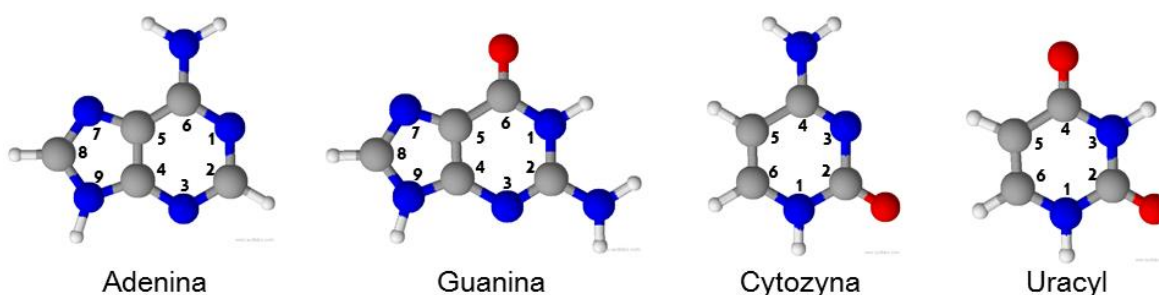
Postanowiłam także opracować metodę rejestracji widm NMR w warunkach najbardziej zbliżonych do warunków panujących w komórce, sprawdzić wpływ środowiska komórkowego na strukturę badanych przeze mnie kwadrupleksów oraz prześledzić, czy kwadrupleksy zbudowane z powtórzeń AGG i UGG mogą przenikać do wnętrza komórki, a jeśli tak, to jaka jest ich lokalizacja subkomórkowa.

WSTĘP LITERATUROWY

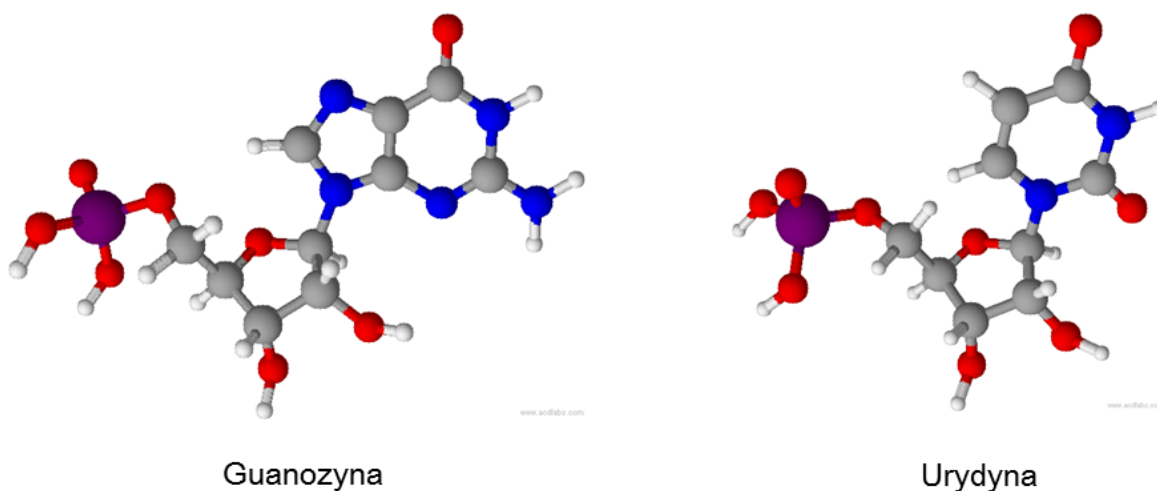
3. WSTĘP LITERATUROWY

3.1 RNA – budowa i konformacja

Kwas rybonukleinowy (RNA) jest biopolimerem zbudowanym z jednostek nukleotydowych. Nukleotyd składa się z heterocyklicznej zasady azotowej (są to pochodne puryny – adenina (A), guanina (G), lub pirymidyny – cytozyna (C) i uracyl (U) (Rys. 1), połączonej wiązaniem N-glikozydowym z atomem C1' reszty cukrowej (rybozy) oraz z grupy fosforanowej, przyłączonej do atomu O5' rybozy (Rys. 2). Poszczególne bloki budulcowe są połączone wiązaniem 5', 3'-fospodiestrowym.



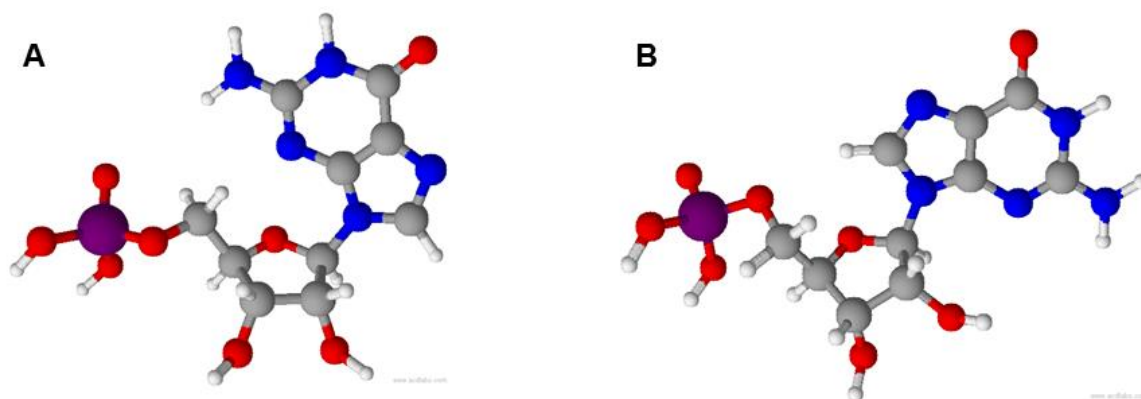
Rys. 1. Wzory strukturalne heterocyklicznych zasad azotowych wraz z numeracją atomów.



Rys. 2. Przykłady nukleotydów.

W zależności od ułożenia heterocyklicznej zasady azotowej względem pierścienia rybozy, wyróżnia się konformacje *syn* i *anti*. Konformacje te opisuje kąt torsyjny χ , definiowany jako kąt dwuścienny wyznaczony przez atomy O4'-C1'-N9-C4 (dla nukleotydów purynowych) lub O4'-C1'-N1-C2 (dla nukleotydów

pirymidynowych). Jeśli nad pierścieniem rybozy znajduje się atom C2 puryny lub atom N3 pirymidyny, to nukleotyd przyjmuje konformację *syn*, natomiast w konformacji *anti* nad pierścieniem rybozy znajduje się atom C8 puryny lub atom C6 pirymidyny (Rys. 3). Uprzywilejowaną konformacją zarówno reszt purynowych, jak i pirymidynowych jest konformacja *anti*.

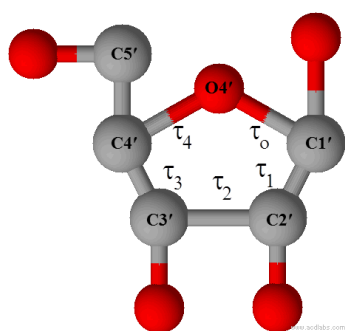


Rys. 3. Guanozyna w konformacji (A) *syn* i (B) *anti*.

Pięciocłonowy pierścień rybozy, zbudowany z czterech atomów węgla, C1', C2', C3', C4' i atomu tlenu O4' może przyjmować konformację typu półkrzesła (konformacja skręcona T, ang. *twist*) lub koperty (E, ang. *envelope*) (22). O konformacji typu półkrzesła, T, mówimy, gdy dwa spośród pięciu atomów rybozy są wychylone poza płaszczyznę, przy czym jeden atom znajduje się po tej samej stronie reszty cukrowej, co atom C5' (pozycja *endo*), a drugi po stronie przeciwnej (pozycja *egzo*) (Rys. 4). Z kolei, o konformacji typu koperty, E, mówimy, gdy tylko jeden atom jest wychylony z płaszczyzny pierścienia (Rys. 4). Każdy z wyżej wymienionych atomów może być wychylony z płaszczyzny pięciocłonowego pierścienia cukrowego zarówno w kierunku *endo*, jak i *egzo*, dzięki czemu, dla rybozy można wyróżnić 10 konformacji typu T i 10 konformacji typu E. Parametrami pozwalającymi poznać pofałdowanie pierścienia rybozy są: kąt fazowy pseudorotacji – *P*, opisujący typ konformacji cukru oraz amplituda pofałdowania cukru - τ_m , określająca maksymalny kąt pofałdowania pierścienia. Zależą one od pięciu endocyklicznych kątów torsyjnych, przedstawionych na rysunku 5.



Rys. 4. Konformacja rybozy typu półkrzesła (3T - C2'-egzo, C3'-endo) i typu koperty (2E - C2'-endo).



Symbol

τ_0

τ_1

τ_2

τ_3

τ_4

Kąt torsyjny

C4'-O4'-C1'-C2'

O4'-C1'-C2'-C3'

C1'-C2'-C3'-C4'

C2'-C3'-C4'-O4'

C3'-C4'-O4'-C1'

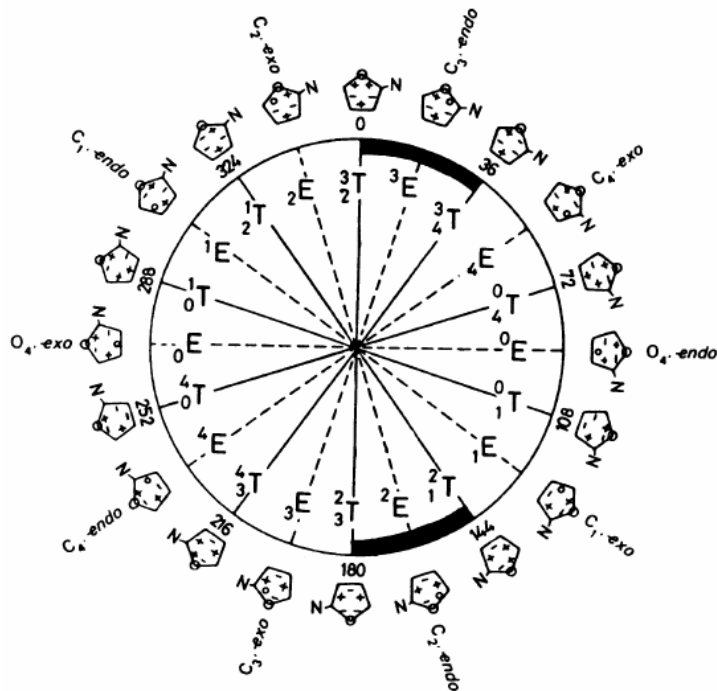
Rys. 5. Definicja kątów torsyjnych rybozy.

Parametry P oraz τ_m opisane są wzorami:

$$\tan P = \frac{(\tau_4 + \tau_1) - (\tau_3 + \tau_0)}{2 * \tau_2 * (\sin 36^\circ + \sin 72^\circ)}$$

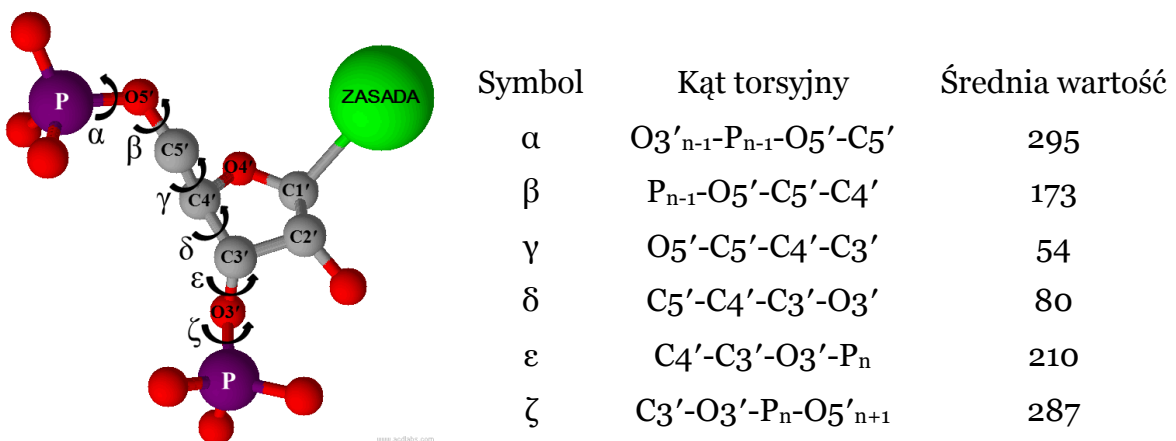
$$\tau_m = \frac{\tau_2}{\cos P}$$

Kąt fazowy pseudorotacji może przyjmować wartość od 0° do 360° . Wszystkie możliwe konformacje rybozy typu T i E, uszeregowane według wartości kąta P tworzą tzw. koło pseudorotacji (Rys. 6). W kwasach nukleinowych obecność podstawników w pozycjach C1', C3' oraz C4' rybozy ogranicza jej przejścia konformacyjne. Z tego względu, dla kwasów nukleinowych preferowane są rotamery: C3'-endo, na kole pseudorotacji znajduje się w rejonie N (ang. *North*, wartości kąta P w zakresie $0^\circ - 36^\circ$), konformacja typowa dla struktury A-RNA i C2'-endo, znajdujący się w rejonie S (ang. *South*, wartości kąta P w zakresie $144^\circ - 180^\circ$), konformacja typowa dla B-DNA. Dla kwasów rybonukleinowych średnia wartość amplitudy pofałdowania cukru, τ_m , wynosi $\sim 35.2^\circ$.



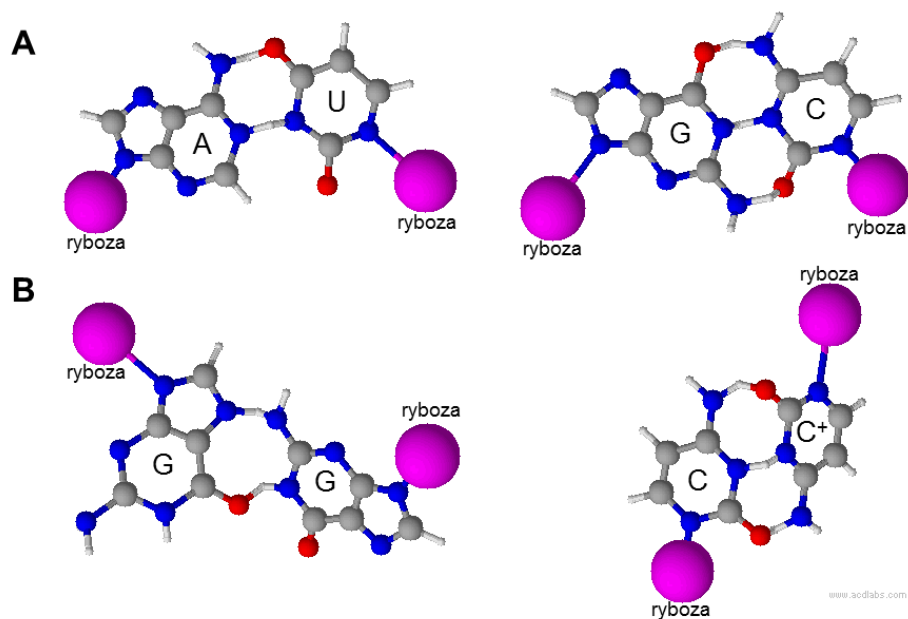
Rys. 6. Koło pseudorotacji, na którym zaznaczone zostały zakresy kątów fazowych P dla konformacji $C3'$ -endo i $C2'$ -endo, najbardziej uprzywilejowanych energetycznie, odpowiednio dla RNA i DNA (22).

Konformację łańcucha fosfodiesterowego określa sześć egzocyklicznych kątów torsyjnych, przedstawionych na rysunku 7. Ich średnie wartości wyznaczono na podstawie 27 struktur krystalograficznych A-RNA o rozdzielczości $< 1.9 \text{ \AA}$, zawierających jedynie kanoniczne pary zasad (23) (Rys. 7).

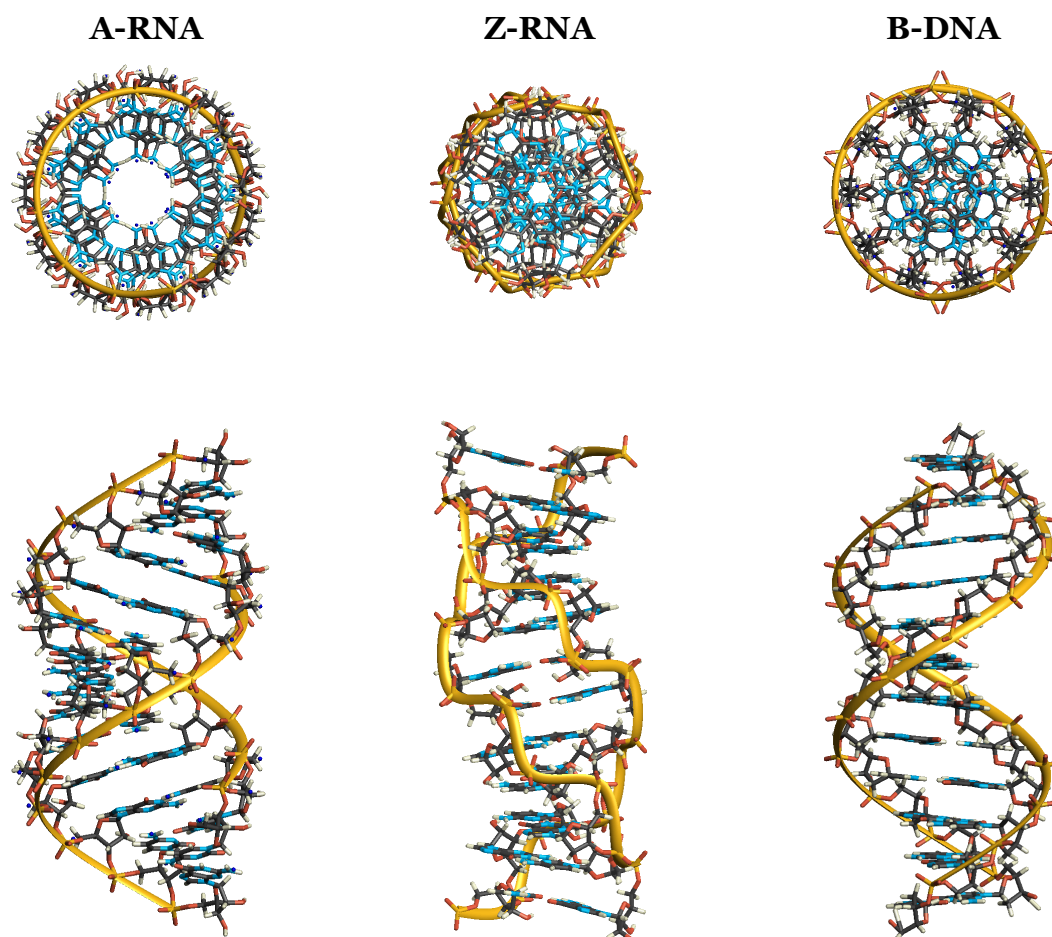


Rys. 7. Definicja kątów torsyjnych łańcucha fosfodiesterowego i ich średnie wartości (23).

Struktura podwójnej, prawoskrętnej helisy typu A-RNA powstaje przez hybrydyzację dwóch antyrównoległych nici, połączonych ze sobą wiązaniami wodorowymi, występującymi pomiędzy parami zasad azotowych. Kanoniczne pary zasad typu Watsona-Cricka zawiązują się pomiędzy adeniną i uracylem oraz guaniną i cytozyną (Rys. 8 A). W ten sposób, hydrofobowe pierścienie zasad heterocyklicznych są schowane wewnątrz struktury, a hydrofilowe łańcuchy fosfodiesterowe są skierowane na zewnątrz, dzięki czemu cząsteczki te są stabilne w hydrofilowym środowisku wewnątrzkomórkowym. Znana jest również nietypowa, lewoskrętna forma dwuniciowa, Z-RNA, która powstaje, gdy sekwencja RNA jest bogata w pary G:C i cząsteczka znajduje się w roztworze zawierającym duże stężenie soli (6M NaClO₄) (24). Porównanie dwuniciowych struktur RNA z typową helisą B-DNA zostało przedstawione na rysunku 9, a parametry opisujące poszczególne formy zebrane w Tabeli 1.



Rys. 8. (A) Kanoniczne pary zasad A:U i G:C typu Watsona-Cricka. (B) Niekanoniczne pary zasad G:G i C:C⁺ typu Hoogsteena.

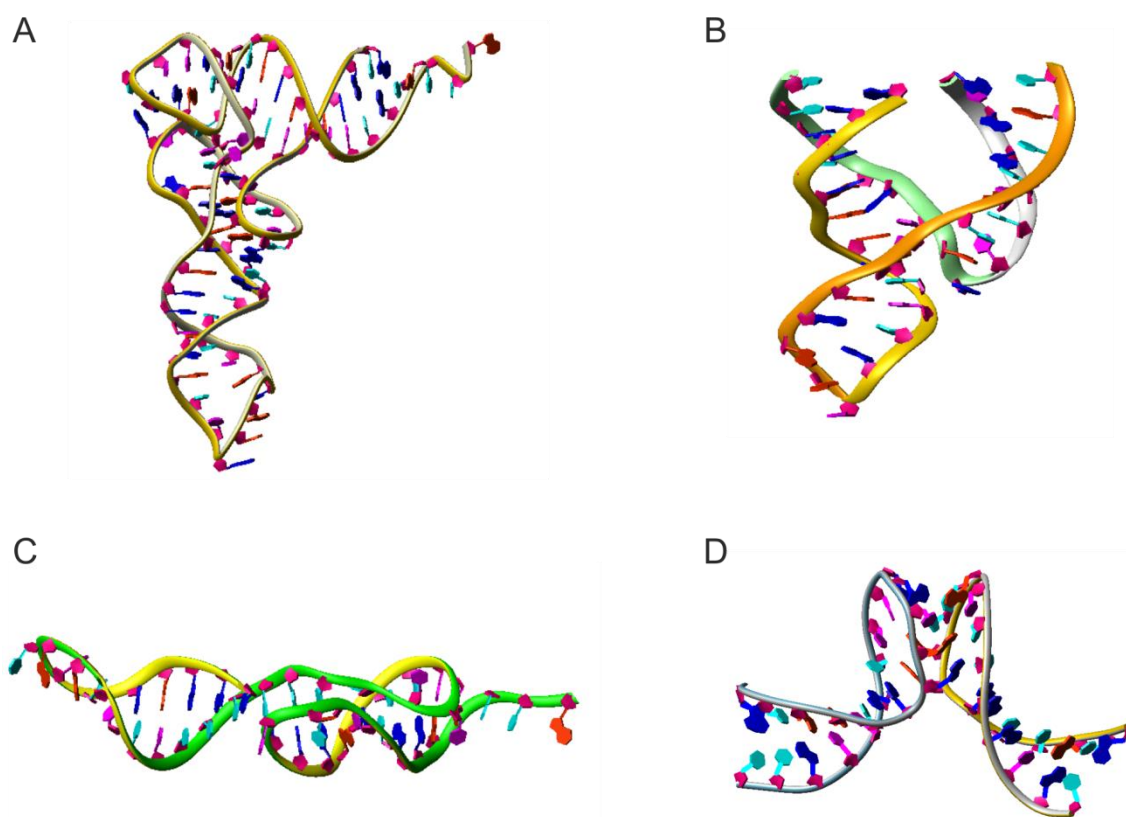


Rys. 9. Modele form A-RNA, Z-RNA i B-DNA (25).

Tabela 1. Parametry konformacyjne trzech form podwójnej helisy: A-RNA, Z-RNA i B-DNA (25).

Parametry strukturalne	A-RNA	Z-RNA	B-DNA
Kierunek skręcenia	prawoskrętna	lewoskrętna	prawoskrętna
Liczba nukleotydów na jeden skręt helisy	11	12.4	10
Skok helisy (wysokość jednego skrętu)	30.9 Å	40.9 Å	33.8 Å
Konformacja reszty cukrowej	C3'-endo	C3'-endo dla G C2'-endo dla C	C2'-endo
Kąt wokół wiązania N-glikozydowego	<i>anti</i>	<i>syn</i> dla G <i>anti</i> dla C	<i>anti</i>
Parametry dużej bruzdy szerokość głębokość	2.7 Å 13.5 Å	4.8 Å 4.9 Å	11.7 Å 8.5 Å
Parametry małej bruzdy szerokość głębokość	11.0 Å 2.8 Å	11.8 Å -2.9 Å	5.7 Å 7.5 Å

W środowisku komórkowym, w odróżnieniu od cząsteczki DNA, która występuje głównie w formie dwuniciowej helisy, cząsteczka RNA występuje najczęściej w formie jednoniciowej, która może się zwiijać, tworząc złożone struktury przestrzenne. Struktury te są stabilizowane nie tylko przez kanoniczne pary zasad typu Watsona-Cricka, ale również przez niekanoniczne pary zasad, m. in. typu Hoogsteena (Rys. 8 B). W strukturach RNA można wyróżnić różne motywy strukturalne. Najpowszechniej występującym jest motyw spinki do włosów (ang. *hairpin*). Jest on zbudowany z trzonu (ang. *stem*) – dwuniciowej helisy utworzonej przez dwie komplementarne sekwencje, występujące w jednej nici RNA, oraz pętli terminalnej (ang. *apical loop*) – kilkunukleotydowego fragmentu jednoniciowego łączącego dwa komplementarne fragmenty RNA. Bardzo często we fragmentach helikalnych RNA występują niesparowania (ang. *mismatch*), czego konsekwencją jest utworzenie takich motywów strukturalnych jak wybrzuszenia (ang. *bulge*), czy pętle wewnętrzne (ang. *internal loops*), które są kluczowe dla oddziaływań RNA-RNA, RNA-białko, czy RNA-ligand (25–30). Znane są również struktury zbudowane z trzech lub czterech nici. Wybrane przykłady trzeciorzędowych struktur RNA zostały przedstawione na rysunku 10.



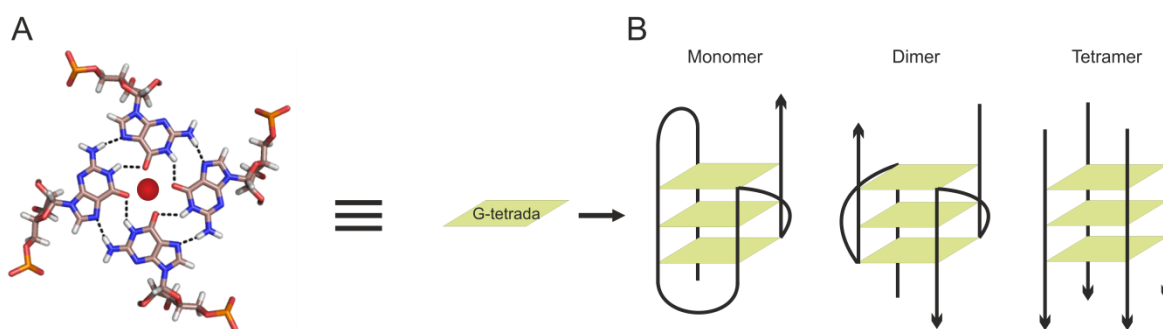
Rys. 10. Przykłady trzeciorzędowych struktur RNA (A) tRNA^{Phe}, (B) rybozym typu *hammerhead*, (C) pseudowęzeł oraz (D) struktura typu *kissing loop*.

Pomimo tego, że pod względem złożoności struktury RNA mogą niejednokrotnie konkurować z białkami, w bazie danych RCSB PDB, zdeponowano zaledwie 1110 struktur przestrzennych RNA i aż 96 153 struktur białek (październik 2014r.). Wskazuje to na stopień trudności badań strukturalnych cząsteczek RNA, związany zarówno z koniecznością uzyskania odpowiedniej jakości kryształów do badań metodami rentgenowskiej analizy strukturalnej, jak również ze złożonością analizy wysokorozdzielczych widm NMR większych fragmentów RNA.

3.2 Struktura i funkcja G-kwadrupleksów

3.2.1. Budowa G-kwadrupleksów

Kwadrupleks jest motywem strukturalnym tworzonym zarówno przez cząsteczki DNA, RNA, jak i ich modyfikowane warianty, np. LNA (ang. *Locked Nucleic Acid*) i PNA (ang. *Peptide Nucleic Acid*) (31–35). Podstawową jednostką budulcową G-kwadrupleksu są co najmniej dwie oddziałujące warstwowo G-tetrazy. Każda reszta guanozyny w obrębie G-tetrazy jest donorem dwóch wiązań wodorowych typu Watsona-Cricka oraz akceptorem dwóch wiązań wodorowych typu Hoogsteena (Rys. 11 A). W ten sposób karbonylowe atomy tlenu są skierowane do wnętrza struktury kwadrupleksu, tworząc specyficzny, ujemnie naładowany kanał, w którym zostają skoordynowane kationy metali. W zależności od rozmiaru kationów, mogą one być umiejscowione zarówno w płaszczyźnie G-tetrazy (np. Na^+), jak również pomiędzy dwiema G-tetradami (np. K^+), koordynując odpowiednio cztery lub osiem karbonylowych atomów tlenu (Rys. 12) (36). Kationy te mają fundamentalne znaczenie zarówno dla topologii powstającej struktury, jak również dla jej stabilności, która wzrasta wraz ze wzrostem promienia jonowego kationu metalu, $\text{Li}^+ < \text{Na}^+ < \text{K}^+$ (37).



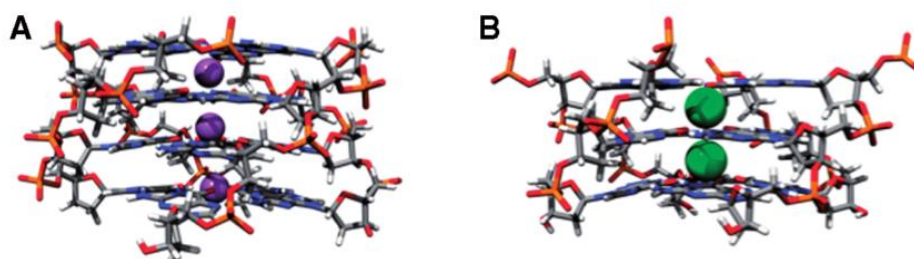
Rys. 11. (A) G-tetrad z zaznaczonymi ośmioma wiązaniami wodorowymi i skoordynowanym jonem metalu. (B) Przykładowe modele kwadrupleksu jedno-, dwu- i czteroniciowego.

W zależności od liczby nici zaangażowanych w utworzenie tego motywu strukturalnego, można wyróżnić kwadrupleksy jedno-, dwu- lub czterocząsteczkowe (Rys. 11 B). Ze względu na możliwość występowania różnej kierunkowości nici, konformacji *syn* lub *anti* reszt guanozyny oraz sposób ułożenia pętli łączących poszczególne G-tetrazy, G-kwadrupleksy charakteryzują się niezwykle polimorfizmem strukturalnym.

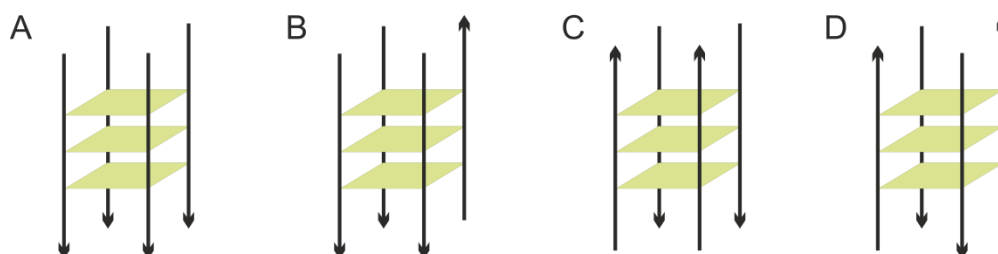
Ułożenie nici względem siebie warunkuje rodzaj powstającej struktury. Kwadrupleks równoległy powstaje, gdy wszystkie cztery nici są zorientowane w tym samym kierunku (Rys. 13 A). Wyróżniamy trzy rodzaje kwadrupleksów antyrównoległych: kwadrupleks typu (3+1), inaczej nazywany hybrydowym, powstaje, gdy trzy nici są skierowane w jednym kierunku, a czwarta nić jest skierowana przeciwnie (Rys. 13 B); kwadrupleks antyrównoległy typu góra-góra-dół-dół, jest to taki kwadrupleks, w którym dwie przyległe nici skierowane są w tym samym kierunku i dwie pozostałe w przeciwnym (Rys. 13 C) oraz kwadrupleks antyrównoległy typu góra-dół-góra-dół, w którym dwie naprzemianległe nici są zorientowane w tym samym kierunku, a dwie pozostałe w przeciwnym (Rys. 13 D). Na kierunkowość nici, a co za tym idzie także na rodzaj powstającego kwadrupleksu ma bezpośredni wpływ konformacja reszt guanozyny tworzących G-tetradę. Kwadrupleks równoległy powstaje, gdy w poszczególnych G-tetradach wszystkie reszty guanozyny przyjmują tę samą konformację – *syn* lub *anti*. W tym miejscu należy podkreślić, że w kwadrupleksach DNA reszta deoksyguanozyny występuje zarówno w konformacji *syn*, jak i *anti*, natomiast reszta guanozyny we wszystkich znanych dotychczas kwadrupleksach RNA występuje wyłącznie w konformacji *anti*. Taką konformację wokół wiązania N-glikozydowego wymusza zawada steryczna wynikająca z konformacji C3'-endo reszty rybozy, będąca wynikiem obecności grupy hydroksylowej w pozycji C2'. Stąd też wszystkie poznane dotąd struktury niemodyfikowanych kwadrupleksów RNA posiadają równoległe ułożenie nici. W kwadrupleksach antyrównoległych konformacja reszt guanozyny zależy od typu struktury. Antyrównoległy kwadrupleks hybrydowy posiada w obrębie G-tetrady jedną guanozynę w konformacji *syn*, a pozostałe w konformacji *anti* lub jedną resztę w konformacji *anti*, a pozostałe w konformacji *syn*. Następnie, G-tetradę antyrównoległego kwadrupleksu typu góra-góra-dół-dół jest zbudowana z dwóch sąsiadujących reszt guanozyny w tej samej konformacji *syn* lub *anti* i dwóch pozostałych w konformacji, odpowiednio *anti* lub *syn*, a G-tetradę antyrównoległego kwadrupleksu typu góra-dół-góra-dół jest utworzona przez reszty guanozyny posiadające naprzemiennie konformacje *syn* i *anti*.

Reszty nukleotydowe łączące poszczególne G-tetradę tworzą tzw. pętle. W strukturach kwadrupleksów wyróżnia się cztery rodzaje pętli:

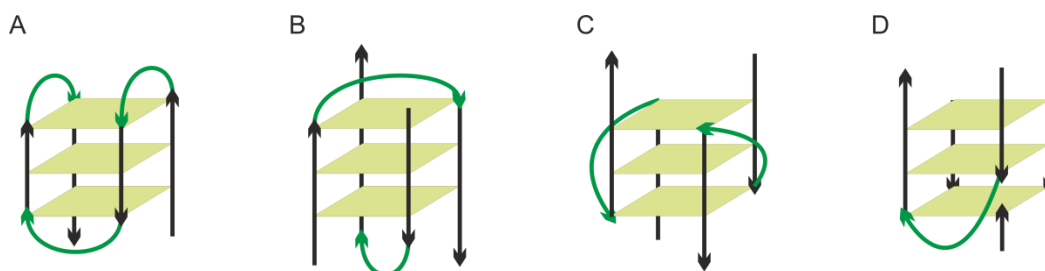
- pętla boczna (ang. *lateral loop* lub *edge wise loop*) łączy dwie przyległe, antyrównoległe nici (Rys. 14 A),
- pętla przekątna lub diagonalna (ang. *diagonal loop*) łączy dwie przeciwległe, antyrównoległe nici (Rys. 14 B),
- pętla zewnętrzna (ang. *external loop*, *propeller loop* lub *double-chain reversal loop*) łączy dwie sąsiednie, równoległe nici (Rys. 14 C),
- pętla w kształcie litery V (ang. *V-shaped loop*) łączy dwa wierzchołki sąsiednich G-tetrad, w których jedna z reszt guanozyny pozbawiona jest wsparcia w postaci łańcucha faszodiestrowego (Rys. 14 D).



Rys. 12. (A) Struktura kwadrupleksu DNA o sekwencji d(TGGGGT) ze skoordynowanymi kationami sodu. (B) Struktura kwadrupleksu DNA o sekwencji d(A(GGGTTA)₃GGG) ze skoordynowanymi kationami potasu (reprodukcja za zgodą © Oxford University Press) (38).



Rys. 13. Schematyczne modele czteroniciowego kwadrupleksu (A) równoległego, (B) antyrównoległego typu hybrydowego, (C) antyrównoległego typu góra-góra-dół-dół, (D) antyrównoległego typu góra-dół-góra-dół. Strzałki reprezentują orientację nici od końca 5' do 3'.



Rys. 14. Schematyczne przedstawienie pętli (A) bocznej, (B) przekątnej, (C) zewnętrznej i (D) w kształcie litery V.

Najwięcej struktur kwadrupleksów poznano dla cząsteczek w serii DNA. Do końca października 2014 r. w bazie danych RCSB PDB znajdowało się 128 struktur kwadrupleksów DNA (w tym 100 ustalonych za pomocą metod spektroskopii NMR) i jedynie 12 struktur kwadrupleksów RNA (w tym 5 określonych za pomocą metod spektroskopii NMR). Wykaz struktur kwadrupleksów DNA i RNA, poznanych z rozdzielczością atomową, bez uwzględnienia struktur kompleksów typu kwadrupleks-ligand, zestawiałam w tabelach 2 i 3.

Tabela 2. Wykaz struktur kwadrupleksów, zdeponowanych w bazie danych PDB, ustalonych metodami spektroskopii NMR (stan na październik 2014r.)

Lp.	PDB ID	Sekwencja	Rok
Kwadrupleksy RNA			
1	2M18	r(GGGUUAGGGU)	(39) 2013
2	2RQJ	r(GGAGGAGGAGGA)	(8) 2009
3	2KBP	r(UAGGGUUAGGGU)	(40) 2009
4	1MY9	r(GGAGGUUUUGGAGG)	(41) 2003
5	1RAU	r(UGGGGU)	(42) 1992
Kwadrupleksy DNA			
1	2M6W	d(GGGGTTGGGGTTTTGGGGAAGGGG)	2014
2	2M6V	d(GGGTTGGGTTTTGGGTGGG)	2014
3	2MB4	d(AGGGGGGAGGGAGGGTGG)	2014
4	2M27	d(CGGGGCGGGCCTTGGGCGGGGT)	2013
5	2MBJ	d(TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTA ^(BrG) GGTTA)	2013
6	2M8Z	d(GGTTGGCGCGAAGCATTTCGCGGGTTGG)	2013
7	2M90	d(GCGCGAAGCATTTCGCGGGGAGGTGGGGAAGGG)	2013
8	2M91	d(GGGAAGGGCGCGAAGCATTTCGCGAGGTAGG)	2013
9	2M92	d(AGGGTGGGTGCTGGGGCGCGAAGCATTTCGCGAGG)	2013
10	2M93	d(TTGGGTGGGCGCGAAGCATTTCGCGGGGTGGGT)	2013
11	2M4P	d(TTGTGGTGGGTGGGTGGGT)	2013
12	2M1G	d(TAGGGTTA(GFL)GGT); GFL-2'-fluoro-2'-deoksyguanozyna	2013
13	1LXQ	d(TAGGGTGGGTGGGTGGGGAAT)	2012
14	2LXV	d(GGGTGGGTGGGTGGG)	2012
15	2LK7	d(TTGGGTGGGTGGGTGGGT)	2012
16	2LED	d(TAGGGCGGGAGGGAGGGAA)	2012
17	2LEE	d(TAGGGCGGGAGGGAGGGAA)	2012
18	2LOD	d(GGGATGGGACACAGGGGACGGG)	2012
19	2LPW	d(AAGGGTGGGTGTAAGTGTGGGTGGGT)	2012
20	2LBY	d(TAGGGAGGGTAGGGAGGGT)	2012
21	2LE6	d(GIGTGGGTGGGTGGGT); I-inozyna	2011
22	2LD8	d(TAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG)	2011
23	2L88	d(GGGGCGGGGCGGGGCGGGGT)	2011
24	2KZD	d(AGGGIAGGGGCTGGGAGGGC); I-inozyna	2010

25	2KZE	d(AIGGGAGGGICTGGGAGGGC); I-inozyna	2010
26	2KYO	d(CGGGCGGGCGCGAGGGAGGGT)	2010
27	2KYP	d(CGGGCGGGCGCTAGGGAGGGT)	2010
28	2KPR	d(GGGTGGGGAAGGGGTGGGT)	2010
29	2KKA	d(AGGGTTAGGGTTAIGGTTAGGGT); I-inozyna	2009
30	2KQG	d(CGGGCGGGCACGAGGGAGGGT)	2009
31	2KQH	d(CGGGCGGGCGCGAGGGAGGGT)	2009
32	2WCN	d(G ^L GG ^L GTTTTG ^L GG ^L G); L-reszty typu LNA	2009
33	2KOW	d(TAGGGTAGGGTAGGGTAIGG); I-inozyna	2009
34	2KM3	d(AGGGCTAGGGCTAGGGCTAGGG)	2009
35	2K8Z	d(TCGTTGCT)	2009
36	2K90	d(TGCTTCGT)	2009
37	2K97	d(pCGCTCCGT)	2009
38	2KF7	d(GGGTTA ^(BrG) GGTTAGGGTTAGGGT)	2009
39	2KF8	d(GGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGT)	2009
40	2KAZ	d(GGGACGTAGTGGG)	2008
41	2JSL	d(TAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTT)	2008
42	2JSQ	d(TAGGGTTAGGGTTA ^(BrG) GGTTAGGGTT)	2008
43	2JSK	d(TAGGGTTAGGGTTAG ^(BrG) GTTAGGG)	2008
44	2JSM	d(TAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG)	2008
45	2E4I	d(A ^(BrG) GGTTA ^(BrG) GGTTA ^(BrG) ^(BrG) GTTA ^(BrG) GG)	2007
46	2JPZ	d(TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTT)	2007
47	2O3M	d(AGGGAGGGCGCTGGGAGGAGGG)	2007
48	2HY9	d(AAAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGAA)	2007
49	2HK4	d(pCCGTCCGT)	2007
50	2IDN	3'-d(GGT)-5'-5'-d(TGGTGTGGTTGG)-3'	2007
51	1F8U	d(GGGCGCGGGAGGAATTGGGCGGG)	2006
52	2GKU	d(TTGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGGA)	2006
53	2CHJ	d(TG ^L GG ^L GT); L-reszty typu LNA	2006
54	2CHK	d(T ^L G ^L G ^L G ^L GT); L-reszty typu LNA	2006
55	2AQY	d(GIGTTAGGGTTAGGGT); I-inozyna	2006
56	2AKG	d(GGGGTTTTGGGG)	2005
57	2A5P	d(TGAGGGTGGIGAGGGTGGGGAAGG); I-inozyna	2005
58	1XCE	d(GCGGTTGGAT)	2005
59	1XAV	d(TGAGGGTGGGTAGGGTGGGTAA)	2005
60	1Y8D	d(GGGGTGGGAGGAGGGT)	2005
61	1U64	d(GGGTTTTGGGG)	2004
62	1NYD	d(GCGGTTGGAT)	2004
63	1OZ8	d(GGAGGAGGAGGAGGAGGAGGA)	2004
64	1RDE	d(GGTTGGTGTGGTTGG)	2003
65	1NP9	d(TTAGGGT)	2003
66	1N96	d(pCGCTCATT)	2003
67	1MYQ	d(GGAGGAGGAGGA)	2002
68	1LVS	d(GGGGTTTTGGGG)	2002
69	1JVC	d(GAGCAGGT)	2001
70	1JJP	d(GGGAGGTTTGGGAT)	2001
71	1I34	d(GGTTTTGGCAGGGTTTTGGT)	2001
72	1EU2	d(pTGCTCGCT)	2001
73	1F3S	d(GGGTTCAGG)	2000
74	1EVM	d(AGGGT)	2000
75	1EVN	d(AGGGT)	2000

76	1EVO	d(TGGGCGGT)	2000
77	1EMQ	d(TGGTGGC)	2000
78	1EEG	d(GGAGGA)	2000
79	1D6D	d(AAGGTTTTAAGG)	2000
80	1C38	d(GGTTGGTGTGGTTGG)	1999
81	1C32	d(GGTTGGTGTGGTTGG)	1999
82	1C34	d(GGTTGGTGTGGTTGG)	1999
83	1C35	d(GGTTGGTGTGGTTGG)	1999
84	1K4X	d(GGGGTTTTGGGG)	1999
85	1A8N	d(GGGCTTTTGGGC)	1998
86	1A8W	d(GGGCTTTTGGGC)	1998
87	1A6H	d(GCGGTTTGCGG)	1998
88	1AFF	d(TAGG)	1997
89	1FQP	d(GGGTTTTGGG)	1997
90	1QDF	d(GGTTGGTGTGGTTGG)	1996
91	1QDH	d(GGTTGGTGTGGTTGG)	1996
92	1QDI	d(GGGGTTTTGGGG)	1996
93	1QDK	d(GGGGTTTTGGGG)	1996
94	230D	d(GGGGTUTUGGGGTTTTGGGGUUTTGGGI)	1995
95	201D	d(GGGGTTTTGGGGTTTTGGGGTTTTGGGG)	1995
96	143D	d(AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG)	1994
97	148D	d(GGTTGGTGTGGTTGG)	1994
98	156D	d(GGGGTTTTGGGG)	1994
99	139D	d(TTGGGGT)	1994
100	186D	d(TTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGG)	1994

Tabela 3. Wykaz struktur kwadrupleksów, zdeponowanych w bazie danych PDB, rozwiązanych za pomocą rentgenowskiej analizy strukturalnej (stan na październik 2014r.)

Lp.	PDB ID	Sekwencja	Rok
Kwadrupleksy RNA			
1	3IBK	r(^{Br} UAGGGUUAGGGU)	(43) 2010
2	2GRB	d(^{Br} U)r(GIGGU)	(44) 2006
3	2AWE	rU(d ^{Br} G)r(GUGU)	(45) 2006
4	1J6S	d(^{Br} U)r(GAGGU)	(46) 2003
5	1MDG	rU(d ^{Br} G)r(AGGU)	(47) 2003
6	1P79	rU(d ^{Br} G) r(UGGU)	(48) 2003
7	1J8G	(UGGGGU)	(49) 2001
Kwadrupleksy DNA			
1	4H29	d(GGGCGGGGAGGGGGAAGGGA)	2013
2	3QXR	d(AGGGAGGGCGC(^{Br} U)GGGAGGAGGG)	2012
3	2GWE	d(GGGGTTTTGGGG)	2007
4	2GWQ	d(GGGGTTTTGGGG)	2007
5	2O4F	d(TGGGGT)	2007
6	2GWO	d(TGGGGT)	2007
7	2HBN	d(GGGGTTTTGGGG)	2006

8	2AVH	d(GGGGTTTGGGG)	2006
9	2AVJ	d(GGGG ^(BrU) TTGGGG)	2006
10	1V3N	d(G ^(BrC) GAGAGC)	2004
11	1V3O	d(G(IC)GAGAGC); IC-5-jodocytydyna	2004
12	1V3P	d(G(IC)GAGAGC); IC-5-jodocytydyna	2004
13	1OZ8	d(GGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGA)	2004
14	1S45	d(TGGGGT)	2004
15	1S47	d(TGGGGT)	2004
16	1QYK	d(GCATGCT) Ba ²⁺	2003
17	1QYL	d(GCATGCT) V ³⁺	2003
18	1QZL	d(GCATGCT) Co ²⁺	2003
19	1R2O	d(GCATGCT) Ni ²⁺	2003
20	1MF5	d(GCATGCT) Co ²⁺	2003
21	1JPQ	d(GGGG ^(BrU) TTTGGGG)	2002
22	1JRN	d(GGGGTTTTGGGG)	2002
23	1K8P	d(^(BrU) AGGG ^(BrU) TAGGGT)	2002
24	1KF1	d(AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG)	2002
25	352D	d(TGGGGT)	1997
26	184D	d(GCATGCT)	1995
27	244D	d(TGGGGT)	1995
28	1D59	d(GGGGTTTTGGGG)	1993

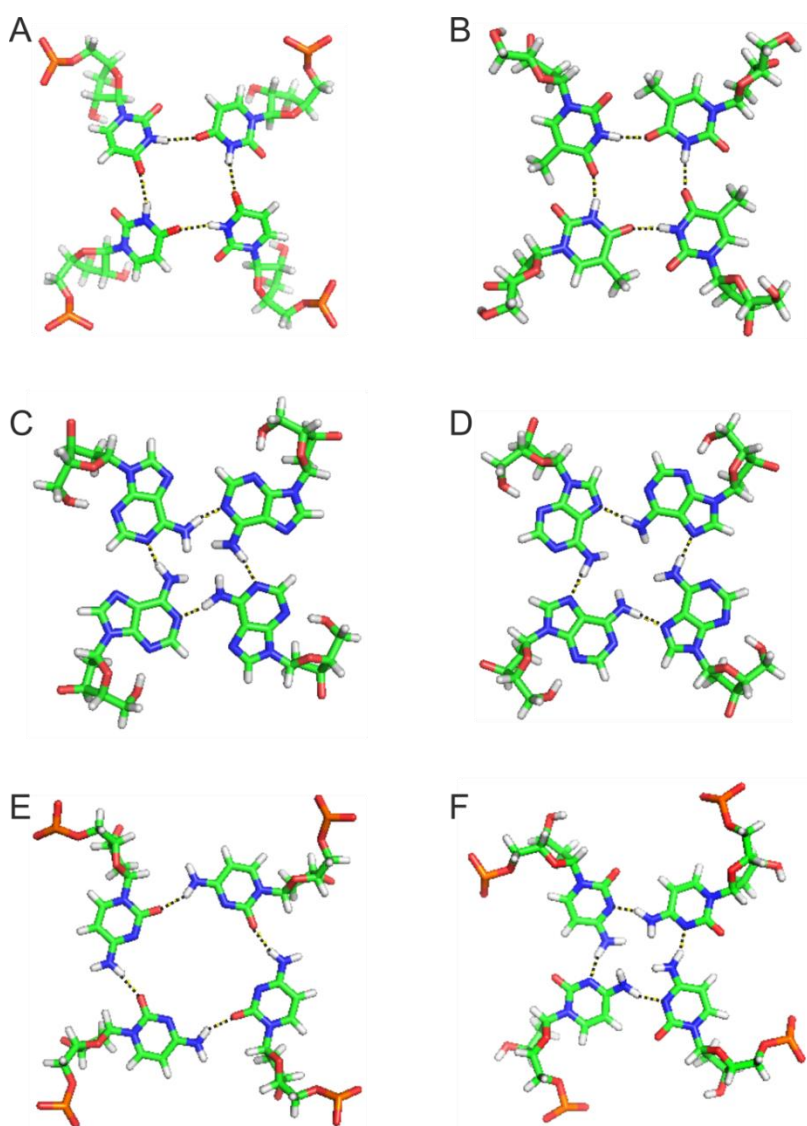
Ta mała liczba poznanych z rozdzielczością atomową struktur kwadrupleksów RNA, wynika przede wszystkim z trudności otrzymania jednorodnego kryształu lub dobrej jakości widm NMR. Ponadto, w przypadku badań NMR, ograniczenie stanowi również konieczność uzyskania pojedynczej konformacji kwadrupleksu w roztworze, czy handlowa niedostępność fosforynoamidów RNA, znakowanych izotopami ¹⁵N, ¹³C, których użycie znacznie przyspiesza proces przypisania sygnałów w widmach NMR (Rozdział 3.3.1). Niemniej jednak, jak pokazuje historia, pomimo tego, że pierwsze doniesienia na temat samoorganizacji guanozyny pojawiły się już w 1910 roku (50), badania nad kwadrupleksami zostały zintensyfikowane dopiero po tym, jak w 1988 roku R.K. Moyzis, i inni, odkryli, że ludzkie sekwencje telomerowe są bogate w reszty guanozyny i zawierają tandemowe powtórzenia d(TTAGGG) (51), a Y. Wang i D.J. Patel udowodnili w 1993 roku, stosując metody NMR, że cząsteczka zbudowana z czterech powtórzeń ludzkiej sekwencji telomerowej tworzy strukturę G-kwadrupleksu (52). W 2013 roku zespół badawczy profesora S. Balasubramaniana dostarczył jednoznacznych dowodów na występowanie zarówno kwadrupleksów DNA, jak i RNA w ludzkich komórkach *in vivo* (13, 14). Dokonali tego stosując przeciwciała oraz ligandy aktywne fluorescencyjnie, które selektywnie wiążą się

do struktur kwadrupleksów. Jestem przekonana, że od tego momentu więcej grup badawczych podejmie trudne wyzwanie ustalenia struktury przestrzennej kwadrupleksów RNA, ponieważ, jak wiadomo, poznanie i wyjaśnienie funkcji biologicznej danej cząsteczki jest łatwiejsze, gdy znana jest jej struktura przestrzenna.

3.2.2. Nietypowe motywy strukturalne kwadrupleksów

Analiza zdeponowanych w bazie danych RCSB PDB struktur G-kwadrupleksów DNA i RNA ukazała ich niezwykle różnorodność. Okazuje się, że oprócz występowania czterech rodzajów pętli łączących G-tetrazy, w skład kwadrupleksów wchodzi również nietypowe motywy strukturalne, takie jak nieguanozynowe homotetrazy oraz mieszane tetrazy, pentady, heksady, heptady, czy nawet oktady. Już w pierwszej strukturze kwadrupleksu RNA, określonej w 1992 roku dla cząsteczki o sekwencji r(UGGGGU), zidentyfikowano tworzenie się stabilnej U-tetrazy na końcu 3' oraz znacznie mniej stabilnej U-tetrazy na końcu 5' (42). Tetradą tą jest stabilizowana przez wiązania wodorowe, powstające pomiędzy atomem wodoru grupy iminowej N3H jednej reszty urydyny i atomem tlenu O4 następnego reszty (Rys. 15 A). Powstawanie tego motywu strukturalnego zaobserwowano na końcu 3' większości struktur kwadrupleksów RNA, rozwiązanych przy pomocy rentgenowskiej analizy strukturalnej (36 – 41). Jak dotąd, dla kwadrupleksów RNA nie zaobserwowano występowania nieterminalnych U-tetrad. W strukturach kwadrupleksów DNA znaleziono analogiczne tetrazy zbudowane z reszt tymidyny (Rys. 15 B). W przeciwieństwie do U-tetrazy, T-tetrazy powstają zarówno na końcach 5' oraz 3' (53, 54, 34), jak również wewnątrz struktury kwadrupleksu (55–57). Pozostałe dwie reszty nukleotydowe, adenozyne oraz cytydina, także są zdolne do tworzenia motywu homotetrazy. W strukturze kwadrupleksu tworzonego przez cząsteczkę DNA o sekwencji d(AGGGT), za pomocą metod spektroskopii NMR, zidentyfikowano dwa typy A-tetrazy, znajdujące się w szybkiej wymianie (58). W obu przypadkach reszty adenozyne tworzące tetradę były w konformacji *syn*. Jedną z tetrad była stabilizowana przez wiązania wodorowe powstające pomiędzy atomem wodoru grupy aminowej N6H jednej reszty a atomem azotu N1 drugiej reszty adenozyne (Rys. 15 C). Reszty adenozyne tworzące drugi rodzaj A-tetrazy były połączone wiązaniami wodorowymi pomiędzy atomem N6H jednej reszty a atomem N7

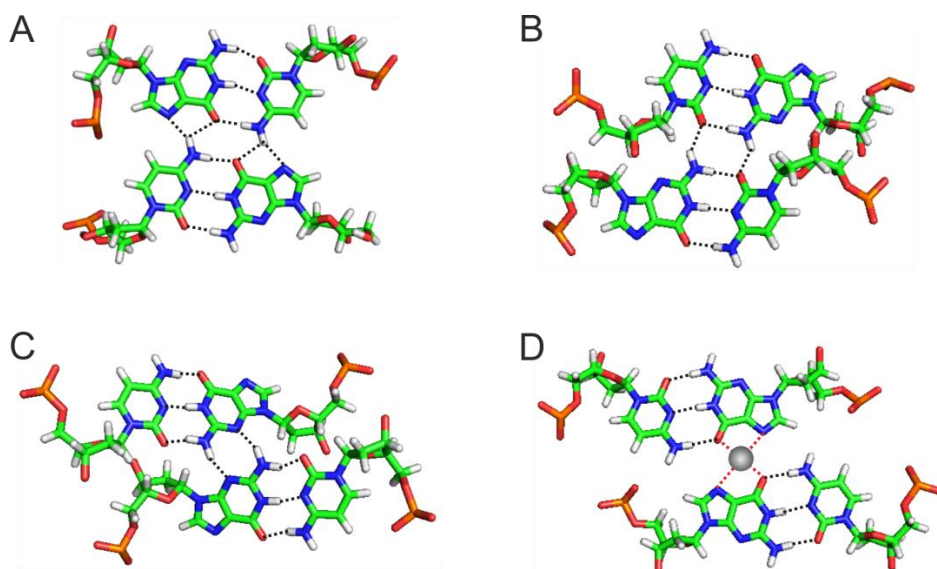
drugiej reszty (Rys. 15 D). Podobnie do A-tetrazy, C-tetrada również może być stabilizowana przez dwa rodzaje wiązań wodorowych. W strukturze czteroniciowego, równoległego kwadrupleksu DNA o sekwencji d(TGGGCGGT) zidentyfikowano wiązania wodorowe pomiędzy atomem wodoru grupy aminowej N4H jednej reszty a atomem tlenu O2 kolejnej reszty tworzącej C-tetradę (Rys. 15 E) (59). Inny typ wiązania wodorowego zaobserwowano dla czteroniciowego, równoległego kwadrupleksu utworzonego przez cząsteczkę DNA o sekwencji d(TGGTGGC). Wiązanie powstaje pomiędzy grupą aminową jednej reszty a atomem N3 kolejnej reszty cytydyny (Rys. 15 F) (55).



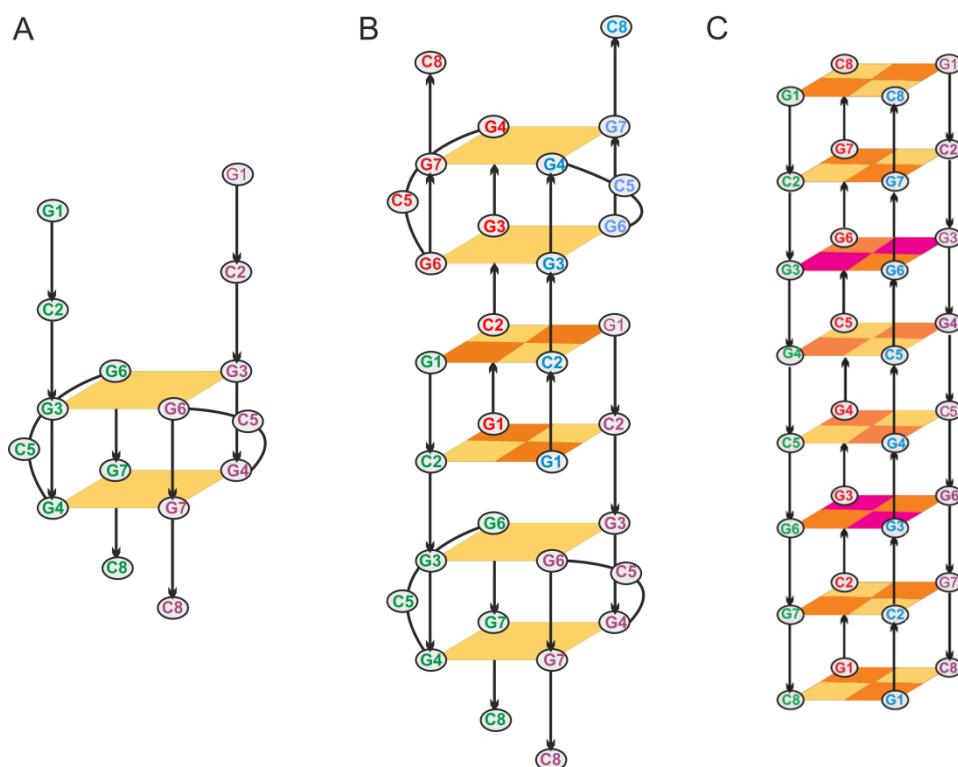
Rys. 15. Przykłady homotetrad. (A) U-tetrada, PDB ID: 1RAU; (B) T-tetrada, PDB ID: 1EMQ; (C) A-tetrada, PDB ID: 1EVM; (D) A-tetrada, PDB ID: 1EVN; (E) C-tetrada, PDB ID: 1EMQ; (F) C-tetrada, PDB ID: 1EVO. Kolorem czarnym zostały zaznaczone wiązania wodorowe stabilizujące poszczególne tetrazy.

Sekwencje kwasów nukleinowych bogate w reszty guanozyny i cytydyny zazwyczaj tworzą struktury zawierające kanoniczne pary zasad typu Watsona-Cricka. Z analizy struktur kwadrupleksów wynika, że pary G:C są zdolne do asocjacji prowadzącej do powstania mieszanej tetrady G:C:G:C. W zależności od sposobu asocjacji, takie tetrady mogą być stabilizowane przez różną sieć wiązań wodorowych, co jest przedstawione na rysunku 16 A-C. Przykładem mieszanej tetrady typu G:C:G:C jest tetradą powstała przez oddziaływanie elektrostatyczne pomiędzy dwiema parami G:C a kationem potasu (Rys. 16 D), zidentyfikowana dla antyrównoległego kwadrupleksu tworzonego przez cząsteczkę DNA o sekwencji d(AGGG(CTAGGG)₃) (60). W naszej pracowni dr Dorota Gudanis prowadziła badania dotyczące równowag konformacyjnych cząsteczek RNA zbudowanych z powtórzeń CGG (61). Okazało się, że cząsteczki zbudowane z dwóch powtórzeń CGG są zdolne do tworzenia struktury kwadrupleksu zawierającego tetradę G:C:G:C w obecności kationów potasu i sodu. Cząsteczka r(GCGGCGGC) tworzy strukturę kwadrupleksu w wyniku dimeryzacji dwuniciowych podjednostek kwadrupleksów zbudowanych z dwóch G-tetrad, zawierających niesparowane reszty G1 i C2 na końcu 5' (Rys. 17 A). Dwie podjednostki łączą się na zasadzie ząbienia niesparowanych końców 5', co prowadzi do utworzenia dwóch tetrad G:C:G:C (Rys. 17 B). Interesujący wynik dr Dorota Gudanis otrzymała dla cząsteczki o sekwencji r(GC^{Br}GGCGGC), w której jedna z reszt guanozyny została zastąpiona 8-bromoguanozyną (BrG), której uprzywilejowaną konformacją, z uwagi na objętościowy podstawnik w pozycji C8, jest forma *syn* (dane niepublikowane). Wykazała mianowicie, że utworzony przez tą cząsteczkę antyrównoległy dupleks, zawierający niesparowania typu G:G dimeryzuje, w wyniku czego powstaje czteroniciowy, antyrównoległy kwadrupleks zbudowany z dwóch tetrad G:BrG:G:BrG i aż sześciu mieszanych tetrad G:C:G:C (Rys. 17 C).

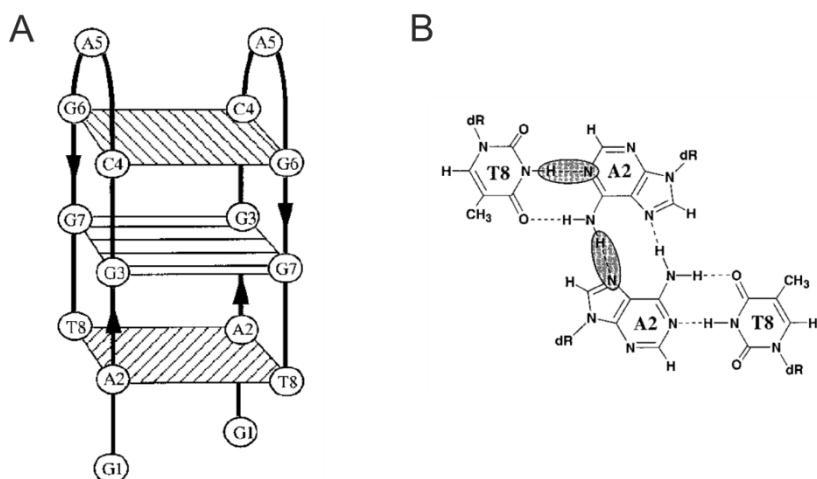
Jak się okazuje, nie tylko pary G:C, ale również pary A:T są zdolne do tworzenia mieszanej tetrady. Zidentyfikowano ją w strukturze kwadrupleksu DNA o sekwencji d(GAGCAGGT). Struktura ta jest złożona z trzech rodzajów tetrad: klasycznej G-tetrady, mieszanych tetrad G:C:G:C i A:T:A:T, oraz dwóch pętli bocznych (Rys. 18 A) (62). Tetradą A:T:A:T jest zbudowana z dwóch kanonicznych par A:T typu Watsona-Cricka, które dimeryzują poprzez utworzenie dodatkowych wiązań wodorowych typu Hoogsteena pomiędzy dwiema resztami adenozyne (Rys. 18 B).



Rys. 16. Przykładowe tetrady G:C:G:C pochodzące ze struktur kwadrupleksów zdeponowanych w bazie danych PDB: (A) PDB ID: 1EU2, (B) PDB ID: 2HK4, (C) PDB ID: 1A8N. (D) Tetradą G:C:G:C stabilizowaną przez oddziaływanie elektrostatyczne pomiędzy dwiema parami G:C, a kationem potasu. Kation potasu został zaznaczony kolorem szarym, a oddziaływanie elektrostatyczne kolorem czerwonym (PDB ID: 2KM3). We wszystkich tetradach G:C:G:C wiązania wodorowe zostały zaznaczone kolorem czarnym.

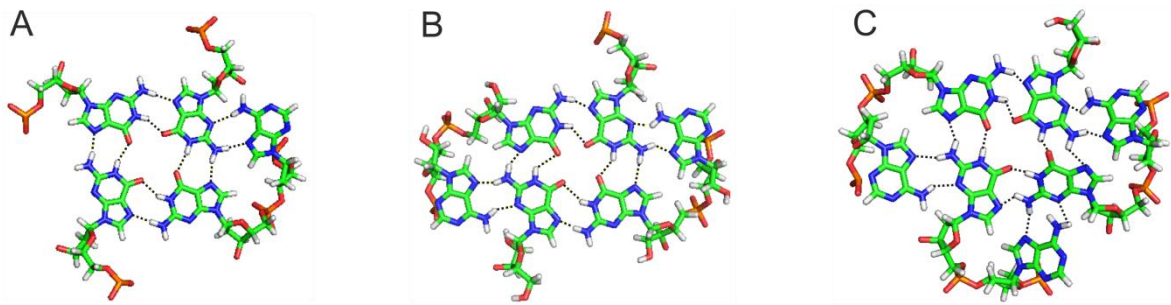


Rys. 17. (A) Model podjednostki kwadrupleksu RNA o sekwencji GCGGCGGC, (B) Model struktury kwadrupleksu RNA o sekwencji GCGGCGGC powstały przez zazębienie dwóch podjednostek, (C) Model struktury kwadrupleksu RNA o sekwencji GC^{Br}GGCGGC.

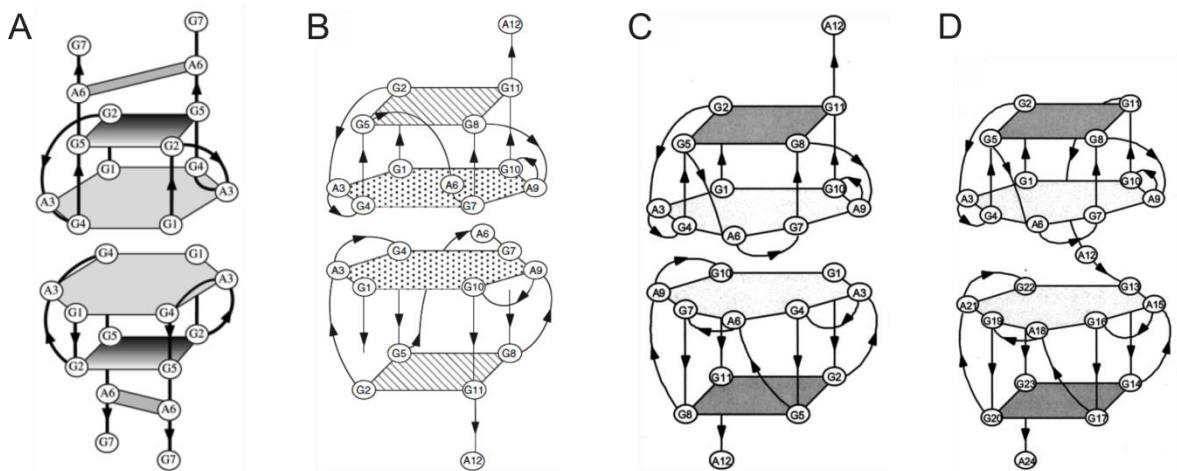


Rys. 18. (A) Model struktury d(GAGCAGGT), PDB ID: 1JVC, (B) schemat tetrady A:T:A:T. Reprodukacja za zgodą © Elsevier (62).

Zaobserwowano także, że w strukturach kwadrupleksów reszty adenozy, występujące w pętli zewnętrznej, łączącej dwie kolejne G-tetrazy, często oddziałują z jedną z G-tetrad, tworząc kolejne nietypowe motywy strukturalne – pentady, heksady i heptady (Rys. 19 A-C) (63). Ze względu na prowadzone przeze mnie badania strukturalne cząsteczek RNA zbudowanych z powtórzeń AGG, skupiłam się przede wszystkim na analizie struktur cząsteczek, które w sekwencji zawierały takie powtórzenia. Cząsteczka DNA, zawierająca dwa powtórzenia GGA, d(GGAGGAG), przyjmuje strukturę dwuniciowego kwadrupleksu, zbudowanego z jednej G-tetrad i jednej heksady A:(G:G:G:G):A. Dwie jednostki kwadrupleksowe tworzą dimer stabilizowany poprzez oddziaływania warstwowe pomiędzy dwiema heksadami (Rys. 20 A) (64). Bardzo podobną strukturę przyjmuje cząsteczka RNA zbudowana z czterech powtórzeń GGA, r(GGAGGAGGAGGA) (8). Jest to dimer jednoniciowych kwadrupleksów stabilizowany przez oddziaływanie warstwowe typu heksada-heksada (Rys. 20 B). Również kwadrupleksy DNA, zbudowane odpowiednio z czterech i ośmiu powtórzeń GGA, formują analogiczne struktury, lecz zamiast motywu heksady zawierają motyw heptady G:A:G:A:G:A:G (Rys. 20 C, D) (65, 66).



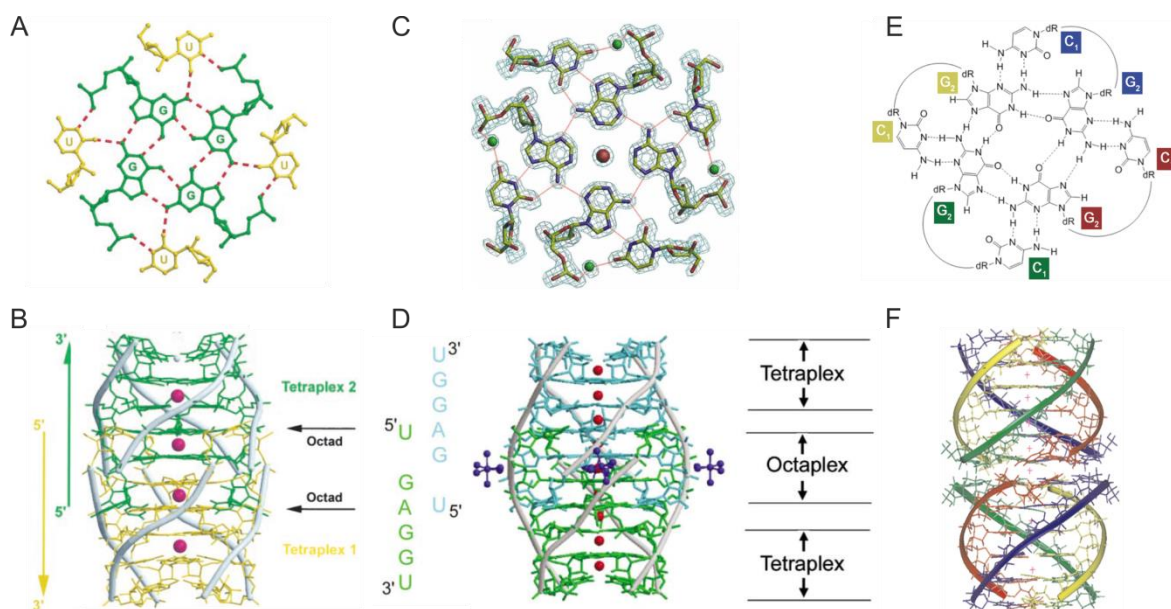
Rys. 19. – Przykłady (A) pentady (G:G:G:G):A, PDB ID: 1Y8D, (B) heksady A:(G:G:G:G):A, PDB ID: 2RQJ, i (C) heptady G:A:G:A:G:A:G, PDB ID: 1MYQ. Kolorem czarnym zostały zaznaczone wiązania wodorowe stabilizujące poszczególne motywy strukturalne.



Rys. 20. – Modele struktur kwadrupleksów utworzonych przez cząsteczki: (A) d(GGAGGAG), PDB ID: 1EEG (Reprodukcja za zgodą © Elsevier) (64), (B) r(GGAGGAGGAGGA), PDB ID: 2RQJ (Reprodukcja za zgodą © Oxford University Press) (8), (C) d(GGAGGAGGAGGA), PDB ID: 1MYQ (Reprodukcja za zgodą © ASBMB) (66), (D) d(GGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGA), PDB ID: 1OZ8 (Reprodukcja za zgodą © ASBMB) (66).

W poznanych do tej pory strukturach kwadrupleksów znaleziono trzy rodzaje oktad. Oktada G:U:G:U:G:U:G:U (Rys. 21 A) występuje w strukturze krystalicznej cząsteczki RNA o sekwencji r(UGGGGU) (49). Cząsteczka ta tworzy dimer czteroniciowych kwadrupleksów zazębionych końcami 5', przy czym reszty U1 jednej podjednostki tworzą oktadę dołączając się do G-tetrady tworzonej przez reszty G3 drugiej podjednostki. W ten sposób w miejscu dimeryzacji dwie oktady przedzielone są dwiema tetradami G2:G2:G2:G2, pochodzącymi od dwóch podjednostek (Rys. 21 B). Podobny dimer czteroniciowych kwadrupleksów tworzy w kryształce cząsteczka RNA o sekwencji rU(d^{Br}G)r(AGGU) (d^{Br}G – 8-bromo-deoksyganozyna) (47). W tej strukturze, w miejscu dimeryzacji powstają dwie oktady typu A:U:A:U:A:U:A:U (Rys. 21 C) przedzielone dwiema G-tetradami (Rys. 21 D).

Trzeci rodzaj oktady zaobserwowano dla cząsteczki DNA o sekwencji d(CGGTGGT) (57), w której dwie podjednostki oddziałują warstwowo końcami 5'. Na styku dwóch czteroniciowych, równoległych kwadrupleksów tworzą się dwie oktady typu G:C:G:C:G:C:G:C (Rys. 21 E). Na podstawie analizy strukturalnej przeprowadzonej metodami spektroskopii NMR pokazano, że reszty C1 jednej podjednostki oddziałują warstwowo z resztami C1 drugiej podjednostki, a każda z oktad jest stabilizowana dodatkowymi wiązaniami wodorowymi pomiędzy atomem wodoru grupy aminowej reszty C1 a atomem azotu N3 reszty G2 oraz pomiędzy atomem wodoru grupy aminowej reszty G2 a atomem azotu N3 reszty C1 (Rys. 21 E). Model dimeru kwadrupleksów jest przedstawiony na rysunku 21 F.



Rys. 21. – (A) Model oktady G:U:G:U:G:U:G:U (49)(49)kolorem czerwonym zaznaczono wiązania wodorowe (49); (B) struktura r(UGGGGU), PDB ID: 1J8G, kolorem czerwonym zaznaczono jony Sr²⁺, a białym jon Na⁺ (49); (C) model oktady A:U:A:U:A:U:A:U, z zaznaczoną mapą gęstości elektronowej oraz umiejscowieniem jonu Na⁺ - kolor czerwony i cząsteczek wody – kolor zielony oraz siecią wiązań wodorowych – kolor czrwny (47); (D) struktura rU(d^{Br}G)r(AGGU), PDB ID: 1MDG, kolorem czerwonym zaznaczono jony Na⁺, a kolorem niebieskim - jony heksaaminokobaltu (III) (47); (E) model oktady G:C:G:C:G:C:G:C, linią przerywaną zaznaczono wiązania wodorowe (57); (F) struktura d(CGGTGGT), czerwonymi krzyżykami zaznaczono jony K⁺ (57).

Reprodukcje za zgodą: A i B © The National Academy of Sciences of the United States of America, C i D © Elsevier, E i F © Oxford University Press.

3.2.3. Funkcja biologiczna G-kwadrupleksu

Jednej z pierwszych informacji dotyczącej potencjalnej funkcji biologicznej kwadrupleksów dostarczyli A.M. Zahler, i inni (67), pokazując, że G-kwadrupleks formowany przez cząsteczkę zawierającą sekwencję telomerową orzęska *Oxytricha nova* oddziałuje z telomerazą tego organizmu (enzymem odpowiedzialnym za wydłużanie końców chromosomów w czasie replikacji DNA). Ze względu na to, że poziom telomerazy w komórkach człowieka wpływa na proces nowotworzenia (68), zaczęto intensywnie badać, jakie znaczenie może mieć powstawanie G-kwadrupleksów w procesie odtwarzania końców telomerów (69, 70). Okazało się, że stabilizacja struktury kwadrupleksu w obrębie telomerów prowadzi do wyciszenia funkcji telomerazy i śmierci komórki rakowej. Na tej podstawie zaproponowano nową strategię przeciwnowotworową, która polega na stosowaniu niskocząsteczkowych ligandów stabilizujących strukturę kwadrupleksu tworzoną przez sekwencje telomerowe (71).

W 2005 roku przeprowadzono analizę bioinformatyczną ludzkiego genomu w celu znalezienia sekwencji bogatych w reszty guanozyny, czyli potencjalnie skłonnych do tworzenia struktury kwadrupleksu (11, 72). Pokazano, że większość takich sekwencji znajduje się w rejonach promotorowych genów, sugerując, że formowanie kwadrupleksu DNA może mieć wpływ na proces transkrypcji (73, 74). Taki związek pomiędzy powstawaniem kwadrupleksu a regulacją transkrypcji jako pierwsi zauważyli T. Simonsson, i inni, dla protoonkogenu *C-MYC* (75). Badania prowadzone w laboratorium profesora L.H. Hurleya potwierdziły tę teorię, ukazując trzykrotny wzrost procesu transkrypcji spowodowany wprowadzeniem mutacji destabilizującej strukturę kwadrupleksu w rejonie promotorowym genu *C-MYC* (76). Obecnie uważa się, że stabilizacja G-kwadrupleksów tworzących się w rejonach promotorowych genów może posłużyć do walki z nowotworami (77).

Podobnie jak w badaniach strukturalnych, wysiłki badaczy starających się poznać funkcję G-kwadrupleksów skupiają się głównie wokół cząsteczek DNA. Jedne z pierwszych badań nad poznaniem funkcji kwadrupleksów RNA dotyczyły wirusów HIV (ang. *Human Immunodeficiency Virus*) i HSV (ang. *Herpes Simplex Virus*) (78, 79). Jednakże, dopiero odkrycie w 2007 roku cząsteczek RNA zawierających powtórzenia telomerowe, tzw. TERRA (ang. *Telomeric Repeat-containing RNAs*), zbudowanych z tandemowych powtórzeń r(UUAGGG) (80, 81)

oraz wyniki analizy bioinformatycznej ludzkiego transkryptomu, identyfikujące wiele sekwencji zdolnych do tworzenia G-kwadrupleksu na końcu 5' mRNA, w rejonie nieulegającym translacji (UTR, ang. *Untranslated Region*) (82, 12), zapoczątkowało rozwój badań nad znaczeniem kwadrupleksów RNA. Wykazano, m. in., że możliwe jest utworzenie hybrydowego kwadrupleksu DNA-RNA pomiędzy telomerowym DNA a TERRA (83), czy pomiędzy powstającym w czasie transkrypcji RNA a jednoniciowym DNA (84), sugerując wpływ sekwencji RNA, bogatych w reszty guanozyny na proces transkrypcji. Zidentyfikowano również białka wiążące TERRA (85, 86) oraz białko, które wytworzyło mechanizm unikania łączenia z TERRA (87). Z kolei kwadrupleksom potencjalnie tworzącym się w rejonie 5' UTR przypisana została rola regulatora procesu translacji, dzięki czemu zostały one uznane za potencjalnie dobre cele projektowanych terapii antynowotworowych (37). S. Kumari, i inni, jako pierwsi pokazali, że kwadrupleks RNA utworzony w rejonie 5' UTR protoonkogenu *NRAS* obniża poziom ekspresji tego genu poprzez hamowanie procesu translacji (82). Co więcej, ta sama grupa badawcza zauważyła różnice w poziomie inhibicji ekspresji genu *NRAS* w zależności od tego, w którym miejscu rejonu 5' UTR mRNA znajduje się sekwencja skłonna do utworzenia kwadrupleksu (88). Natomiast K. Halder, i inni, stosując sztuczne sekwencje RNA, wywodzące się z sekwencji naturalnie występujących w ludzkim mRNA (89), dodatkowo ukazali wpływ długości pętli łączącej poszczególne G-trakty oraz liczby powtórzeń danego motywu sekwencji zawierającej trakt GGG na proces ekspresji genów.

Niezwykła stabilność G-kwadrupleksów, jak również zdolność do wnikania do wnętrza komórki oraz odporność na działanie nukleaz sprawiają, że są one coraz częściej wykorzystywane w celu stworzenia nowej klasy terapeutyków, którymi są aptamery, czyli krótkie fragmenty DNA lub RNA specyficznie oddziałujące z docelową cząsteczką (37). Do tej pory starano się wykorzystać cząsteczki tworzące struktury kwadrupleksu w celu opracowania terapii przeciwzakrzepowej (90–93), antynowotworowej (94–96), anty-HIV (97–99), czy przeciw białkom prionowym (8, 19, 100).

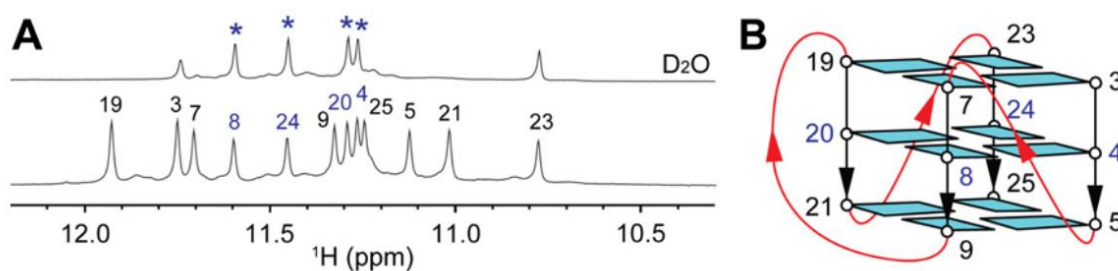
3.3 Przegląd wybranych metod eksperymentalnych stosowanych w badaniach kwadrupleksów

3.3.1. Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego - NMR

Spektroskopia NMR pozwala na ustalenie struktury przestrzennej kwasów nukleinowych z rozdzielczością atomową. Główną zaletą tej metody jest możliwość prowadzenia badań w roztworze, czyli w warunkach zbliżonych do rzeczywistości występujących w komórkach żywych organizmów. Jednocześnie spektroskopia NMR pozwala na zgłębienie wielu innych aspektów dotyczących kwadrupleksów, jakimi są np. oddziaływanie kwadrupleks-białko (19), oddziaływanie kwadrupleks-ligand (101), wpływ warunków roztworu na strukturę kwadrupleksu (20, 102), określenie stechiometrii kwadrupleksu (103), wpływ jednonukleotydowych zmian w sekwencji na formowanie kwadrupleksu (104), wpływ modyfikacji na strukturę kwadrupleksu (33, 105), badanie stabilności kinetycznej kwadrupleksów (106), badanie równowagi monomer-dimer (107, 108), czy identyfikacja miejsc wiązania jonów (54).

Rejestrując jednowymiarowe widmo, ^1H NMR, próbki DNA lub RNA rozpuszczonej w wodzie (90% H_2O : 10% D_2O , v:v), można szybko uzyskać odpowiedź na pytanie, czy cząsteczka tworzy w danych warunkach roztworu (różne bufony, dodatek soli, różne wartości pH) strukturę kwadrupleksu. Jest to możliwe, ponieważ sygnały protonów iminowych reszt guanozyny tworzących G-tetrad są widoczne w charakterystycznym regionie 10 – 12 ppm. Dla porównania, sygnały protonów iminowych uwikłanych w tworzenie wiązań wodorowych typu Watsona-Cricka występują w regionie 13 – 14 ppm (109, 110). Zazwyczaj liczba sygnałów obserwowanych w zakresie 10 – 12 ppm widma ^1H NMR odpowiada liczbie reszt guanozyny tworzących G-tetrad. Dla przykładu, obserwacja dwunastu sygnałów iminowych w regionie 10 – 12 ppm dla kwadrupleksu DNA o sekwencji d[AAGGGTGGGTGTAAGTGTGGGTGGGT] (PDB ID: 2LPW) oznacza, że kwadrupleks ten jest zbudowany z trzech G-tetrad (Rys. 22) (111). Dodatkowo, iminowe atomy wodoru reszt guanozyny, szczególnie te, pochodzące od reszt tworzących wewnętrzną G-tetradę, są silnie chronione w wewnętrznym kanale struktury kwadrupleksu i są widoczne nawet w widmach rejestrowanych w wysokich temperaturach. Ponadto atomy te bardzo trudno ulegają wymianie na deuter, dzięki czemu są obserwowane w widmach rejestrowanych dla próbek

rozpuszczonych w D_2O (Rys. 22 A). Przykładem niedostępności protonów iminowych znajdujących się wewnątrz struktury jest kwadrupleks DNA o sekwencji d(GGGGTGGGAGGAGGGT). Iminowe atomy wodoru, pochodzące od reszt guanozyny, tworzących wewnętrzne G-tetrazy, nie ulegają wymianie na deuter i są widoczne w widmie 1H NMR nawet po upływie dwóch miesięcy od momentu rozpuszczenia próbki w D_2O i przechowywaniu jej w temperaturze pokojowej oraz kolejnym ogrzewaniu w temperaturze $100\text{ }^\circ C$ przez 10 minut (112). Dla porównania, w przypadku struktur takich jak dupleks, czy spinka, tak zwane wymienialne atomy wodoru, pochodzące od grup iminowych, aminowych i hydroksylowych poszczególnych reszt nukleotydowych, ulegają natychmiastowej wymianie na deuter w momencie zmiany rozpuszczalnika z H_2O na D_2O i nie są obserwowane w widmach 1H NMR. Szybkość takiej wymiany zależy głównie od struktury cząsteczki, temperatury oraz pH roztworu, a dla par zasad typu Watsona-Cricka jest rzędu kilku milisekund.

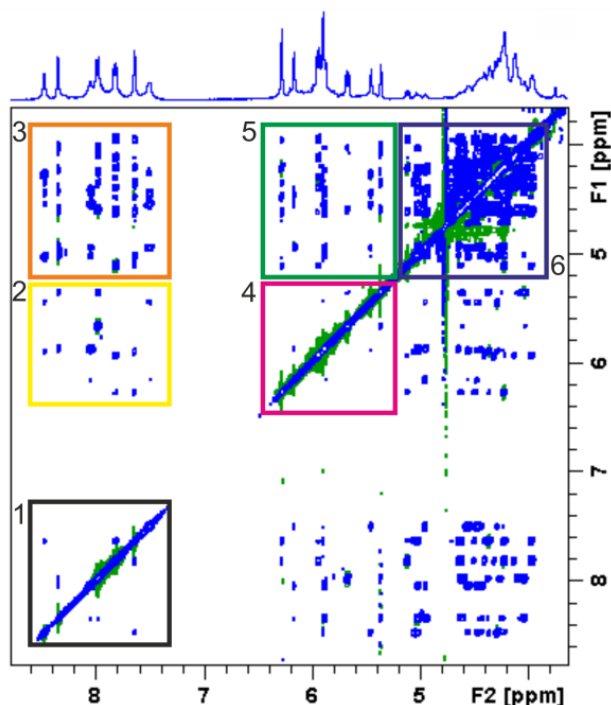


Rys. 22. (A) Rejon iminowy widm 1H NMR. Widma zarejestrowane w H_2O (widmo dolne) i po upływie godziny od wymiany rozpuszczalnika na D_2O (widmo górne). Gwiazdkami są zaznaczone sygnały pochodzące od wewnętrznej G-tetrazy. (B) Schemat topologii kwadrupleksu, dla którego zarejestrowano prezentowane widma 1H NMR (reprodukcja za zgodą © Elsevier) (110).

Ustalenie struktury przestrzennej kwadrupleksu metodami biomolekularnej spektroskopii NMR jest możliwe, jeżeli sygnały w widmie 1H NMR są wąskie, dobrze rozdzielone i odpowiadają pojedynczej konformacji. Występowanie w równowadze wielu konformerów cząsteczek DNA lub RNA można zaobserwować analizując rejon 10 – 12 ppm. Gdy mamy do czynienia z więcej niż jedną formą kwadrupleksu, to liczba sygnałów iminowych przekracza liczbę reszt guanozyny obecnych w sekwencji. Co więcej, gdy sygnały pochodzące od różnych konformerów są silnie na siebie nałożone, to niemożliwe jest ich przypisanie i przeprowadzenie analizy strukturalnej (110). W celu znalezienia cząsteczki, która

w warunkach NMR przyjmuje pojedynczą konformację, zazwyczaj sprawdza się wiele cząsteczek, nieznacznie różniących się między sobą sekwencją (113–115). Inne podejście poszukiwania pojedynczej formy kwadrupleksu zakłada manipulację warunkami roztworu. W tym przypadku testowane są różne wartości stężenia DNA lub RNA, stężenia i rodzaju soli, zmiana pH, czy temperatury pomiaru (108, 111, 116–120).

Analizę strukturalną kwadrupleksów metodami NMR rozpoczyna się od przypisania jak największej liczby sygnałów rezonansowych ^1H , ^{13}C , ^{15}N i ^{31}P . W przypadku cząsteczek o naturalnej zawartości izotopów, rejestruje się zestaw widm dwuwymiarowych homo- i heterojądrowych: ^1H - ^1H NOESY, ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{15}N HSQC, ^1H - ^{31}P HSQC i ^1H - ^{13}C HMBC.



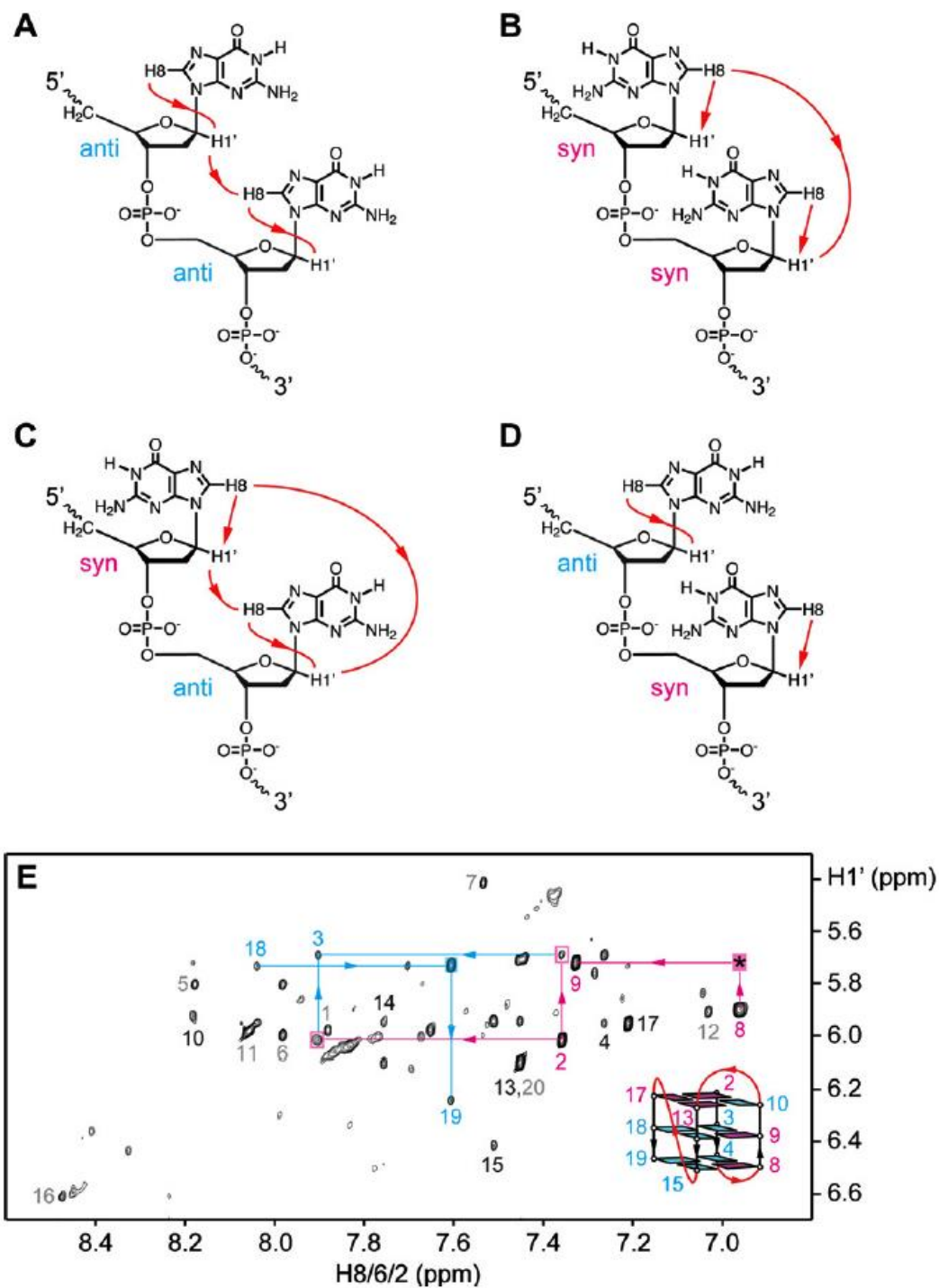
Rys. 23. Widmo NOESY, D₂O, zarejestrowane dla kwadrupleksu RNA.

Zaznaczone rejony przedstawiają występowanie sygnałów korelacyjnych pomiędzy:

- 1 – H₆/H₈ – H₆/H₈,
- 2 – H₆/H₈ – H₅/H₁' ,
- 3 – H₆/H₈ – H₂'/H₃'/H₄'/H₅'/H₅'',
- 4 – H₅/H₁' – H₅/H₁' ,
- 5 – H₅/H₁' – H₂'/H₃'/H₄'/H₅'/H₅'',
- 6 – H₂'/H₃'/H₄'/H₅'/H₅''' - H₂'/H₃'/H₄'/H₅'/H₅'''

Najwięcej informacji, w procesie poznania struktury biomolekuły, dostarcza widmo 2D NOESY (ang. *Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy*), w którym obserwowane są sygnały korelacyjne proton – proton, pochodzące

od oddziaływań dipolowych pomiędzy atomami wodoru oddalonymi od siebie w przestrzeni na odległość $\leq 6 \text{ \AA}$. Na rysunku 23 przedstawiłam przykładowe widmo 2D NOESY, zarejestrowane dla kwadrupleksu RNA i zaznaczyłam sześć charakterystycznych rejonów, w których występują sygnały korelacyjne, pochodzące od oddziaływań pomiędzy poszczególnymi grupami protonów. Interpretację widma rozpoczyna się od tzw. rejonu aromatyczno-anomerycznego (Rys. 23, rejon 2), w którym obserwowane są sygnały korelacyjne pomiędzy atomami H8/H6/H2 - H1'/H5. W rejonie tym najłatwiej jest zidentyfikować sygnały korelacyjne pomiędzy atomami H6 - H5 pirymidyn oraz pomiędzy atomami H2 - H1' reszt adenozy. Pierwsze sygnały charakteryzuje największa intensywność, z uwagi na bliską odległość pomiędzy atomami H5 i H6 (2.5 Å), z kolei drugie są charakterystycznie wąskie, co jest konsekwencją długiego czasu relaksacji protonów H2. Pierwszy etap analizy polega na wyznaczeniu sekwencyjnej ścieżki NOE, czyli charakterystycznej dla kwasów nukleinowych nieprzerwanej ścieżki przekazywania magnetyzacji pomiędzy kolejnymi resztami nukleotydowymi, n i $n+1$, w kierunku od końca 5' do 3', według schematu: H8/H6(n) - H1'(n) - H8/H6($n+1$), która w klasycznych strukturach A-RNA przebiega wzdłuż całego łańcucha (121, 122). Taką ścieżkę można również wyznaczyć dla kwadrupleksów, jednakże obecność poszczególnych sygnałów korelacyjnych zależy od konformacji *syn* lub *anti* sąsiadujących w sekwencji reszt guanozyny (Rys. 24 A-D). Ze względów geometrycznych, sygnały korelacyjne pomiędzy atomami H1'(n) - H8($n+1$), pochodzącymi od reszt guanozyny znajdujących się w konformacji *syn* lub *anti* (n) oraz sąsiadującej reszty guanozyny w konformacji *syn* ($n+1$), są bardzo słabe lub niewidoczne (Rys. 24 B, D). Dla kontrastu, gdy po guanozynie w konformacji *syn* (n) występuje reszta guanozyny w konformacji *anti* ($n+1$), to widoczny jest zarówno sygnał pomiędzy atomami H1'(n) - H8($n+1$), jak i H8(n) - H1'($n+1$) (Rys. 24 C). Rysunek 24 E przedstawia rejon aromatyczno-anomeryczny przykładowego widma NOESY zarejestrowanego dla kwadrupleksu DNA utworzonego przez katalityczną podjednostkę ludzkiej telomerazy, hTERT (119). Na widmie zaznaczona została ścieżka NOE, wraz z charakterystycznymi sygnałami korelacyjnymi pomiędzy guanozynami w konformacjach *syn* i *anti*. Podobne sekwencyjne ścieżki mogą być również wyznaczone pomiędzy aromatycznymi atomami wodoru H8/H6 a atomami wodoru reszty cukrowej, H2', H3', H4', H5' i H5'' (rejon 3, Rys. 23).

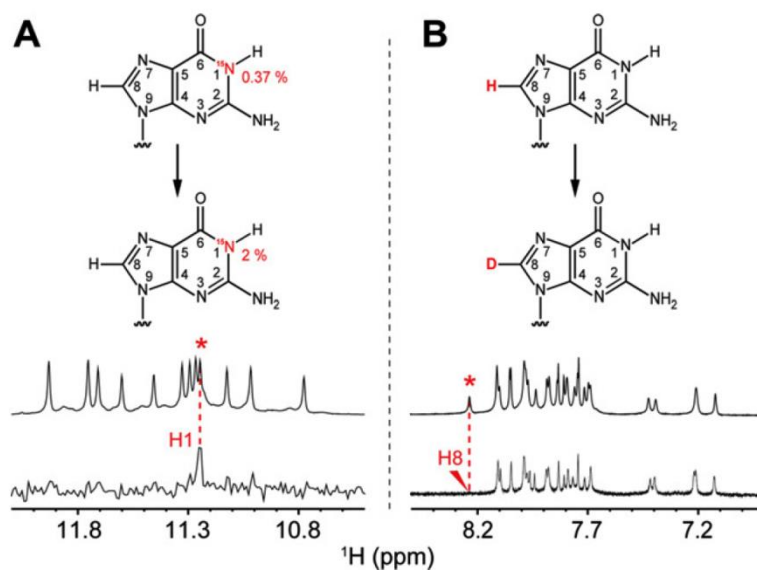


Rys. 24. Obserwowane sekwencyjne kontakty NOE pomiędzy sąsiadującymi w sekwencji resztami guanozyny (odpowiednio w kierunku od końca 5' do 3'), w konformacjach: (A) *anti-anti*, (B) *syn-syn*, (C) *syn-anti*, i (D) *anti-syn*. (E) Rejon aromatyczno-anomeryczny widma NOESY kwadrupleksu hTERT, którego topologia jest schematycznie przedstawiona w prawym dolnym rogu. Na widmie zaznaczone zostały sygnały korelacyjne pomiędzy resztami w konformacjach *anti-anti* (wypełniony niebieski kwadrat), *syn-syn* (wypełniony różowy kwadrat) i *syn-anti* (niewypełniony różowy kwadrat) (119) (reprodukcja za zgodą © Elsevier) (110).

Pomocna w procesie wyznaczania sekwencyjnej ścieżki NOE jest jednoczesna analiza rejonu aromatyczno-aromatycznego (rejon 1, Rys. 23), w którym obserwowane są oddziaływania warstwowe pomiędzy H8/H6(*n*) - H8/H6(*n*+1), dające informację o tym, które reszty nukleotydowe sąsiadują ze sobą w sekwencji (rejon ten jest również przedstawiony na rysunkach 64. i 75., w rozdziale Wyniki badań własnych).

W celu jednoznacznego przypisania sygnałów ^1H często stosuje się selektywne, miejscowo specyficzne znakowanie izotopami ^{15}N , ^{13}C lub D (ang. *site-specific isotope labeling*) (110). Na przykład dla identyfikacji protonów iminowych poszczególnych reszt guanozyny, jedna z reszt w sekwencji kwadrupleksu jest w kilku procentach zastępowana przez resztę guanozyny znakowaną izotopem ^{15}N w pozycji N1. Następnie rejestruje się widmo ^1H NMR filtrowane w taki sposób, że widoczny jest tylko sygnał pochodzący od atomu wodoru połączonego wiązaniem kowalencyjnym ze znakowanym atomem azotu ^{15}N (Rys. 25 A). W taki sposób znakuje się po kolei każdą resztę guanozyny, dzięki czemu otrzymuje się jednoznaczne przypisanie wszystkich sygnałów iminowych. Niestety, metoda ta nie może być stosowana rutynowo dla cząsteczek RNA, ponieważ do dziś brak jest dostępnych handlowo amidofosforynów RNA znakowanych ^{15}N , syntonów niezbędnych do chemicznej syntezy oligorybonukleotydów.

Podobna strategia jest stosowana w celu przypisania sygnałów pochodzących od protonów aromatycznych. Jeżeli sekwencyjna ścieżka NOE w widmie NOESY jest przerwana, to przypisanie sygnałów pochodzących od protonów aromatycznych do poszczególnych reszt w sekwencji jest niezwykle trudne, ponieważ w widmie tym nie występują inne sygnały, które umożliwiałyby ich jednoznaczne przypisanie. W takim przypadku wykorzystywane są reszty nukleotydowe, które zamiast atomu wodoru w pozycjach C8 lub C6 mają podstawiony atom deuteru. Następnie rejestruje się widmo ^1H NMR, a sygnał H8/H6, pochodzący od wyznakowanej reszty zanika pozwalając na jednoznaczne przypisanie sygnału do danej reszty nukleotydowej (Rys. 25 B).

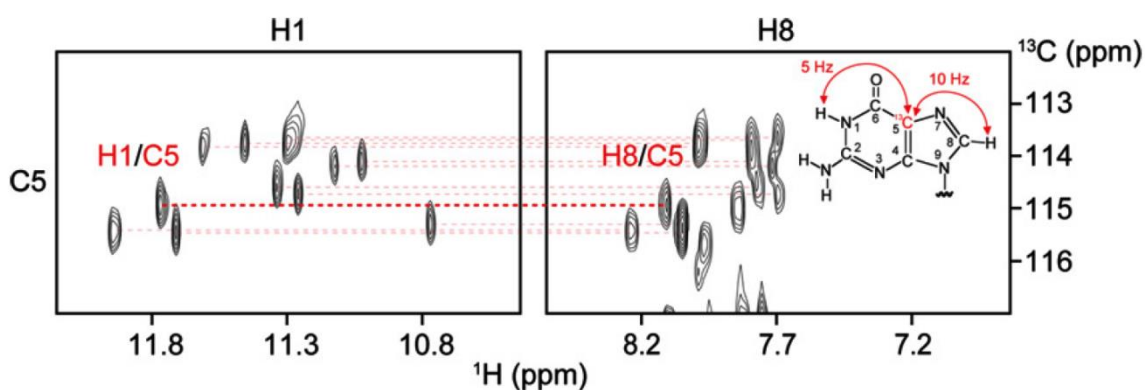


Rys. 25. Przykłady selektywnego znakowania izotopowego (^{15}N i D) w celu jednoznacznego przypisania sygnałów ^1H dla (A) protonów iminowych i (B) protonów aromatycznych (reprodukcja za zgodą © Elsevier) (110).

Dla kwadrupleksów o naturalnej zawartości izotopów możliwe jest zarejestrowanie widma ^1H - ^{13}C HMBC (ang. *Heteronuclear Multi-Bond Correlation*). W widmie ^1H - ^{13}C HMBC obserwowane sygnały korelacyjne są wynikiem sprzężeń skalarnych dalekiego zasięgu, pomiędzy atomami oddalonymi od siebie najczęściej o dwa lub trzy wiązania chemiczne. Na podstawie analizy tego widma można jednoznacznie przypisać sygnały H8 i N1H do danej reszty guanozyny, gdyż oba atomy wykazują korelację do tego samego atomu węgla C5 (Rys. 26). W ten sposób można również skorelować atomy H8/H6 z atomem H1' poprzez atom węgla C8/C6 (123). Niestety, eksperyment typu ^1H - ^{13}C HMBC cechuje bardzo mała czułość, ponieważ naturalna zawartość izotopu ^{13}C wynosi zaledwie $\sim 1\%$, a transfer magnetyzacji następuje pomiędzy atomami, dla których sprzężenie skalarnie nie przekracza 10 Hz. Aby eksperyment zakończył się powodzeniem, sygnały rezonansowe w widmie ^1H NMR, pochodzące od atomów wodoru N1H i H8 muszą być intensywne, wąskie i dobrze rozdzielone, a stężenie próbki możliwie jak największe (przynajmniej 3 mM).

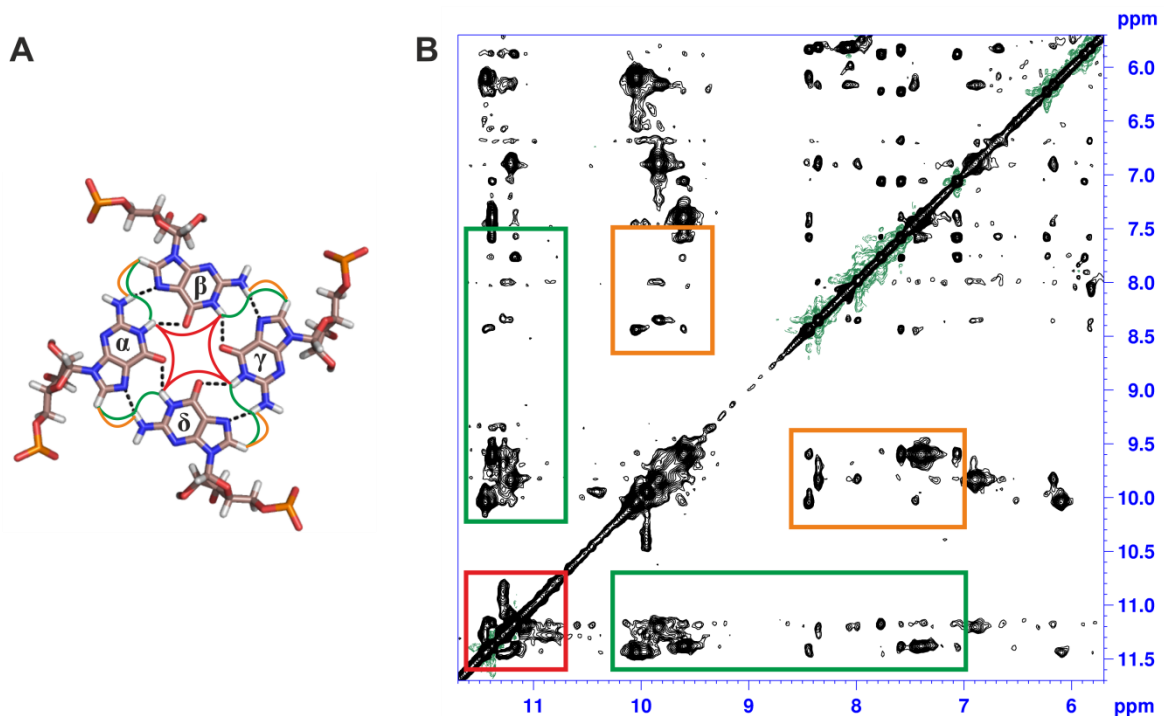
Kolejną możliwość przypisania sygnałów N1H daje zastępowanie kolejnych reszt guanozyny inozyną. Inozyna nie posiada grupy aminowej w pozycji C2 zasady heterocyklicznej, przez co zmienia się otoczenie chemiczne iminowego atomu wodoru, skutkujące silną zmianą przesunięcia chemicznego sygnału N1H w widmie

^1H NMR. Oznacza to, że sygnał N1H, pochodzący od modyfikowanej reszty nie jest obserwowany w regionie 10-12 ppm i może być przypisany do konkretnej reszty guanozyny (wymienionej na inozynę) przez porównanie z widmem ^1H NMR próbki niemodyfikowanej (Rys. 81., rozdział Wyniki). Jednakże musi być spełniony warunek, że zastąpienie reszty guanozyny inozyną nie wpływa na zmianę struktury kwadrupleksu.



Rys. 26. Fragmenty widma ^1H - ^{13}C HMBC z zaznaczonymi sygnałami korelującymi proton iminowy i aromatyczny do atomu węgla $^{13}\text{C}_5$ w obrębie jednej reszty guanozyny (reprodukcja za zgodą © Elsevier) (110).

Informację o wiązaniach wodorowych pomiędzy resztami guanozyny tworzącymi poszczególne G-tetrydy, otrzymuje się z widma NOESY wykonanego w wodzie (90% H_2O /10% D_2O , v/v). W takim widmie obserwuje się dodatkowo sygnały korelacyjne, pochodzące od wymiennalnych atomów wodoru. Na rysunku 27. zazaczyłam rejony widma NOESY, w których występują charakterystyczne dla kwadrupleksów sygnały korelacyjne. Są to głównie sygnały pomiędzy protonami iminowymi wewnątrz G-tetrydy, oraz pomiędzy protonem N1H jednej reszty guanozyny a protonami aminowym i aromatycznym reszty sąsiadującej w G-tetradzie: $\text{G}\alpha\text{N1H}$ - $\text{G}\beta\text{N1H}$, $\text{G}\beta\text{N1H}$ - $\text{G}\gamma\text{N1H}$, $\text{G}\gamma\text{N1H}$ - $\text{G}\delta\text{N1H}$, $\text{G}\delta\text{N1H}$ - $\text{G}\alpha\text{N1H}$ (kolor czerwony), $\text{G}\alpha\text{N1H}$ - $\text{G}\beta\text{H8}$, $\text{G}\beta\text{N1H}$ - $\text{G}\gamma\text{H8}$, $\text{G}\gamma\text{N1H}$ - $\text{G}\delta\text{H8}$, $\text{G}\delta\text{N1H}$ - $\text{G}\alpha\text{H8}$ (kolor zielony) oraz $\text{G}\alpha\text{NH}_2$ - $\text{G}\beta\text{H8}$, $\text{G}\beta\text{NH}_2\text{H}$ - $\text{G}\gamma\text{H8}$, $\text{G}\gamma\text{NH}_2$ - $\text{G}\delta\text{H8}$, $\text{G}\delta\text{NH}_2$ - $\text{G}\alpha\text{H8}$ (kolor pomarańczowy).



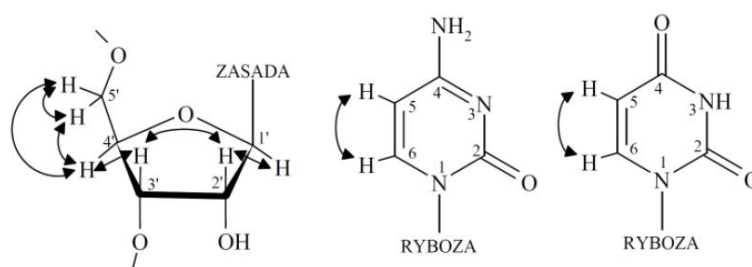
Rys. 27. (A) G-tetrada z zaznaczonymi atomami, pomiędzy którymi występują charakterystyczne sygnały korelacyjne. (B) Fragment widma 2D NOESY kwadrupleksu RNA, na którym zaznaczone zostały zakresy spektralne, w których występują sygnały korelacyjne, charakterystyczne dla motywu G-tetrady.

W widmie tym można również znaleźć dowody na powstawanie nietypowych tetrad, jak np. G:C:G:C, A:T:A:T oraz A-, T- czy U-tetrazy. Na przykład o obecności tetrazy G:C:G:C w strukturze kwadrupleksu świadczą dodatkowe sygnały pomiędzy atomem wodoru grupy aminowej reszty cytydyny i atomem wodoru H8 guanozyny pochodzącej z przyległej pary zasad typu Watsona-Cricka, współtworzącej tetradę (124, 125). Z kolei dla przesuniętej tetrazy A:T:A:T charakterystyczna jest obecność sygnałów NOE pomiędzy atomem wodoru N3H tymidyny a atomami wodoru pochodzącymi od grupy aminowej i H2 adenozyne oraz sygnałów pomiędzy H8 adenozyne i atomem wodoru grupy aminowej, pochodzących od drugiej reszty adenozyne, współtworzącej tetradę (62). Z kolei o powstawaniu homotetrad można wnioskować na podstawie obserwacji następujących charakterystycznych sygnałów NOE:

- w zależności od rodzaju powstającej tetrazy A:A:A:A są to sygnały pomiędzy aminowym atomem wodoru jednej reszty i atomem H8 pochodzącym od drugiej reszty adenozyne lub pomiędzy aminowym atomem wodoru jednej reszty i atomem H2 pochodzącym od drugiej reszty adenozyne, (58);

- dla tetrady T:T:T:T oczekiwana jest obecność sygnałów NOE pomiędzy iminowym atomem wodoru jednej reszty a grupą metylową drugiej reszty tymidyny (55, 57);
- dla tetrady U:U:U:U charakterystyczny jest intensywny sygnał pomiędzy iminowym atomem wodoru jednej reszty a atomem H5 drugiej reszty urydyny oraz dużo mniej intensywny sygnał pomiędzy tym iminowym atomem wodoru a atomem H6 drugiej reszty urydyny (126).

Proces przypisywania sygnałów wspomaga również rejestracja widm typu COSY (ang. *CORrelation SpectroscopY*) i HSQC (ang. *Heteronuclear Single Quantum Correlation*), które wykorzystują transfer magnetyzacji poprzez sprzężenia skalarne.



Rys. 28. Możliwe sprzężenia skalarne pomiędzy atomami wodoru rybozy oraz pomiędzy atomami H5 i H6 pirymidyn, obserwowane w widmach COSY.

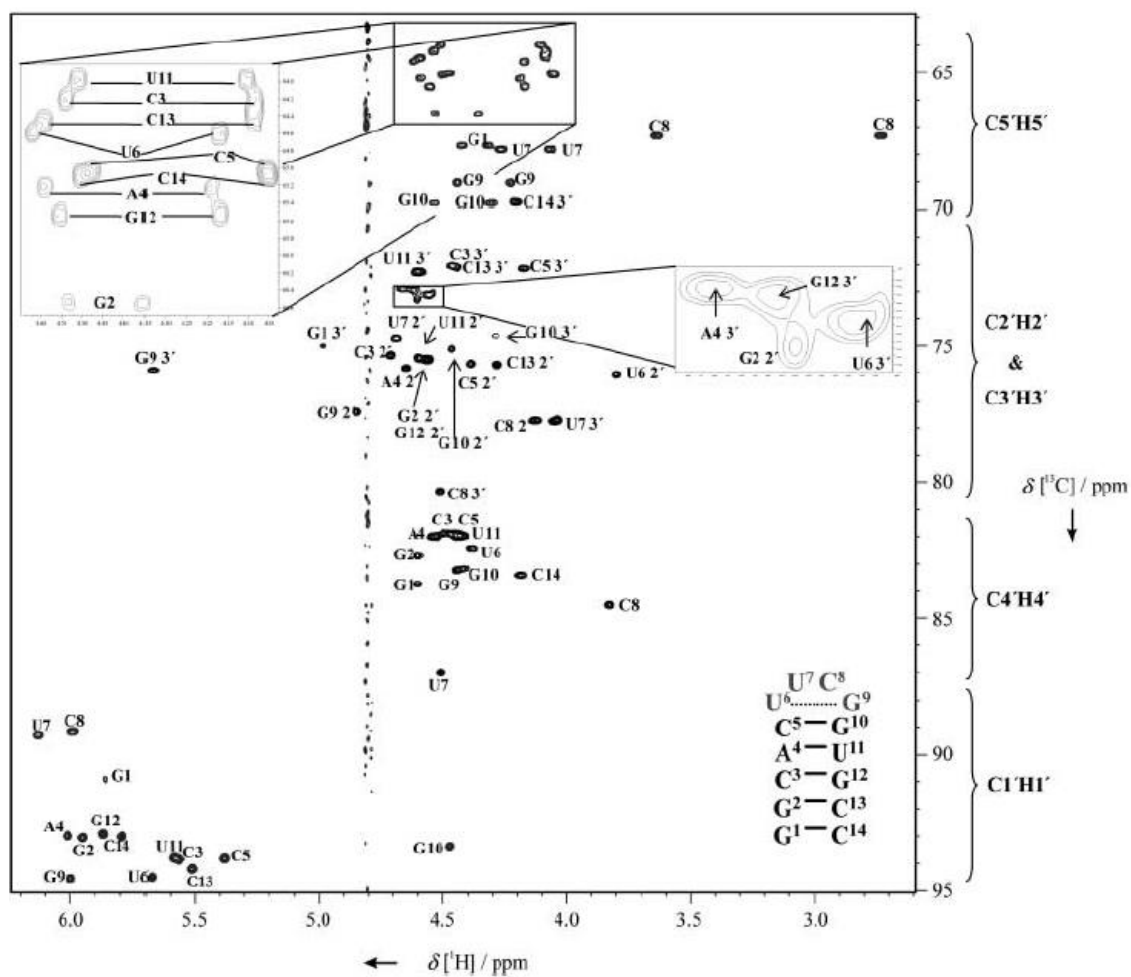
Sygnały korelacyjne w widmie COSY pochodzą od atomów wodoru oddalonych od siebie o dwa lub trzy wiązania kowalencyjne (Rys. 28). Intensywność sygnału korelacyjnego zależy od wartości wicynalnej stałej sprzężenia (im większa stała sprzężenia tym sygnał jest bardziej intensywny). Na przykład, gdy reszta cukrowa posiada konformację *C3'-endo*, to stała sprzężenia pomiędzy atomami wodoru H1' a H2' wynosi < 1 Hz, a sygnał korelacyjny pomiędzy tymi atomami nie jest obserwowany w widmie COSY. Z kolei stała sprzężenia pomiędzy atomami H5 a H6 pirymidyn wynosi ~ 7.5 Hz, co sprawia, że ich sygnał korelacyjny jest bardzo intensywny. Niestety, sygnały pochodzące od atomów H2'/H3'/H4'/H5'/H5'' występują w wąskim zakresie 3.5 – 5.0 ppm, przez co silnie się na siebie nakładają, niejednokrotnie uniemożliwiając ich identyfikację.

W widmach typu HSQC obserwowane są korelacje pomiędzy atomem wodoru a związanym z nim kowalencyjnie heteroatomem, np. ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P . Na podstawie wartości przesunięć chemicznych atomów węgla ^{13}C w widmach

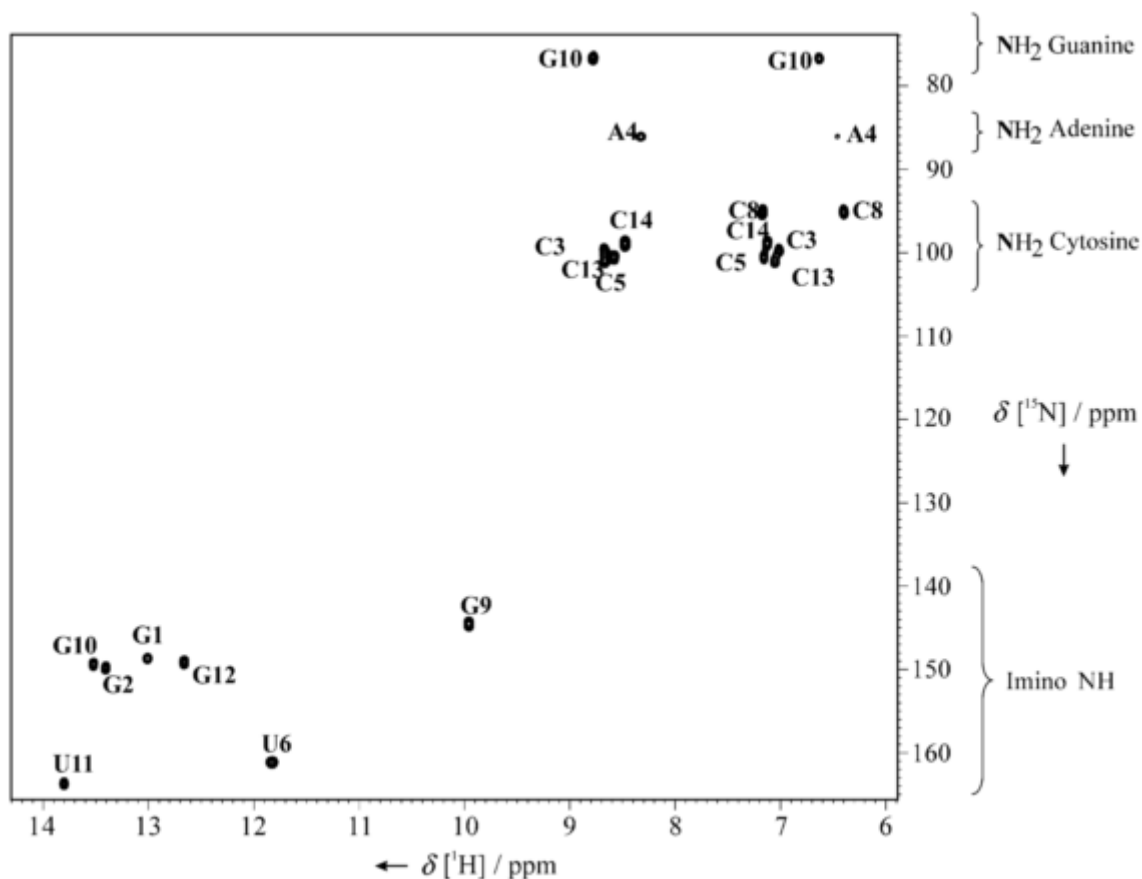
^1H - ^{13}C HSQC można wyróżnić charakterystyczne zakresy dla każdego typu atomów węgla, C1', C2', C3', C4' i C5' (Rys. 29). W ten sposób, dzięki skorelowaniu konkretnego atomu węgla ze związanym z nim kowalencyjnie atomem wodoru, można sprawdzić poprawność przypisań dla atomów wodoru rybozy (H1'/H2'/H3'/H4'/H5'/H5''), dokonanych na podstawie analizy widm NOESY. Z kolei, analiza wartości przesunięć chemicznych atomów ^{15}N w widmie ^1H - ^{15}N HSQC pozwala rozróżnić sygnały pochodzące od grup iminowych reszt guanozyny i urydyny oraz wydzielić grupy sygnałów pochodzących od sygnałów grup aminowych reszt guanozyny, adenozyiny i cytydyny (Rys. 30).

Proces przypisania sygnałów H3', H4', H5' i H5'' ułatwiają informacje otrzymane z widm ^1H - ^{31}P HSQC. Na przykład dla typowych dla A-RNA wartości kątów torsyjnych szkieletu fosfodiesterowego w widmie tym obserwowane są sygnały sekwencyjne pomiędzy atomem wodoru H3' reszty $n-1$ a atomem fosforu kolejnej reszty (n), oraz pomiędzy atomem fosforu reszty n a atomami H4'/H5'/H5'' tej samej reszty nukleotydowej (n): H3'(n-1) - P(n) - H4'/H5'/H5''(n), przy czym sygnał H3'(n-1) - P(n) charakteryzuje się największą intensywnością (Rys. 31).

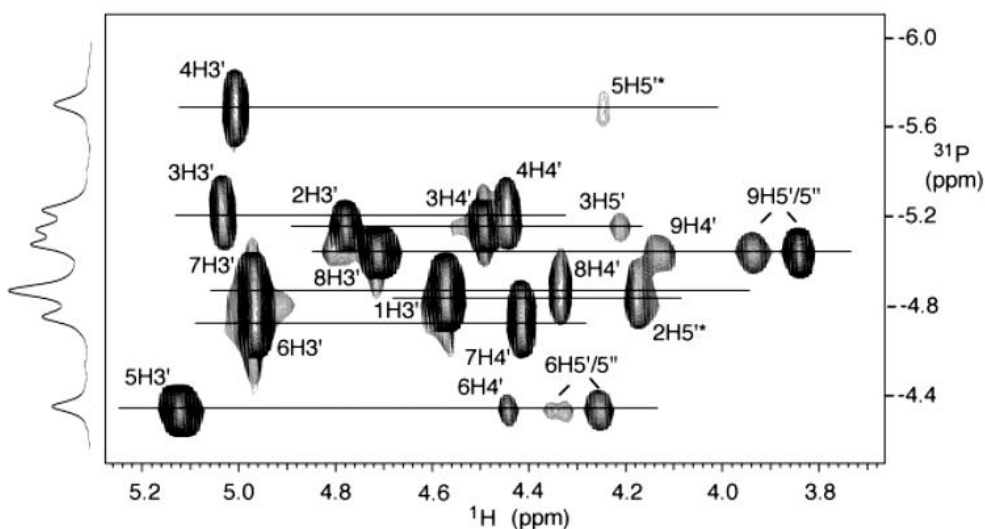
Na podstawie przypisanych sygnałów i zidentyfikowanych oddziaływań pomiędzy poszczególnymi atomami w przestrzeni, możliwe jest określenie topologii kwadrupleksu. W celu otrzymania wysokorozdzielczej struktury, należy w kolejnych etapach wyznaczyć więzy strukturalne (odległościowe oraz na kąty torsyjne) oraz przeprowadzić obliczenia z wykorzystaniem metod restryktywnej dynamiki molekularnej. Szczegółowych informacji na temat protokołów wykorzystywanych w celu obliczenia wysokorozdzielczej struktury G-kwadrupleksu na podstawie danych uzyskanych z badań NMR dostarczyli M. Adrian, B. Heddi i A.T. Phan (110).



Rys. 29. Przykładowe widmo ^1H - ^{13}C HSQC zarejestrowane dla cząsteczki o sekwencji d(GGCACUUCGGUGCC), która tworzy strukturę spinki do włosów. W widmie zaznaczono zakresy przesunięć chemicznych charakterystyczne dla poszczególnych atomów węgla rybozy (reprodukcja za zgodą © John Wiley and Sons) (122).



Rys. 30. Przykładowe widmo ^1H - ^{15}N HSQC zarejestrowane dla cząsteczki o sekwencji d(GGCACUUCGGUGCC), która tworzy strukturę spinki do włosów. W widmie zaznaczono zakresy przesunięć chemicznych atomów ^{15}N , charakterystyczne dla grup iminowych i aminowych (reprodukcja za zgodą © John Wiley and Sons) (122).



Rys. 31. Przykładowe widmo ^1H - ^{31}P HSQC zarejestrowane dla cząsteczki o sekwencji d(GCGGTGGAT), która tworzy strukturę kwadrupleksu (reprodukcja za zgodą © American Chemical Society) (127).

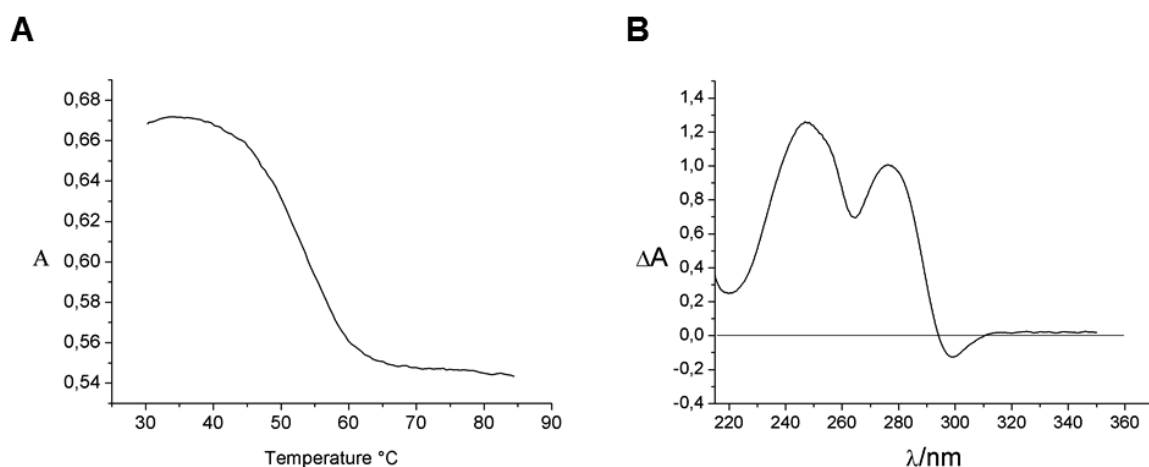
3.3.2. Spektroskopia UV-Vis

Informację o tworzeniu się kwadrupleksów można uzyskać na podstawie analizy krzywych topnienia oraz absorpcyjnych widm różnicowych - TDS (ang. *Thermal Difference Spectrum*).

Pomiar krzywych topnienia dla kwasów nukleinowych wykonuje się przy długości fali 260 nm, przy której wykazują one maksimum absorpcji (128). W czasie topnienia struktury dupleksów B-DNA lub A-RNA przy tej długości fali następuje wzrost absorpcji o ~ 25%. Natomiast w przypadku topnienia struktury kwadrupleksu przy długości fali 260 nm różnica absorpcji pomiędzy stanem, w którym cząsteczka jest ustrukturyzowana a stanem, w którym jest zdenaturowana wynosi zaledwie 4% (129, 130). Z tego względu pomiar krzywych topnienia dla kwadrupleksów przeprowadzany jest przy długości fali 295 nm, przy której wartość absorpcji jest mniejsza, jednakże, w czasie topnienia zmienia się o ~ 50%, ukazując jednocześnie charakterystyczny odwrócony profil krzywej topnienia (Rys. 32 A) (129, 130). Spadek absorpcji przy 295 nm wraz ze wzrostem temperatury spowodowany jest stopniową dysocjacją G-tetrad (129). Krzywe topnienia rejestruje się najczęściej w celu sprawdzenia, czy dana cząsteczka tworzy strukturę kwadrupleksu oraz w celu określenia stabilności powstającej struktury (21). Spektroskopia UV-Vis jest również szeroko stosowana w celu monitorowania wpływu, m. in. rodzaju i stężenia jonu (20, 131, 132), zmiany sekwencji (131, 133, 134), czy modyfikacji reszty cukrowej (90, 135, 136) na trwałość termodynamiczną kwadrupleksu.

Absorpcyjne widma różnicowe (TDS) powstają w wyniku odjęcia widm rejestrowanych w fali ciągłej, w przedziale ~ 220 – 350 nm, w temperaturach powyżej i poniżej temperatury topnienia (21). Widma TDS mają charakterystyczny profil zależny od struktury jaką przyjmują kwasy nukleinowe. Zostały one zidentyfikowane na podstawie widm wykonanych dla 200 różnych oligonukleotydów, reprezentujących wszystkie znane motywy strukturalne (137). Wykazano, że dla kwadrupleksów profil TDS zawiera charakterystyczne ujemne pasmo przy długości fali 295 nm i dwa pasma dodatnie ~ 240 i 270 nm (Rys. 32 B). Niestety, nie jest to metoda, która może samodzielnie dostarczyć dowodów na istnienie struktury kwadrupleksu, ponieważ bardzo podobne profile TDS posiadają struktury Z-DNA, dupleksy z parami zasad typu Hoogsteena, i-motywy

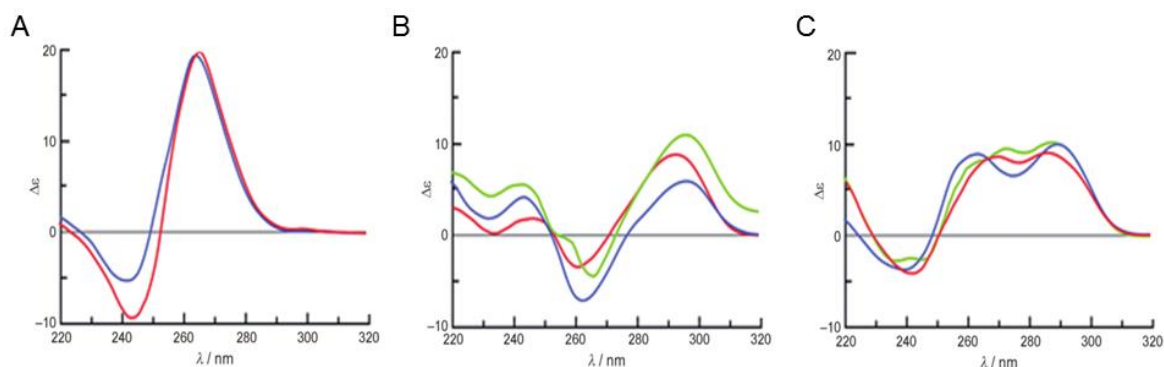
oraz trypleksy (137), niemniej jednak, może ona być stosowana jako metoda uzupełniająca.



Rys. 32. (A) Przykładowa krzywa topnienia kwadrupleksu RNA otrzymana przy długości fali 295 nm. (B) Przykład typowego widma TDS dla kwadrupleksu RNA.

3.3.3. Spektroskopia dichroizmu kołowego - CD

Widmo CD (ang. *Circular Dichroism Spectroscopy*) jest wynikiem różnicy w absorpcji światła spolaryzowanego kołowo lewo- i prawoskrętnie przez cząsteczki optycznie czynne (chiralne) (138). Dla kwadrupleksów widmo to jest rejestrowane w zakresie 220 – 320 nm, w którym dla każdego typu topologii (równoległa, antyrównoległa, hybrydowa) występują charakterystyczne maksima i minima (139–143). Równoległe kwadrupleksy posiadają maksimum przy długości fali ~ 260 nm i minimum przy 240 nm, dla antyrównoległych kwadrupleksów charakterystyczne jest występowanie minimum przy 265 nm i maksimum przy 295 nm, natomiast w przypadku kwadrupleksów hybrydowych wyróżnić można minimum przy ~ 240 nm oraz maksima przy 255 nm, 270 nm i 290 nm. Na rysunku 33 przedstawione zostały przykładowe widma CD dla każdego typu kwadrupleksu. Niestety widma CD równoległych kwadrupleksów są podobne do widm dupleksów typu A-RNA, uniemożliwiając tym samym jednoznaczne potwierdzenie powstawania kwadrupleksu o takiej topologii tylko na podstawie widm CD (138).



Rys. 33. Przykładowe widma CD dla kwadrupleksu o topologii (A) równoległej, (B) antyrównoległej i (C) hybrydowej (reprodukcja za zgodą © John Wiley and Sons) (141).

Spektroskopia CD jest również stosowana w celu sprawdzenia wpływu typu jonów (20, 92, 144–148), zmiany sekwencji (20, 131, 133, 134, 146, 147), czy modyfikacji (33, 90, 149, 150) na topologię kwadrupleksu. Dla przykładu, w 2009 roku Joachimi A., i inni, wykorzystując spektroskopię CD porównywali topologię oraz termiczną stabilność sześciu par sekwencji kwadrupleksów DNA i RNA w obecności jonów Na^+ i K^+ . Najważniejsze wnioski płynące z tej pracy są następujące: kwadrupleksy RNA zawsze przyjmują topologię równoległą, natomiast kwadrupleksy DNA mogą być równoległe lub antyrównoległe; kwadrupleksy RNA są bardziej stabilne termicznie w porównaniu z odpowiednimi sekwencjami w serii DNA. Niezależnie od rodzaju kwasu nukleinowego (DNA, czy RNA), kwadrupleksy formowane w obecności kationów potasu wykazują większą stabilność termiczną, o co najmniej 20°C , w porównaniu z kwadrupleksami powstałymi w obecności kationów sodu (151).

3.3.4. Spektrometria mas

Spektrometria mas z jonizacją za pomocą elektrorozpraszania (ESI-MS, ang. *Electrospray Mass Spectrometry*) jest użytecznym narzędziem pozwalającym na badanie, między innymi, liczby nici zaangażowanych w tworzenie kwadrupleksu (57, 152–155), oddziaływań ligand-kwadrupleks (156–158), przemian strukturalnych (159–161), czy kinetyki tworzenia struktury kwadrupleksu (162, 153). W 2011 roku Yuan G., i inni, opublikowali pracę przeglądową na temat zastosowania spektrometrii mas w badaniach kwadrupleksów DNA (163). Niewątpliwymi zaletami tej metody są jej czułość i dokładność, szybkość prowadzonych analiz oraz zużycie małej ilości materiału.

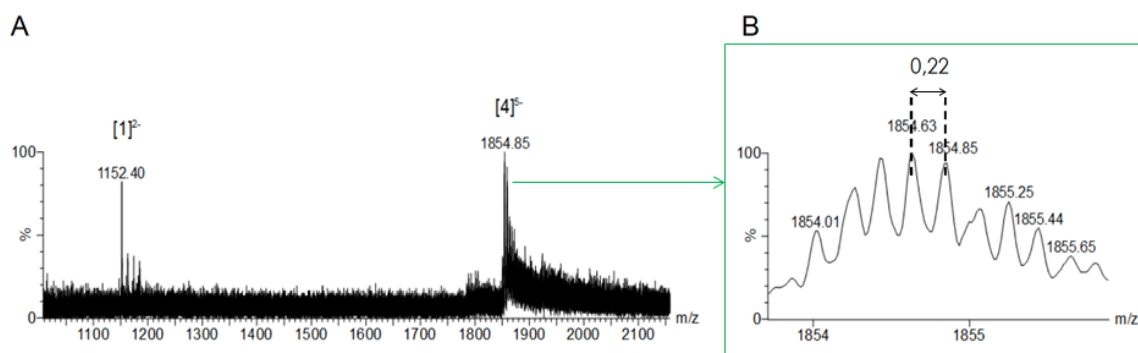
ESI-MS polega na jonizacji cząsteczki w celu wygenerowania dodatnio lub ujemnie naładowanych cząsteczek lub fragmentów cząsteczek, zwanych jonami molekularnymi, dla których mierzony jest stosunek masy do ładunku (m/z). W przypadku pomiarów wykonywanych dla kwadrupleksów ważne jest stosowanie możliwie łagodnych warunków jonizacji, aby zapobiec fragmentacji kwasów nukleinowych. W trakcie pomiaru generowane są ujemne jony, powstające przez deprotonację łańcucha fosfodiesterowego. W celu uzyskania możliwie najbardziej łagodnych warunków jonizacji, wymagających niestandardowej kalibracji aparatu, metoda ta wciąż wymaga doświadczonego operatora. Dr Valérie Gabelica opracowała protokół, który pozwala uzyskać optymalne warunki eksperymentów ESI-MS dla różnych typów struktur kwasów nukleinowych (164). Zwraca ona przede wszystkim uwagę na unikanie stosowania kationów sodu lub potasu, ponieważ w procesie powstawania jonów molekularnych kondensują się one wokół ujemnie naładowanego łańcucha DNA lub RNA i tworzą niespecyficzne addukty $[DNA/RNA + n Na^+/K^+]$, co znacząco pogarsza jakość widm masowych oraz dokładność i czułość pomiarów. Jednocześnie jako optymalne wskazuje zastosowanie roztworu 150 mM octanu amonu, ponieważ w czasie powstawania jonów molekularnych, jony CH_3COO^- odparowują, a protony od nieskoordynowanych wewnątrz struktury kwadrupleksu jonów NH_4^+ są przenoszone do ujemnie naładowanego łańcucha fosfodiesterowego (grup PO^-), pozwalając na swobodne odparowanie w postaci NH_3 . Dzięki temu praktycznie nie występują niespecyficzne addukty, a widmo jest czytelne i łatwe w interpretacji. W celu określenia liczby nici tworzących strukturę kwadrupleksu, na podstawie zmierzonej wartości m/z , należy najpierw określić jego masę cząsteczkową. Wartość m/z kryje w sobie również informację o liczbie skoordynowanych wewnątrz struktury jonów, która z kolei może pomóc w określeniu liczby G-tetrad składających się na daną strukturę kwadrupleksu (157). Aby możliwe było uzyskanie tych informacji należy zastosować wzór:

$$m/z = (n \times m_{NA} + (t - 1) \times 17 - z) / z$$

gdzie: n – liczba nici DNA lub RNA; m_{NA} – masa cząsteczkowa DNA lub RNA [Da]
 t – liczba G-tetrad; z – ładunek jonu; wyrażenie $(t - 1)$ odpowiada liczbie jonów NH_4^+ ; 17 – to przybliżona masa molowa jonu NH_4^+ .

Poznanie wartości ładunku jonu, z , jest możliwe, jeśli widmo MS ma wysoką rozdzielczość, która umożliwi odczytanie rozkładu izotopowego danego jonu molekularnego, czyli różnicy w wartości masy poszczególnych izotopów, ponieważ jest ona równa $1/z$. Czyli, jeśli różnica masy kolejnych izotopów wynosi 0.5, to ładunek jonu, z , jest równy 2; jeśli 0.33, to $z = 3$; jeśli 0.25, to $z = 4$; itd.

Dla przykładu, masa cząsteczkowa, m_{NA} , dla r(AGGAGGA) wynosi 2306.50 Da, a odczytana z widma ESI-MS wartość m/z wynosi 1854.85 (Rys. 34 A). Odległość pomiędzy pikami odpowiadającymi poszczególnym izotopom wynosi 0.22 (Rys. 34 B), czyli ładunek jonu molekularnego, z , jest równy 5 ($1/5 = 0.2$). W miejsce n podstawiamy najwyższą możliwą liczbę naturalną, która pomnożona przez wartość m_{NA} da wynik zbliżony do wyniku otrzymanego z równania $m/z \times z$ ($1854.85 \times 5 = 9274.25$). W tym przypadku jest to liczba 4 ($4 \times 2306.50 = 9226$), czyli struktura jest utworzona z czterech nici kwasu nukleinowego. W celu obliczenia liczby skoordynowanych jonów NH_4^+ , oraz liczby G-tetrad stabilizujących kwadrupleks główne równanie należy przekształcić do postaci: $(m/z \times z - n \times m_{NA} + z)/17 = (t - 1)$. Podstawiając uzyskane wcześniej wartości otrzymujemy: $(9274.25 - 9226)/17 = 2.8$. Wynik ten wskazuje, że kwadrupleks AGGAGGA jest stabilizowany przez 3 jony NH_4^+ i najprawdopodobniej składa się z czterech G-tetrad ($t - 1 = 3$, więc $t = 4$) (21).

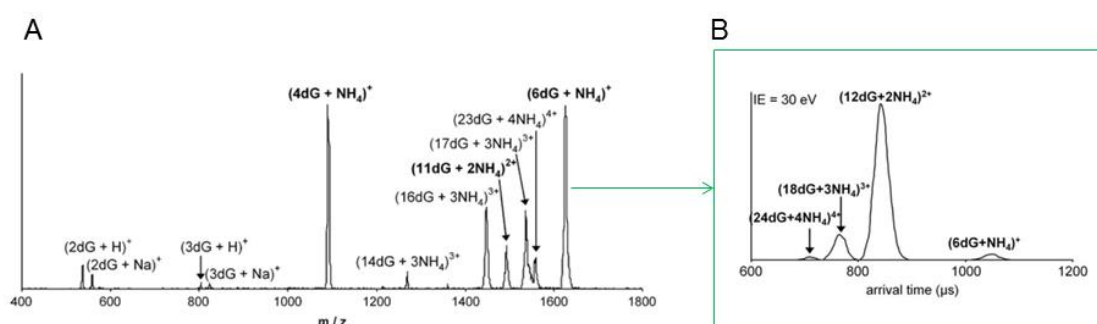


Rys. 34. (A) Widmo ESI-MS cząsteczki r(AGGAGGA). (B) Przybliżenie jonu molekularnego odpowiadającego czteroniciowej strukturze, z którego można odczytać odległość pomiędzy pikami odpowiadającymi poszczególnym izotopom.

Widma ESI-MS zarejestrowane dla próbek przygotowanych w roztworach wodnych charakteryzuje mała intensywność sygnałów jonów molekularnych. Dzieje się tak ze względu na wysokie napięcie powierzchniowe tworzonych kropli, co spowalnia proces odparowywania rozpuszczalnika i w efekcie mniej jonów

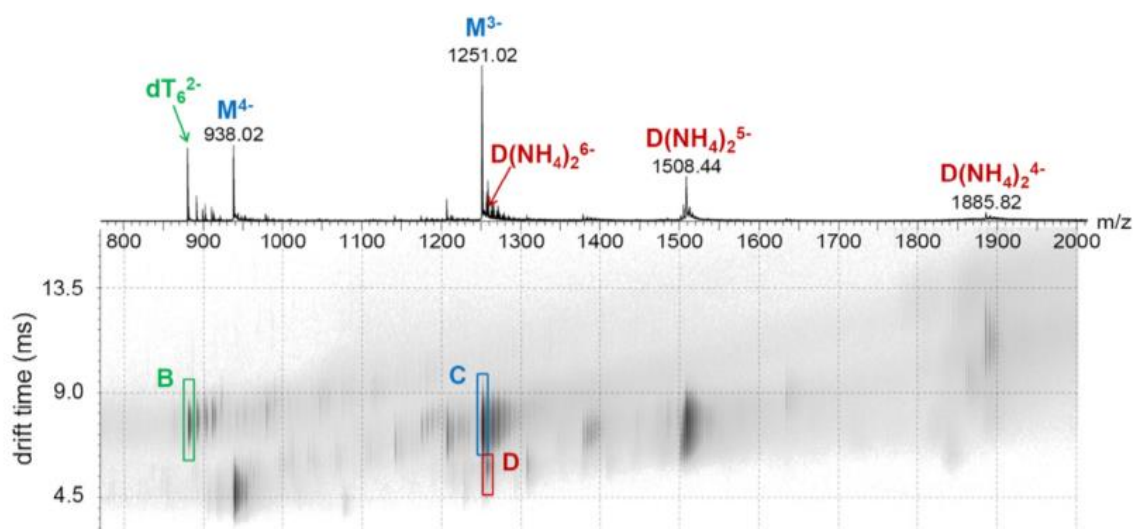
dociera do detektora (21). W celu poprawy intensywności sygnałów, na krótko przed rozpoczęciem pomiaru widma stosuje się 10 – 20% (v/v) dodatek metanolu (161).

Spektrometria mobilności jonów, IMS (ang. *Ion Mobility Spectrometry*) połączona ze spektrometrem mas (IMS-MS) pozwala rozdzielić jony o danej wartości m/z na podstawie ich ruchliwości w komorze jonizacyjnej. Ruchliwość jonów jest bezpośrednio skorelowana z ich przekrojem czynnym (ang. *collision cross section*), czyli, w zasadzie, IMS pozwala rozdzielić jony w zależności od ich pola powierzchni (153). Mobilność jonu zależy od jego właściwości, takich jak: ładunek (ze wzrostem ładunku jonu, z , wzrasta jego mobilność, a czas dryfowania jonu w komorze (ang. *drift time*) maleje) i przekrój czynny jonu (im przekrój czynny jonu jest większy, tym czas dryfowania jonu w komorze jest dłuższy, a jego ruchliwość mniejsza) (161). Użyteczność tej techniki w badaniu kwadrupleksów wykazano po raz pierwszy dla próbki zawierającej różnej długości oligonukleotydy, zbudowane wyłącznie z reszt deoksyguanozyny, $(dG)_6$, $(dG)_{12}$, $(dG)_{18}$, $(dG)_{24}$ (165). W roztworze octanu amonu, odczytana z widma ESI-MS wartość m/z jest identyczna dla jonów molekularnych $(6dG + NH_4)^+$, $(12dG + 2 NH_4)^{2+}$, $(18dG + 3NH_4)^{3+}$ i $(24dG + 4 NH_4)^{4+}$, więc są one nierozróżnialne na widmie ESI-MS (na rysunku 35 A sygnał odpowiadający wymienionym jonom molekularnym został oznaczony jako $(6dG + NH_4)^+$). Natomiast w widmie mobilności jonów wyraźnie widoczne jest, że jednej wartości m/z odpowiadają cztery różne czasy przylotu (ang. *arrival time*), dowodząc, że w badanej próbce były obecne wszystkie cztery możliwe, wymienione powyżej formy (Rys. 35 B).



Rys. 35. (A) Widmo ESI-MS zarejestrowane dla próbki dG. Dla jonu molekularnego oznaczonego $(6dG + NH_4)^+$ w panelu (B) przedstawione zostało widmo IMS w zależności od czasu przylotu jonu molekularnego (reprodukcja za zgodą © Springer) (165).

W praktyce, współczesne spektrometry masowe umożliwiają rejestrację klasycznych widm masowych równocześnie z rejestracją widm mobilności jonów, dzięki czemu możliwa jest dokładniejsza analiza obecnych w roztworze form (133, 153, 161, 166–170). Wyniki uzyskane metodą IMS-MS mogą być również przedstawione w postaci widma dwuwymiarowego w funkcji czasu dryfowania jonu w komorze i wartości m/z . Tak przedstawione dane pozwalają łatwo zobrazować obecność w badanej próbce więcej niż jednej formy, odpowiadającej tej samej wartości m/z . Na przykład, na rysunku 36 przedstawione jest widmo masowe w funkcji czasu dryfowania jonu w komorze, otrzymane dla cząsteczki d(TAGGGATAGGGA). Jak widać na rysunku, wartości m/z równej 1251.02, odpowiadają dwa jony molekularne: forma jednoniciowa, bez skoordynowanych jonów amonu, zaznaczona na niebiesko (C) oraz forma dwuniciowa ze skoordynowanymi dwoma jonami amonu, zaznaczona na czerwono (D).



Rys. 36. Górny panel przedstawia widmo ESI-MS otrzymane dla cząsteczki d(TAGGGATAGGGA), natomiast dolny panel przedstawia dwuwymiarowe widmo IMS-MS. Na zielono zaznaczono zastosowany wzorzec intensywności sygnału (dT_6), natomiast kolory niebieski i czerwony zostały użyte w celu zaznaczenia odpowiednio jednoniciowej oraz dwuniciowej formy cząsteczki (reprodukcja za zgodą © Elsevier) (161).

3.3.5. Podsumowanie

Istnieje wiele metod eksperymentalnych, zarówno pośrednich, jak i bezpośrednich, dostarczających informacji na temat konformacji kwadrupleksów. W rozdziale tym skupiłam się jedynie na opisanu metod najczęściej stosowanych w badaniach kwadrupleksów oraz tych, które były zastosowane w czasie realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej. Niestety żadna z opisanych metod, pomimo licznych zalet, nie jest pozbawiona wad. W przypadku badań strukturalnych metodami spektroskopii NMR źródłem trudności jest przede wszystkim konieczność stosowania wysokich stężeń kwasów nukleinowych (powyżej 1 mM), przez co wzrasta prawdopodobieństwo powstawania agregatów. Otrzymana struktura może nie odpowiadać tej strukturze, która występuje w roztworze zawierającym małe stężenie DNA/RNA (~ 0.01 mM), standardowo stosowane w badaniach z zastosowaniem spektroskopii UV-Vis i CD. Dodatkowo, aby możliwe było poznanie struktury przestrzennej kwadrupleksu za pomocą spektroskopii NMR, konieczne jest otrzymanie w roztworze pojedynczej konformacji (co dla kwadrupleksów obserwowane jest niezwykle rzadko) lub w przypadku np. dwóch konformerów występujących w równowadze, konieczne jest otrzymanie wąskich, dobrze rozdzielonych sygnałów rezonansowych. Trudna i czasochłonna jest również interpretacja widm NMR, ze względu na różnorodność topologii kwadrupleksów oraz występowanie w ich strukturze motywów strukturalnych, które często są unikalne dla danej sekwencji.

Alternatywną metodą pozwalającą na poznanie struktury kwadrupleksu z wysoką rozdzielczością jest rentgenowska analiza strukturalna. To właśnie przy użyciu tej metody w 1962 roku po raz pierwszy pokazano, że oligonukleotydy poliguanozynowe układają się w czteroniciowe helisy, stabilizowane przez oddziaływania warstwowe pomiędzy G-tetradami (171). Struktury otrzymane metodami rentgenowskimi dostarczają informacji nie tylko o przestrzennym ułożeniu atomów, ale również o hydratacji kwadrupleksu, miejscach wiązania kationów, czy oddziaływaniach ligand-kwadrupleks (37). W tej metodzie czynnikiem determinującym szybkość procesu rozwiązywania struktury kwadrupleksu jest konieczność otrzymania dobrej jakości kryształu. Niejednokrotnie w celu jego uzyskania, do sekwencji badanej cząsteczki wprowadza się pojedyncze modyfikowane reszty nukleotydowe, np. 8-

bromoguanozynę (45). Ponadto testuje się różne warunki roztworu, które często są dalekie od warunków panujących w komórkach. W skład buforu krystalizacyjnego wchodzi zazwyczaj kilka jonów, oprócz typowych dla kwadrupleksów kationów potasu i sodu dodawane są jony Li^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , czy Sr^{2+} . Stosuje się również różnego rodzaju czynniki wytrącające (2-metylo-2,4-pentanodiol, glikol polietylenowy lub siarczan (VI) amonu) oraz duże stężenia RNA (zazwyczaj ~ 3 mM) (172). Z tego względu, wyciągając wnioski na temat funkcji pełnionej przez dany kwadrupleks, na podstawie struktury otrzymanej metodami rentgenowskimi, należy zachować szczególną ostrożność, gdyż struktura obserwowana w kryształach może być zupełnie różna od struktury obserwowanej w roztworze, czy w komórce. Dla przykładu, obserwowana przez dr Dorotę Gudanis struktura, jaką tworzy cząsteczka RNA o sekwencji GCGGCGGC w roztworze, to czteroniciowy kwadrupleks zawierający G-tetradę oraz mieszane tetrady G:C:G:C (Rys. 17 B), natomiast w kryształach ta sama cząsteczka występuje jako dupleks typu A-RNA, który zawiera zarówno kanoniczne pary zasad G:C oraz niedopasowania G:G (9).

Spektroskopia NMR i rentgenowska analiza strukturalna to jedyne metody pozwalające na poznanie struktury z wysoką rozdzielczością. Istnieją jednak niskorozdzielcze metody eksperymentalne dostarczające informacji o wielkości i kształcie powstającej w roztworze struktury. Są to: małokątowe rozpraszanie promieniowania rentgenowskiego - SAXS (ang. *Small-angle X-ray scattering*) oraz dynamiczne rozpraszanie światła - DLS (ang. *Dynamic Light Scattering*). Przy użyciu obu tych technik pokazano, między innymi, że 5'-monofosforan guanozyny w roztworze zawierającym jony potasu jest zdolny do samoorganizacji w agregaty zbudowane z oddziałujących warstwowo G-tetrad (173–175). Technika DLS może być stosowana w celu sprawdzenia możliwości blokowego ułożenia kwadrupleksów w długie struktury przypominające przewody (stąd angielska nazwa *G-wires*), które mogą znaleźć zastosowanie w nanotechnologii, a w szczególności w elektronice molekularnej (176, 177). Natomiast przy pomocy analizy danych SAXS można udowodnić istnienie danej struktury w roztworze. Porównując kształt cząsteczki DNA o sekwencji telomerowej, $(\text{TTAGGG})_4$, z innymi strukturami o podobnych sekwencjach pokazano, że struktura przyjmowana przez tę cząsteczkę w roztworze zawierającym 0.1 mM KCl, swoim kształtem odpowiada strukturze równoległego kwadrupleksu DNA tworzonych przez $\text{TAGGG}(\text{TTAGGG})_3$ (178). Metoda SAXS dostarczyła dr Dorocie Gudanis jednoznacznego dowodu,

że w roztworze cząsteczka GC^{Br}GGCGGC tworzy strukturę kwadrupleksu, co było bardzo trudne do udowodnienia innymi metodami (publikacja w przygotowaniu).

Jedną z największych wad niskorozdzielczych metod, takich jak spektroskopia UV-Vis i CD jest brak możliwości identyfikacji mieszaniny konformerów obecnych w badanej próbce. Takiej informacji, oprócz widm NMR, dostarczyć może również spektrometria mas. Ograniczeniem metody ESI-IMS-MS jest z kolei konieczność unikania kationów sodu i potasu, przez co pomiary są prowadzone w roztworze octanu amonu. Struktura obserwowana w obecności NH₄OAc może być inna niż struktura powstająca w buforze fosforanowym z dodatkiem chlorku sodu lub potasu, typowo stosowanym do badań kwadrupleksów. Ponadto do rutynowych pomiarów widm ESI-IMS-MS stosowane jest bardzo małe stężenie DNA/RNA, rzędu 0.005 mM, co również może prowadzić do powstania innej struktury. W celu oszacowania liczby nici tworzących strukturę kwadrupleksu oraz dla sprawdzenia strukturalnej homogenności próbki, zamiast spektrometrii mas stosuje się często badanie szybkości migracji cząsteczek kwasów nukleinowych w żelu poliakrylamidowym (PAGE, ang. *Poliacrylamide Gel Electrophoresis*) (38). Ruchliwość elektroforetyczna cząsteczki kwadrupleksu zależy, między innymi, od ładunku oraz od pola powierzchni powstającej struktury, dlatego, w celu interpretacji wyników należy zastosować wzorce wielkości, których dobranie jest niezwykle trudne. Dla dupleksów DNA i RNA, wielkość powstającej struktury jest skorelowana z liczbą par zasad wchodzących w skład danej struktury, a jako wzorzec stosuje się marker mas, tzw. drabinę, który składa się z fragmentów o ściśle zdefiniowanej liczbie par zasad. Niestety, do badań kwadrupleksów nie można zastosować takiego markera, ze względu na ich różnorodność strukturalną i trudność w przewidywaniu jego topologii jedynie na podstawie sekwencji.

Jak się okazuje, nie istnieje jedna idealna metoda, którą można by zastosować w celu poznania topologii kwadrupleksu, a obraz struktury występującej w środowisku komórkowym można uzyskać jedynie przez zastosowanie kilku metod równocześnie.

WYNIKI

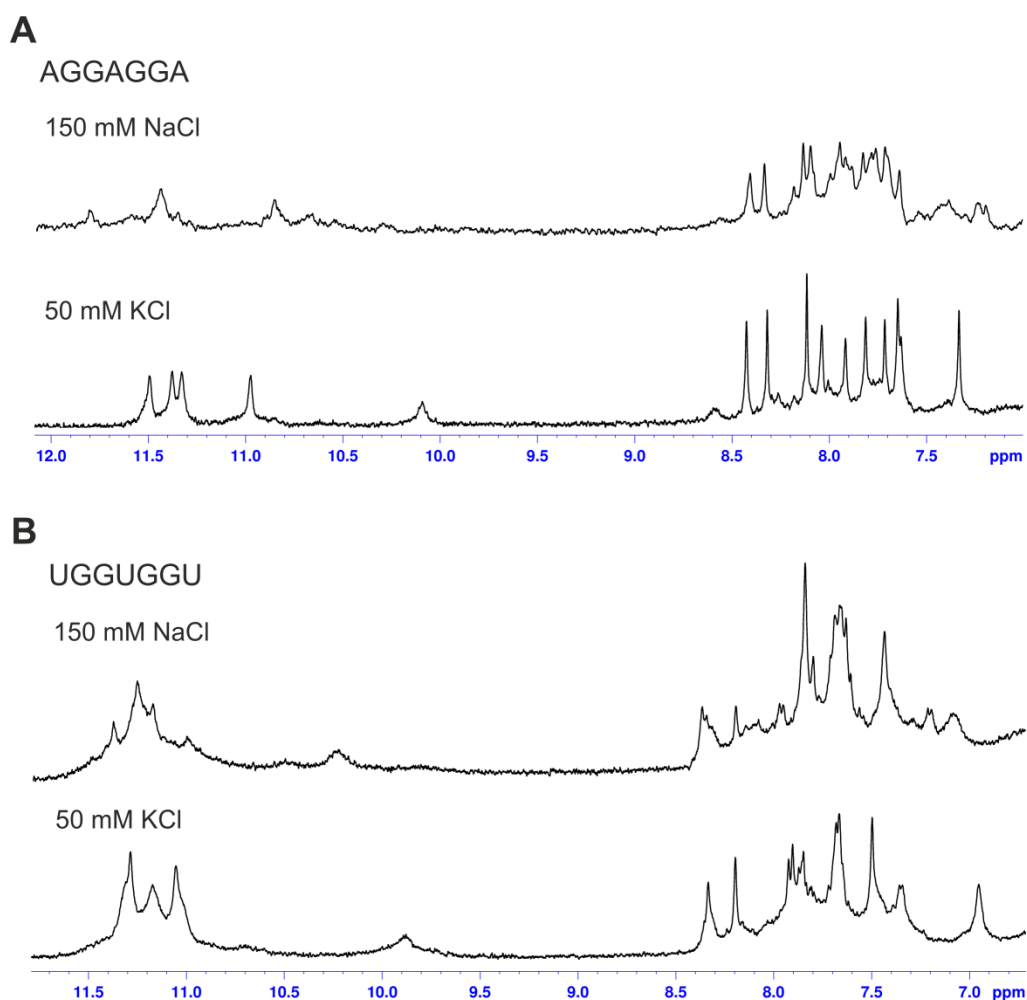
4. WYNIKI BADAŃ WŁASNYCH

4.1. Optymalizacja warunków pomiaru widm NMR

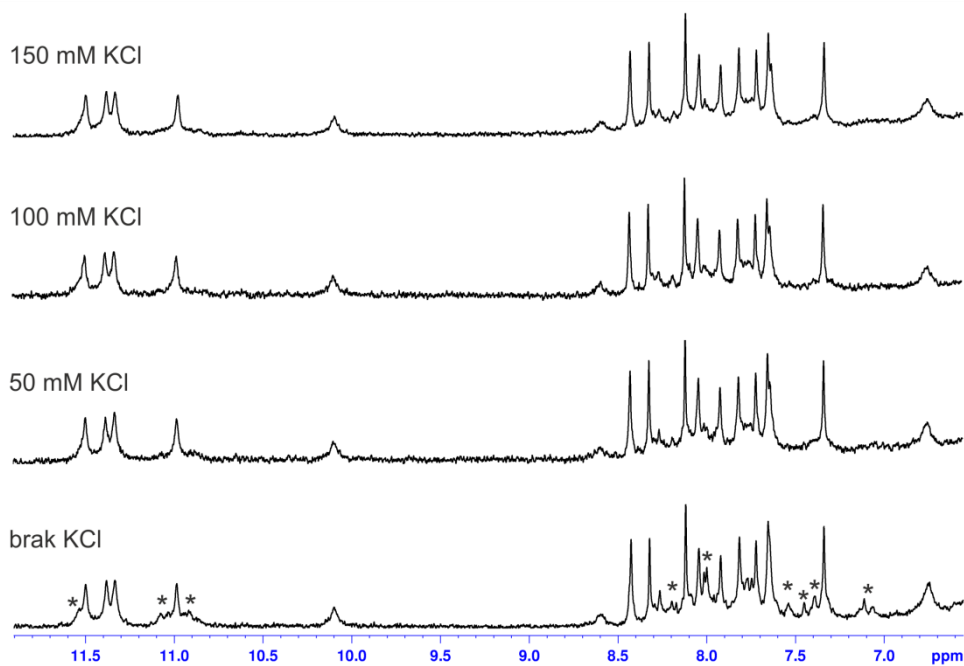
Przeprowadzone przeze mnie badania początkowo miały na celu zbadanie wpływu różnych czynników na widma NMR badanych cząsteczek. Badaniom tym poddałam dwie cząsteczki RNA o sekwencjach AGGAGGA ((AGG)₂A) oraz UGGUGGU ((UGG)₂U). Rysunek 37. obrazuje wpływ typu kationu na widmo ¹H NMR cząsteczek (AGG)₂A (Rys. 37 A) i (UGG)₂U (Rys. 37 B). W obu przypadkach, w roztworze zawierającym kationy potasu dominuje jedna forma kwadrupleksu, natomiast w roztworze zawierającym kationy sodu współistnieją co najmniej dwie różne struktury. Jak sprawdziłam, stężenie jonów K⁺ nie ma dużego wpływu na ostateczną formę powstającego kwadrupleksu. Jedynie widmo zarejestrowane dla (AGG)₂A tylko w buforze, bez dodatku soli (10 mM fosforan potasu), różniło się nieznacznie od pozostałych widm. Oprócz sygnałów rezonansowych odpowiadających głównej formie kwadrupleksu, widoczne były dodatkowe sygnały o znacznie mniejszej intensywności w regionach iminowym i aromatycznym widma ¹H NMR, które zanikały wraz ze wzrostem stężenia soli (Rys. 38, zaznaczone gwiazdkami). Sygnały te mogły pochodzić od alternatywnej struktury kwadrupleksu oraz od nieustrukturalizowanej nici RNA. Do dalszych badań NMR, jako optymalny, uznałam dodatek 50 mM KCl. Już tak niewielki dodatek soli okazał się być wystarczający, aby badane przeze mnie cząsteczki przyjmowały w roztworze pojedynczą formę. Zależało mi na jak najmniejszym stężeniu soli, ponieważ wraz ze wzrostem przewodnictwa próbki maleje czułość stosowanej do pomiarów głowicy kriogenicznej, co prowadzi do pogorszenia jakości otrzymywanych widm NMR.

Liczba sygnałów rezonansowych w widmie (UGG)₂U odpowiadała pojedynczej formie kwadrupleksu, jednakże sygnały te nie schodziły do linii bazowej, tworząc charakterystyczną górkę. Powszechnie uważa się, że obecność takich szerokich sygnałów wskazuje na tworzenie się w roztworze niespecyficznych agregatów struktur kwadrupleksowych, np. w wyniku oddziaływań warstwowych pomiędzy tetradami z końców 5' (typ: głowa-do-głowy, ang. *head-to-head*), z końców 3' (typ: ogon-do-ogona, ang. *tail-to-tail*) lub z końców 5' i 3' (typ: głowa-do-ogona, ang. *head-to-tail*) (177). Jak pokazał M.K. Uddin, i inni, zastosowanie dodatkowej grupy fosforanowej na końcu 5' sekwencji kwadrupleksowej często

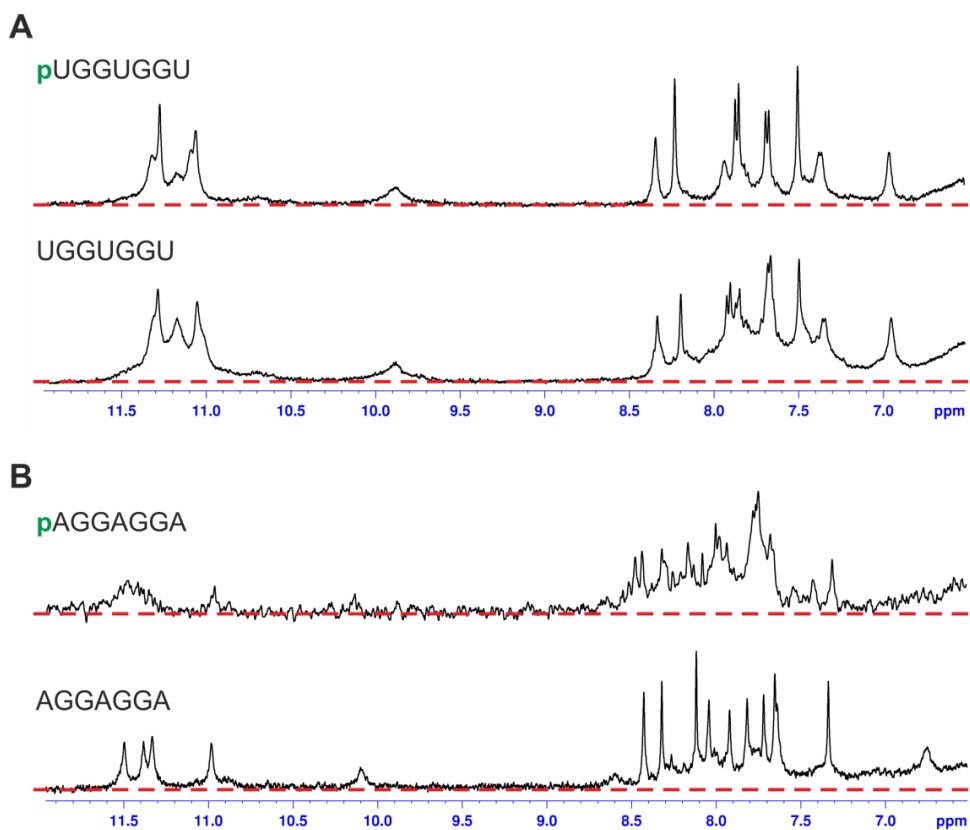
przyczynia się do poprawy jakości widma, gdyż obecność dodatkowego ładunku zapobiega powstawaniu agregatów (179). Również w moim przypadku, zastosowanie tej grupy wpłynęło na poprawę widma ^1H NMR cząsteczki $(\text{UGG})_2\text{U}$. Linie rezonansowe stały się węższe, lepiej rozdzielone i bardziej schodzące do linii bazowej (Rys. 39 A). Jednakże, w przypadku $(\text{AGG})_2\text{A}$, której sygnały schodziły do linii bazowej, dodatkowa grupa fosforanowa na końcu 5' wywołała efekt destabilizujący, co w widmie ^1H NMR objawiło się znacznym poszerzeniem linii rezonansowych (Rys. 39 B).



Rys. 37. Widma ^1H NMR zarejestrowane dla (A) $(\text{AGG})_2\text{A}$ oraz (B) $(\text{UGG})_2\text{U}$ w zależności od obecnego w roztworze jonu [bufor: 10 mM fosforan sodu lub potasu, 0.1 mM EDTA, 90% H_2O : 10% D_2O , v:v, pH 6.8, 25 °C]



Rys. 38. Widma ^1H NMR zarejestrowane dla $(\text{AGG})_2\text{A}$ w zależności od stężenia KCl. Gwiazdkami zaznaczono dodatkowe sygnały pojawiające się w widmie próbki bez dodatku soli [bufor: 10 mM fosforan potasu, 0.1 mM EDTA, 90% H_2O : 10% D_2O , v:v, pH 6.8, 25 °C]



Rys. 39. Wpływ dodatkowej grupy fosforanowej na końcu 5' na widma ^1H NMR (A) $(\text{UGG})_2\text{U}$ oraz (B) $(\text{AGG})_2\text{A}$ [bufor: 50 mM KCl, 10 mM fosforan potasu, 0.1 mM EDTA, 90% H_2O : 10% D_2O , v:v, pH 6.8, 25 °C]

W tabeli 4. zestawiałam wyniki badań, podsumowujące moje poszukiwania cząsteczki RNA, którą mogłabym poddać dalszym badaniom z zastosowaniem wysokorozdzielczej spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego. Badania te prowadziłam nie tylko stosując opisane powyżej eksperymenty ^1H NMR, ale również wykorzystując spektroskopię CD, UV-Vis oraz spektrometrię mas. Otrzymane widma zamieściłam w załączniku nr 3 do niniejszej dysertacji.

Tabela 4. Wyniki badań wstępnych, mających na celu identyfikację cząsteczki, która w warunkach NMR przyjmowałaby pojedynczą formę kwadrupleksu. Widma obrazujące zebrane w tabeli wyniki stanowią załącznik nr 3.

Sekwencja	NMR	CD	TDS (ujemne pasmo $\lambda = 295 \text{ nm}$)	ESI-MS
AGGAGGA	pojedyncza forma	równoległy kwadrupleks	✓	$[4 m_{\text{NA}} + 3\text{NH}_4^+]^{5-}$
GAGGAGGA	mieszanina form	równoległy kwadrupleks	✓	$[1 m_{\text{NA}}]^{2-}$
pAGGAGGA	mieszanina form	równoległy kwadrupleks	brak danych	$[4 m_{\text{NA}} + 3\text{NH}_4^+]^{5-}$
pGAGGAGGA	mieszanina form	równoległy kwadrupleks	brak danych	brak danych
UGGUGGU	agregacja	równoległy kwadrupleks	✓	$[4 m_{\text{NA}} + 5\text{NH}_4^+]^{5-}$
GUGGUGGU	mieszanina form	równoległy kwadrupleks	✓	$[1 m_{\text{NA}}]^{2-}$
UGGUGGUG	mieszanina form	równoległy kwadrupleks	brak danych	brak danych
pUGGUGGU	pojedyncza forma	równoległy kwadrupleks	✓	$[4 m_{\text{NA}} + 5\text{NH}_4^+]^{5-}$
pGUGGUGGU	mieszanina form	równoległy kwadrupleks	✓	brak danych

Badania wstępne ukazały, że wiele czynników wpływa na strukturę kwadrupleksów utworzonych z cząsteczek zbudowanych z powtórzeń AGG i UGG. Z tego względu wybrane cząsteczki poddałam szczegółowym, systematycznym badaniom z użyciem spektroskopii NMR, UV-Vis i CD oraz spektrometrii mas. Sprawdziłam, jaki wpływ na tworzące się w roztworze struktury ma obecność jonów K^+ , Na^+ oraz NH_4^+ . Pierwsze dwa występują w komórce oraz są znanymi stabilizatorami struktury kwadrupleksu, natomiast kation amonu wybrałam ze względu na planowane badania z wykorzystaniem ESI-IMS-MS (164). Bardzo ważne było dla mnie również sprawdzenie, czy struktura jaką obserwuje się w warunkach pomiaru NMR jest taka sama jak struktura obserwowana w warunkach pomiaru UV-Vis, CD i ESI-IMS-MS. W tym celu przygotowałam roztwory zawierające 0.01 mM stężenie RNA, które stosowałam do pomiarów UV-Vis, CD i 1H NMR. Jedynie metoda ESI-IMS-MS wymagała odmiennego przygotowania próbki. Otrzymane widma 1H NMR porównywałam z widmami zarejestrowanymi dla próbek zawierających stężenie RNA rzędu 1 mM, standardowo używane w naszej pracowni do badań NMR.

Dla cząsteczek $(AGG)_2A$ oraz $p(UGG)_2U$ równolegle prowadziłam badania strukturalne z wykorzystaniem metod wysokorozdzielczej spektroskopii NMR, które miały na celu poznanie topologii kwadrupleksu tworzącego się w roztworze.

4.2. Analiza widm ^1H NMR, UV-Vis, CD i ESI-IMS-MS w obecności jonów K^+ , Na^+ i NH_4^+

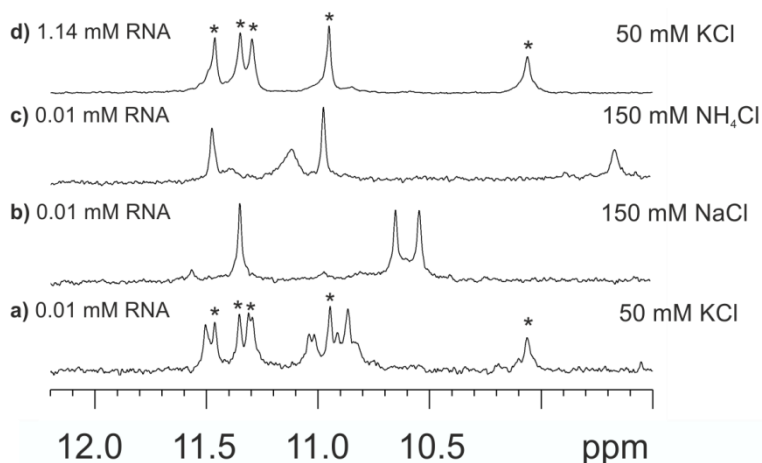
4.2.1. Analiza widm ^1H NMR

Moje badania rozpoczęłam od porównania widm ^1H NMR wykonanych w różnych warunkach roztworu. Na rysunkach 40 – 45 pokazane są widma ^1H NMR cząsteczek AGGAGGA (Rys. 40), 2'-O-Me AGGAGGA (Rys. 41), AGGAGGAGGAGGA (Rys. 42), UGGUGGU (Rys. 43), pUGGUGGU (Rys. 44) i pUGGUGGUGGUGGU (Rys. 45), w obecności jonów K^+ , Na^+ i NH_4^+ (Rys. 40-45, a-c). Widma te, otrzymane dla 0.01 mM stężenia RNA porównane są w każdym przypadku z widmem zarejestrowanym dla bardziej stężonej próbki znajdującej się w buforze fosforanowym z dodatkiem 50 mM KCl (Rys. 40-45, d). Dla przejrzystości pokazany jest tylko zakres, w którym występują protony iminowe i niektóre związane wodorowo protony aminowe.

AGGAGGA

W widmie ^1H NMR zarejestrowanym dla cząsteczki $(\text{AGG})_2\text{A}$ w roztworze zawierającym 0.01 mM RNA i jony K^+ , obserwowałam 11 sygnałów iminowych (Rys. 40 a). Wskazywało to na współistnienie trzech różnych form kwadrupleksu, z których jedna odpowiadała formie dominującej przy wyższym stężeniu RNA (Rys. 40 d - sygnały zaznaczone gwiazdką). Analiza widma otrzymanego dla próbki zawierającej jony NH_4^+ sugerowała, że cząsteczka $(\text{AGG})_2\text{A}$ przyjmuje pojedynczą formę (Rys. 40 c). Pomimo, że w tych warunkach dwa sygnały ulegają silnemu poszerzeniu, jednak przesunięcia chemiczne dwóch pozostałych protonów (10.97 ppm i 11.47 ppm) nie ulegają zmianie w stosunku do widma stężonej próbki (Rys. 40 d). Sugeruje to, że w obu warunkach roztworu powstają takie same struktury. Obserwowane poszerzenie sygnałów może być następstwem mniejszej stabilności kwadrupleksu w obecności jonów NH_4^+ . Ponieważ widma rejestrowałam w temperaturze 25 °C, poszerzenie sygnałów może być efektem częściowego rozplatania się struktury. Także w obecności jonów Na^+ zaobserwowałam występowanie pojedynczej formy (Rys. 40 b). Jednakże przesunięcia chemiczne sygnałów iminowych różnią się znacząco od sygnałów obserwowanych dla próbek zawierających kationy potasu i amonu, co sugeruje, że kationy sodu prawdopodobnie promują powstawanie innej formy

kwadrupleksu. Należy jednak podkreślić, że obserwowane zmiany nie stanowią jednoznacznego dowodu na obecność różnych struktur. Źródłem zmian przesunięć chemicznych poszczególnych protonów mogą być również zmiany otoczenia iminowych atomów wodoru, będące następstwem różnych kationów znajdujących się pomiędzy G-tetradami.

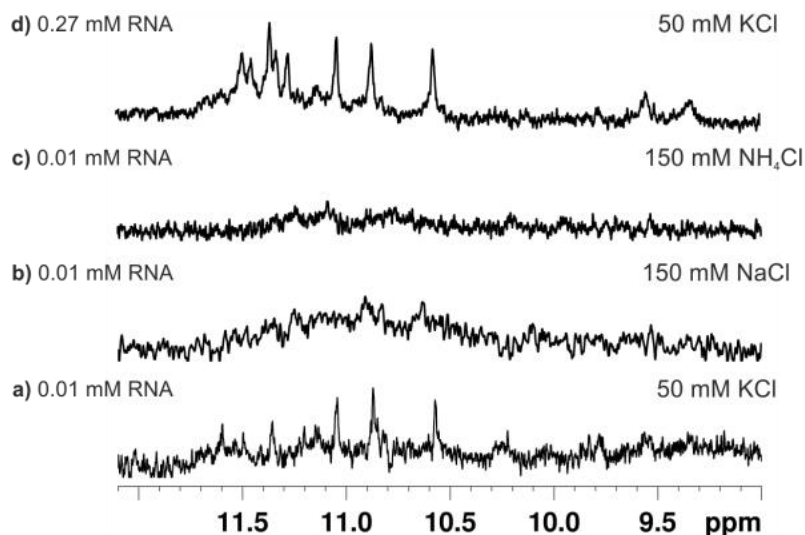


Rys. 40. Widma ^1H NMR zarejestrowane dla $(\text{AGG})_2\text{A}$ w zależności od rodzaju zastosowanego jonu oraz stężenia RNA.

2'-O-Me AGGAGGA

Z danych literaturowych wynika, że modyfikacja reszty cukrowej grupą 2'-O-Me wpływa na wzrost stabilności czteroniciowych kwadrupleksów (33). Może to wynikać z faktu, że dodatkowa grupa metylowa podstawiona w miejsce atomu wodoru grupy 2' hydroksylowej powoduje usztywnienie reszty cukrowej w konformacji $\text{C3}'_{\text{endo}}$. Postanowiłam sprawdzić wpływ tej modyfikacji na strukturę cząsteczki $(\text{AGG})_2\text{A}$.

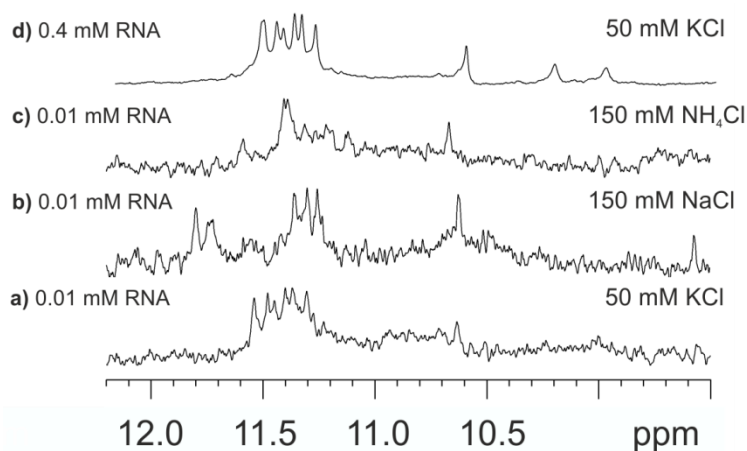
Widma ^1H NMR zarejestrowane dla cząsteczki 2'-O-Me $(\text{AGG})_2\text{A}$ są przedstawione na rysunku 41. Sygnały rezonansowe świadczące o powstawaniu struktury kwadrupleksu zaobserwowałam tylko w widmach zarejestrowanych w obecności jonów K^+ (Rys. 41 a, d). Jednakże liczba tych sygnałów była większa niż liczba reszt guanozyny w sekwencji, co wskazywało na współistnienie kilku form w roztworze, niezależnie od stężenia RNA. Z kolei w obecności kationów amonu lub sodu nie obserwowałam żadnych ostrych sygnałów w rejonie 10-12 ppm (Rys. 41 b, c), a jedynie bardzo szerokie sygnały o małej intensywności, co mogło świadczyć o obecności agregatów.



Rys. 41. Widma ^1H NMR zarejestrowane dla 2'-O-Me (AGG) $_2$ A w zależności od rodzaju zastosowanego jonu oraz stężenia RNA.

AGGAGGAGGAGGA

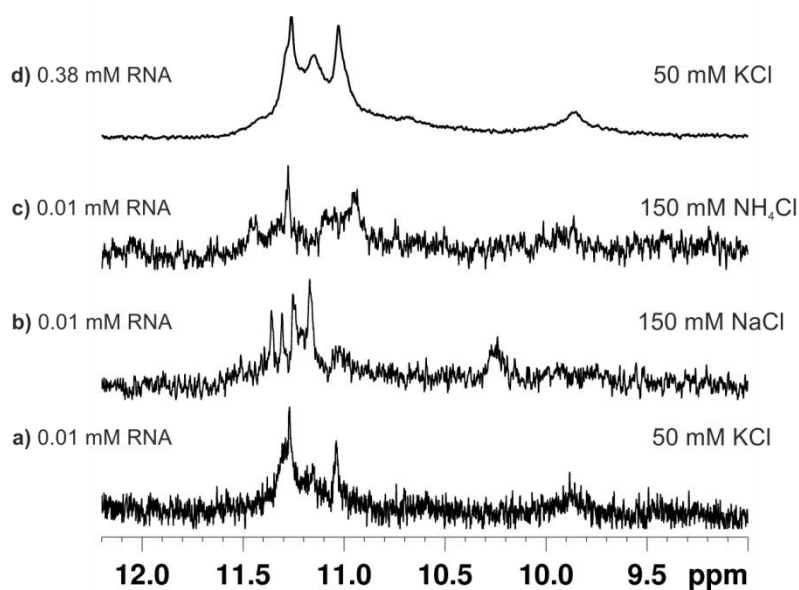
Niezależnie od stężenia RNA, w roztworze zawierającym kationy potasu, widmo ^1H NMR cząsteczki AGGAGGAGGAGGA ((AGG) $_4$ A) wskazywało na występowanie pojedynczej formy kwadrupleksu (Rys. 42 a, d). Widmo otrzymane w obecności kationów amonu było trudne do interpretacji ze względu na znaczne poszerzenie sygnałów rezonansowych. Z kolei widmo zarejestrowane dla roztworu zawierającego kationy sodu różniło się od widma zarejestrowanego dla roztworu zawierającego kationy potasu, co wspólnie z wynikami otrzymanymi dla (AGG) $_2$ A, sugeruje, że dla powtórzeń AGG kationy sodu promują inną formę kwadrupleksu niż kationy potasu i amonu.



Rys. 42. Widma ^1H NMR zarejestrowane dla (AGG) $_4$ A w zależności od zastosowanego jonu oraz stężenia RNA.

UGGUGGU

Pomimo małego stosunku sygnału do szumu w widmach ^1H NMR, zarejestrowanych dla próbki $(\text{UGG})_2\text{U}$ zawierającej 0.01 mM RNA, w obecności jonów K^+ , można zauważyć, że sygnały rezonansowe posiadają takie same przesunięcia chemiczne jak sygnały w widmie zarejestrowanym dla stężenia RNA wynoszącego 0.38 mM (Rys. 43 a, d). Oznacza to, że struktura, jaką przyjmuje ta cząsteczka w obecności kationów potasu jest taka sama, niezależnie od stężenia RNA. Z uwagi na złą jakość widma zarejestrowanego w obecności jonów NH_4^+ nie można jednoznacznie potwierdzić, ani zaprzeczyć, że struktura formowana w tych warunkach jest taka sama jak w przypadku widm rejestrowanych dla próbki w obecności jonów K^+ (Rys. 43 c). Widmo ^1H NMR zarejestrowane w obecności jonów Na^+ również ukazuje pojedynczą formę, ale podobnie jak w przypadku cząsteczek zbudowanych z powtórzeń AGG, widmo to różni się od widm rejestrowanych w obecności kationów potasu i amonu (Rys. 43 b).

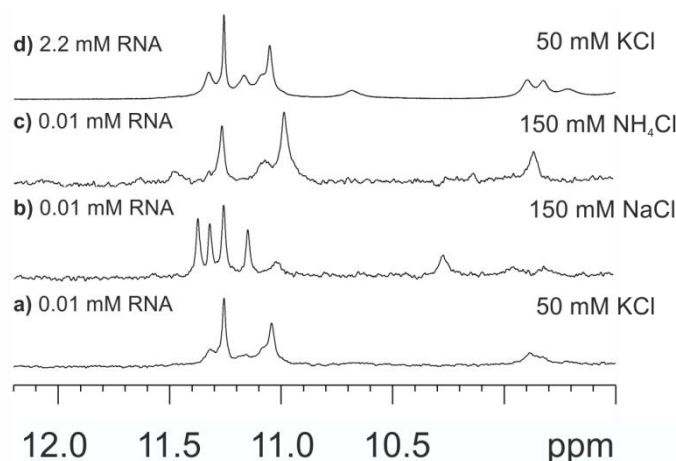


Rys. 43. Widma ^1H NMR zarejestrowane dla $(\text{UGG})_2\text{U}$ w zależności od rodzaju zastosowanego jonu oraz stężenia RNA.

pUGGUGGU

W przypadku cząsteczki $\text{p}(\text{UGG})_2\text{U}$ zastosowanie dodatkowej grupy fosforanowej na końcu 5' doprowadziło do uzyskania lepszej jakości widm ^1H NMR (lepiej rozdzielone sygnały, schodzące do linii bazowej) w stosunku do widm

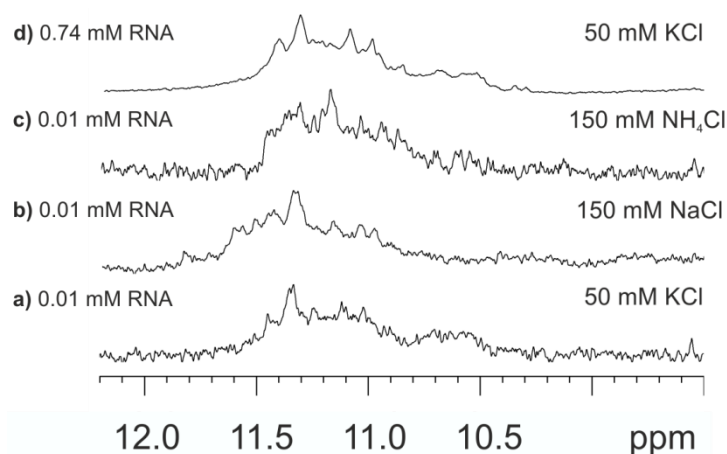
zarejestrowanych dla cząsteczki (UGG)₂U. Widoczna gołym okiem różnica w stosunku sygnału do szumu oznacza, że w przypadku, gdy brak jest dodatkowej grupy fosforanowej na końcu 5', bardzo łatwo dochodzi do agregacji kwadrupleksów. Niemalże identyczne przesunięcia chemiczne i wygląd sygnałów iminowych obserwowałam dla próbki zawierającej kationy potasu (niezależnie od stężenia RNA) oraz amonu (Rys. 44 a, c, d). Wynik ten sugerował, podobnie jak w przypadku cząsteczek zbudowanych z powtórzeń AGG, że jony te promują powstawanie kwadrupleksu o takiej samej topologii. Również podobnie do sytuacji obserwowanej w przypadku cząsteczek AGG, w obecności kationów sodu obserwowałam znaczące zmiany przesunięć chemicznych sygnałów iminowych (Rys. 44 b), co sugerowało odmienną topologię tworzonego w tych warunkach kwadrupleksu.



Rys. 44. Widma ¹H NMR zarejestrowane dla p(UGG)₂U w zależności od rodzaju zastosowanego jonu oraz stężenia RNA.

pUGGUGGUGGUGGU

We wszystkich widmach ¹H NMR zarejestrowanych dla cząsteczki pUGGUGGUGGUGGU (p(UGG)₄U) obserwowałam występowanie sygnałów rezonansowych w rejonie ~ 11 ppm, co wskazywało na występowanie struktury kwadrupleksu we wszystkich badanych warunkach (Rys. 45). Niestety, sygnały rezonansowe były silnie poszerzone i nie schodziły do linii bazowej. Oznacza to, że pomimo zastosowania dodatkowej grupy fosforanowej na końcu 5', cząsteczka zbudowana z czterech powtórzeń UGG wykazuje silną tendencję do tworzenia agregatów lub przyjmuje w roztworze różnorodne formy. Niestety, złożoność widm ¹H NMR nie pozwoliła na ich dalszą interpretację.



Rys. 45. Widma ^1H NMR zarejestrowane dla $\text{p(UGG)}_4\text{U}$ w zależności od rodzaju zastosowanego jonu oraz stężenia RNA.

4.2.2. Spektroskopia UV-Vis

Rysunek 46. przedstawia profil krzywych topnienia przy długości fali 295 nm oraz absorpcyjne widma różnicowe zarejestrowane dla cząsteczek $(\text{AGG})_2\text{A}$ (Rys. 46 A, B), 2'-O-Me $(\text{AGG})_2\text{A}$ (Rys. 46 C, D), $(\text{AGG})_4\text{A}$ (Rys. 46 E, F), $(\text{UGG})_2\text{U}$ (Rys. 46 G, H), $\text{p(UGG)}_2\text{U}$ (Rys. 46 I, J) oraz $\text{p(UGG)}_4\text{U}$ (Rys. 46 K, L). Kolorem zielonym, czerwonym i niebieskim zaznaczyłam widma wykonane odpowiednio w obecności jonów K^+ , NH_4^+ oraz Na^+ . Dla wszystkich badanych cząsteczek, we wszystkich warunkach roztworu obserwowałam odwrócony profil krzywych topnienia przy długości fali 295 nm świadczący o obecności w roztworze struktur kwadrupleksu. W widmach TDS, również przy 295 nm, widoczne jest ujemne pasmo, które uznawane jest za charakterystyczne dla struktury kwadrupleksu.

Analiza profili krzywych topnienia pokazała, że cząsteczka $(\text{AGG})_2\text{A}$ tworzy najbardziej stabilną strukturę w obecności jonów potasu (Rys. 46 A, kolor zielony). Zarejestrowane dla cząsteczki 2'-O-Me $(\text{AGG})_2\text{A}$ widma ^1H NMR w obecności kationów sodu i amonu posiadały bardzo szerokie sygnały w rejonie świadczącym o występowaniu struktury kwadrupleksu, a zarejestrowane krzywe topnienia pokazują, że w tych roztworach powstają stabilne struktury kwadrupleksu [Rys. 46 C, kolor niebieski (Na^+) i czerwony (NH_4^+)], co potwierdza hipotezę o tworzeniu się agregatów. Krzywa topnienia zarejestrowana dla cząsteczki 2'-O-Me $(\text{AGG})_2\text{A}$ w obecności kationów potasu posiada dwa punkty przegięcia (Rys. 46 C, kolor zielony), co również jest zgodne z obserwacją mieszaniny różnych

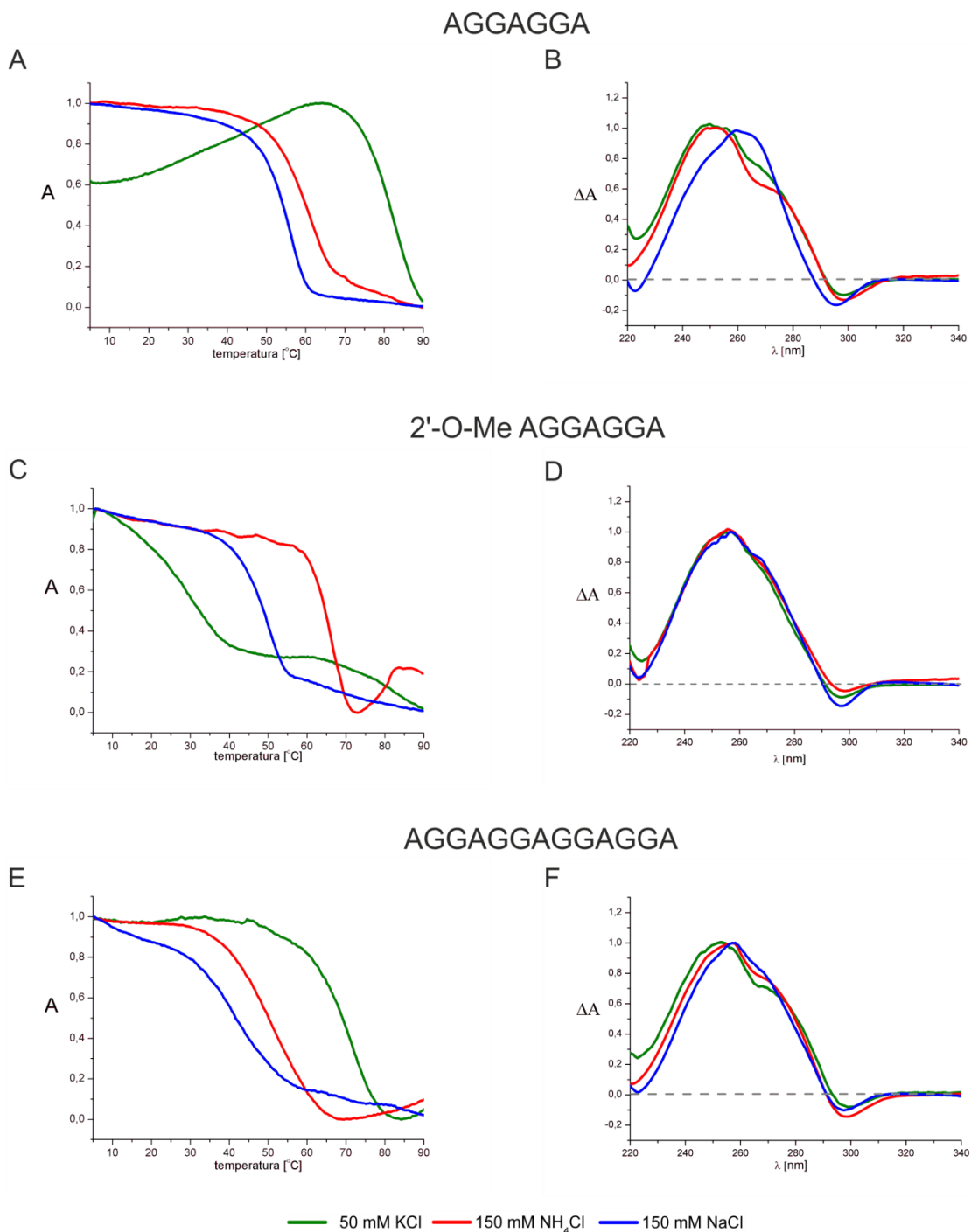
form kwadrupleksu w widmach ^1H NMR. Bardzo podobne profile widm TDS cząsteczki modyfikowanej, niezależnie od typu jonu obecnego w roztworze, wskazywały, że struktura kwadrupleksu może być bardzo podobna we wszystkich zastosowanych warunkach roztworu (Rys. 46 D). Natomiast, z widm ^1H NMR wynikało, że struktura kwadrupleksu przyjmowana przez cząsteczkę $(\text{AGG})_2\text{A}$ w obecności jonów sodu różni się od struktury powstającej w obecności jonów potasu i amonu (Rys. 40). W widmie TDS zarejestrowanym dla próbki zawierającej kationy sodu widoczne jest przesunięcie maksimum pasma TDS z ~ 250 nm do ~ 270 nm (Rys. 46 B), co dodatkowo potwierdza, że w tych warunkach powstaje kwadrupleks o odmiennej topologii.

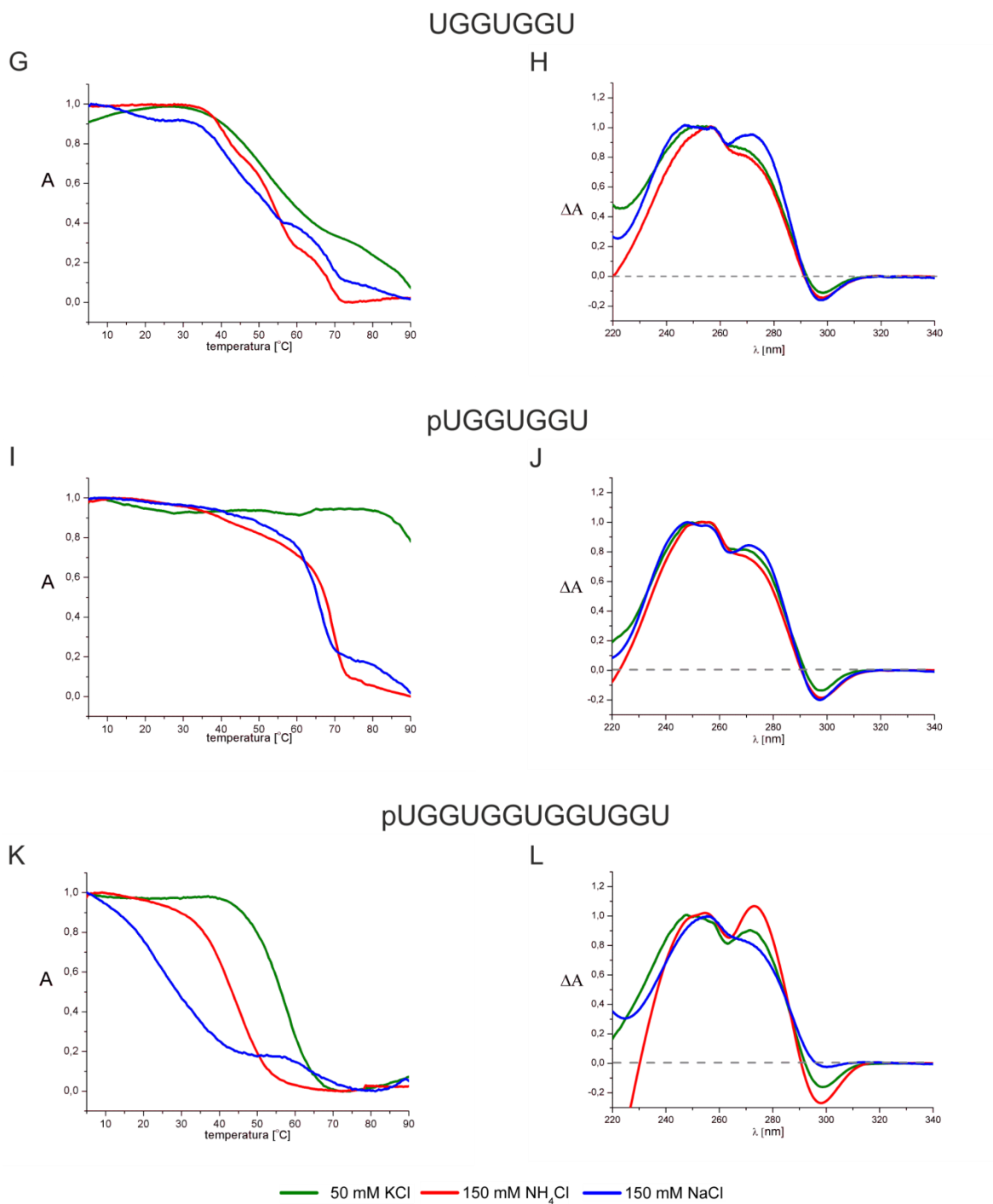
Widma ^1H NMR zarejestrowane dla cząsteczki $(\text{AGG})_4\text{A}$ (Rys. 42) pokazały, że przyjmuje ona pojedynczą formę jedynie w obecności jonów K^+ oraz, że kwadrupleks powstający w roztworze zawierającym jony Na^+ ma inną topologię niż struktura obecna w roztworze zawierającym jony K^+ . Jak wynika z analizy krzywej topnienia, struktura powstająca w obecności jonów K^+ jest najbardziej stabilna (Rys. 46 E). Obserwowane w widmie TDS przesunięcie maksimum pasma z rejonu ~ 250 nm (dla roztworu zawierającego kationy potasu) do ~ 260 nm (dla roztworu zawierającego kationy sodu) potwierdzało, że jony Na^+ promują powstawanie odmiennej topologii kwadrupleksu (Rys. 46 F).

Porównanie profili krzywych topnienia uzyskanych dla cząsteczki $(\text{UGG})_2\text{U}$ (Rys. 46 G) oraz dla cząsteczki z dodatkową grupą fosforanową na końcu 5', $\text{p}(\text{UGG})_2\text{U}$, (Rys. 46 I) wykazało, że struktura utworzona przez $\text{p}(\text{UGG})_2\text{U}$ jest bardziej stabilna (o co najmniej 20 °C) we wszystkich badanych warunkach. Szczególną uwagę zwraca przebieg krzywej topnienia otrzymanej dla cząsteczki $\text{p}(\text{UGG})_2\text{U}$ w obecności kationów potasu. Pokazuje ona, że struktura kwadrupleksu nie jest całkowicie stopiona nawet w temperaturze 90 °C (Rys. 46 I). Pomimo znaczących różnic w przesunięciach chemicznych protonów iminowych widocznych w widmach ^1H NMR pomiędzy strukturą formowaną w obecności jonów K^+ i NH_4^+ a strukturą przyjmowaną w obecności Na^+ , widma TDS nie różnią się znacząco (Rys. 46 H, J).

Widma ^1H NMR wykazały, że cząsteczka $\text{p}(\text{UGG})_4\text{U}$ przyjmuje strukturę kwadrupleksu we wszystkich testowanych warunkach. Potwierdziły to również badania z zastosowaniem spektroskopii UV-Vis. Cząsteczka zbudowana z czterech powtórzeń UGG formuje najbardziej stabilną strukturę w roztworze zawierającym

jony potasu (Rys. 46 K). W widmach TDS, charakterystyczne dla struktury kwadrupleksu ujemne pasmo przy długości fali 295 nm, obserwowałam dla wszystkich roztworów (Rys. 46 L). Jednakże w widmie zarejestrowanym w obecności kationów sodu pasmo to było tylko minimalnie ujemne. Niemniej jednak, profil krzywej topnienia oraz obecność w widmie protonowym sygnałów rezonansowych pochodzących od G-tetrad potwierdziło, że i w tych warunkach roztworu powstaje kwadrupleks.





Rys. 46. Krzywe topnienia zarejestrowane przy długości fali 295 nm i absorpcyjne widma różnicowe otrzymane dla: (A, B) (AGG)₂A, (C, D) 2'-O-Me (AGG)₂A, (E, F) (AGG)₄A, (G, H) (UGG)₂U, (I, J) p(UGG)₂U oraz (K, L) p(UGG)₄U w obecności jonów K⁺ (kolor zielony), NH₄⁺ (kolor czerwony) oraz Na⁺ (kolor niebieski).

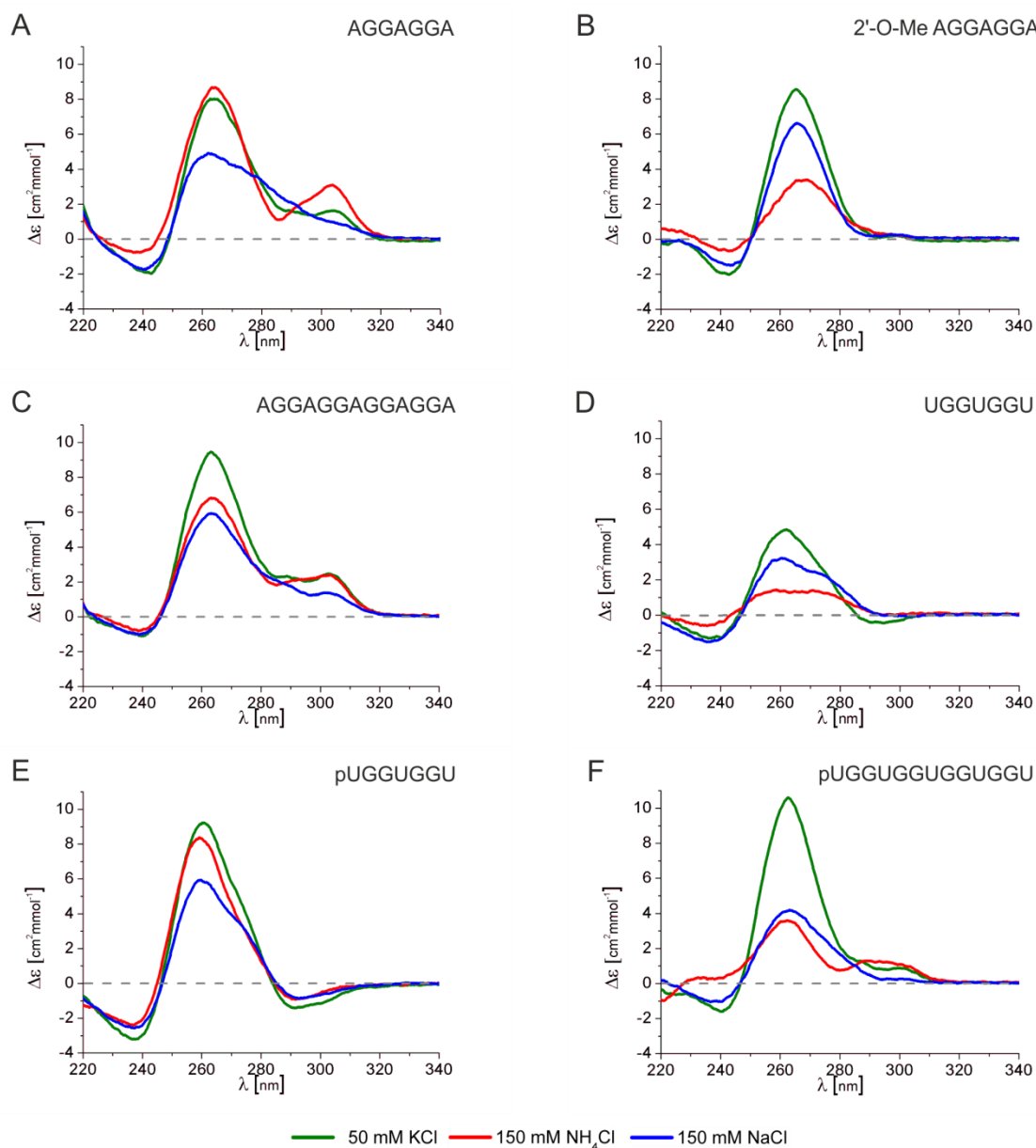
4.2.3. Spektroskopia dichroizmu kołowego (CD)

Widma dichroizmu kołowego, zarejestrowane w obecności jonów K^+ , NH_4^+ i Na^+ pokazane na rysunku 47 A-E oznaczone są odpowiednio kolorem zielonym, czerwonym i niebieskim. Wszystkie widma, z wyjątkiem jednego, posiadają maksimum przy długości fali ~ 260 nm i minimum przy ~ 240 nm, świadczące o równoległym ułożeniu nici w kwadrupleksie. Wyjątek stanowi widmo CD otrzymane dla cząsteczki $p(UGG)_4U$ w obecności jonów NH_4^+ (Rys. 47 F, kolor czerwony). W widmie tym brak jest ujemnego pasma przy długości fali 240 nm, pojawia się natomiast dodatkowe szerokie maksimum przy ~ 290 nm. Pozostałe widma CD otrzymane dla tej cząsteczki posiadały typowe pasma wskazujące na równoległą topologię kwadrupleksu [Rys. 47 F, kolor zielony (K^+), niebieski (Na^+)].

Widma CD cząsteczek $(AGG)_2A$ oraz $(AGG)_4A$ są bardzo podobne (Rys. 47 A, C). W widmach zarejestrowanych w obecności jonów K^+ i NH_4^+ , występuje dodatkowe maksimum przy długości fali ~ 305 nm [Rys. 47 A, C, kolor zielony (K^+) i czerwony (NH_4^+)]. Takie pasmo było wcześniej obserwowane w widmach CD dimerów kwadrupleksów DNA oraz RNA, zawierających motyw heksady $A:(G:G:G:G):A$ i stabilizowanych poprzez oddziaływania warstwowe typu heksada-heksada (180, 181). Ostatnie badania pokazują, że pasmo pojawiające się przy 305 nm może być charakterystyczne dla oddziaływań warstwowych typu głowa-do-głowy lub ogon-do-ogona z udziałem G-tetrad (142). W widmach CD obu cząsteczek zarejestrowanych w obecności jonów Na^+ (Rys. 47 A, C, kolor niebieski) nie obserwowałam dodatkowego maksimum przy ~ 305 nm, co jest spójne z obserwowanym w tych warunkach przesunięciem maksimum w widmie TDS oraz odmiennym widmem 1H NMR i potwierdza powstawanie kwadrupleksu o odmiennym topologii.

W widmach CD cząsteczek zbudowanych z dwóch powtórzeń UGG, oprócz sygnałów potwierdzających powstawanie równoległego kwadrupleksu, obserwowałam dodatkowo ujemne pasmo o niskiej intensywności przy długości fali ~ 290 nm (Rys. 47 D, E). Dla cząsteczki zawierającej grupę fosforanową na końcu 5' dodatkowe minimum pojawia się we wszystkich widmach, niezależnie od zastosowanego jonu. Natomiast dla cząsteczki $(UGG)_2U$ dodatkowe ujemne pasmo było widoczne tylko w widmie zarejestrowanym w obecności kationów

potasu (Rys. 47 D, kolor zielony). Poszukując w literaturze wytłumaczenia dla obecności tego pasma zaobserwowałam, że podobne, ujemne pasmo, występowało w widmach CD kwadrupleksów RNA, które zawierały w swojej strukturze motyw U-tetrazy, jednakże jego obecność nie była dyskutowana (33, 126).

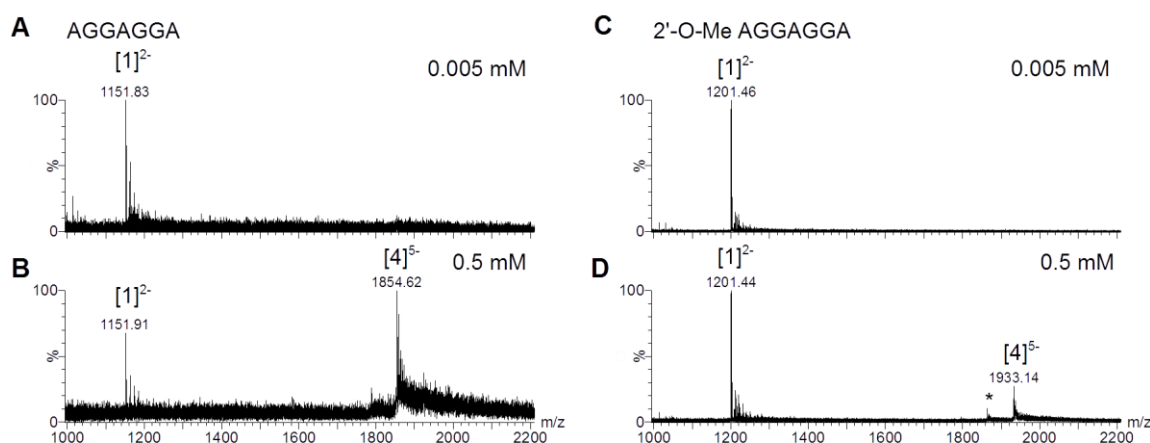


Rys. 47. Widma dichroizmu kołowego otrzymane dla (A) $(\text{AGG})_2\text{A}$, (B) $2'\text{-O-Me}(\text{AGG})_2\text{A}$, (C) $(\text{AGG})_4\text{A}$, (D) $(\text{UGG})_2\text{U}$, (E) $\text{p}(\text{UGG})_2\text{U}$ (F) $\text{p}(\text{UGG})_4\text{U}$, zarejestrowane w obecności jonów K^+ (kolor zielony), NH_4^+ (kolor czerwony) oraz Na^+ (kolor niebieski).

4.2.4. Spektrometria mas ze źródłem jonizacji poprzez elektrorozpraszanie oraz z zastosowaniem trybu pomiaru mobilności jonów - ESI-IMS-MS

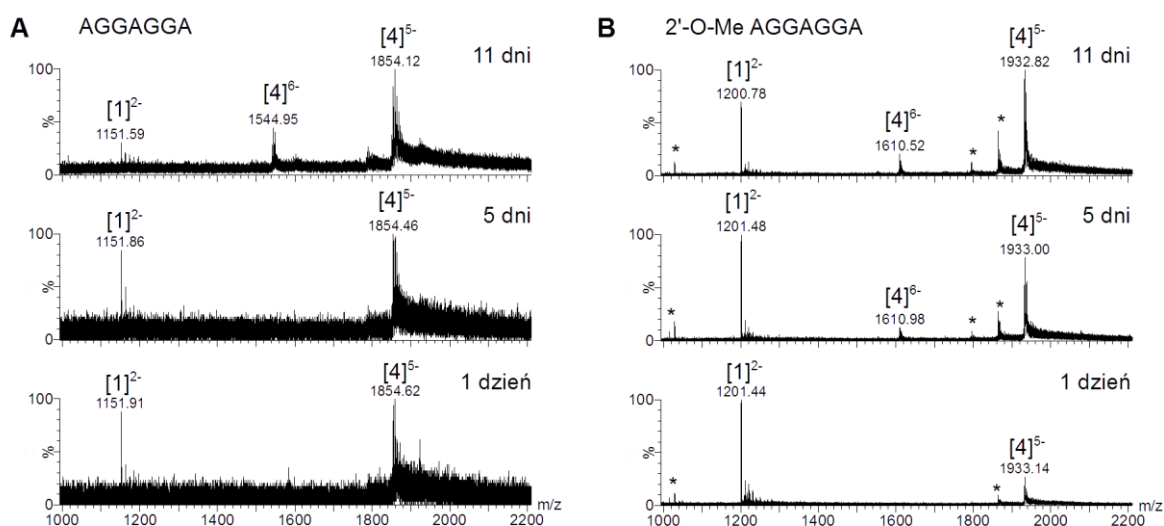
AGGAGGA i 2'-O-Me AGGAGGA

Na rysunku 48. przedstawiłam zestawienie wyników uzyskanych dla cząsteczek (AGG)₂A (Rys. 48 A, B) i 2'-O-Me (AGG)₂A (Rys. 48 C, D) dla dwóch różnych stężeń RNA: 0.005 mM i 0.5 mM. W widmach ESI-MS obu cząsteczek, otrzymanych dla 0.005 mM stężenia RNA widoczne są jedynie sygnały odpowiadające pojedynczej nici, bez skoordynowanych kationów amonu (Rys. 48 A, C). Natomiast, gdy do wykonania widm użyłam próbek RNA o stężeniu 0.5 mM, w widmach pojawiły się dodatkowe sygnały odpowiadające formie czteroniciowej. Dla cząsteczki (AGG)₂A zaobserwowałam sygnały odpowiadające pojedynczej nici przy m/z 1151.91 oraz strukturze czteroniciowej ze skoordynowanymi kationami amonu przy m/z 1854.62 (Rys. 48 B). W widmie zarejestrowanym dla cząsteczki modyfikowanej (Rys. 48 D) w przewodzie występuje sygnał od pojedynczej nici (m/z 1201.44), jednakże widoczny jest również słaby sygnał od struktury czteroniciowej ze skoordynowanymi kationami amonu (m/z 1933.14) oraz sygnał pochodzący od krótszego fragmentu RNA (zaznaczony gwiazdką).



Rys. 48. Widma ESI-MS zarejestrowane dla próbek (A, B) (AGG)₂A oraz (C, D) 2'-O-Me (AGG)₂A dla stężenia RNA wynoszącego (A, C) 0.005 mM i (B, D) 0.5 mM. Podpis jonu molekularnego, [n]^{z-} określa liczbę nici RNA (n) i całkowity ładunek jonu molekularnego (z). Gwiazdką zaznaczono sygnał pochodzący od krótszego fragmentu RNA.

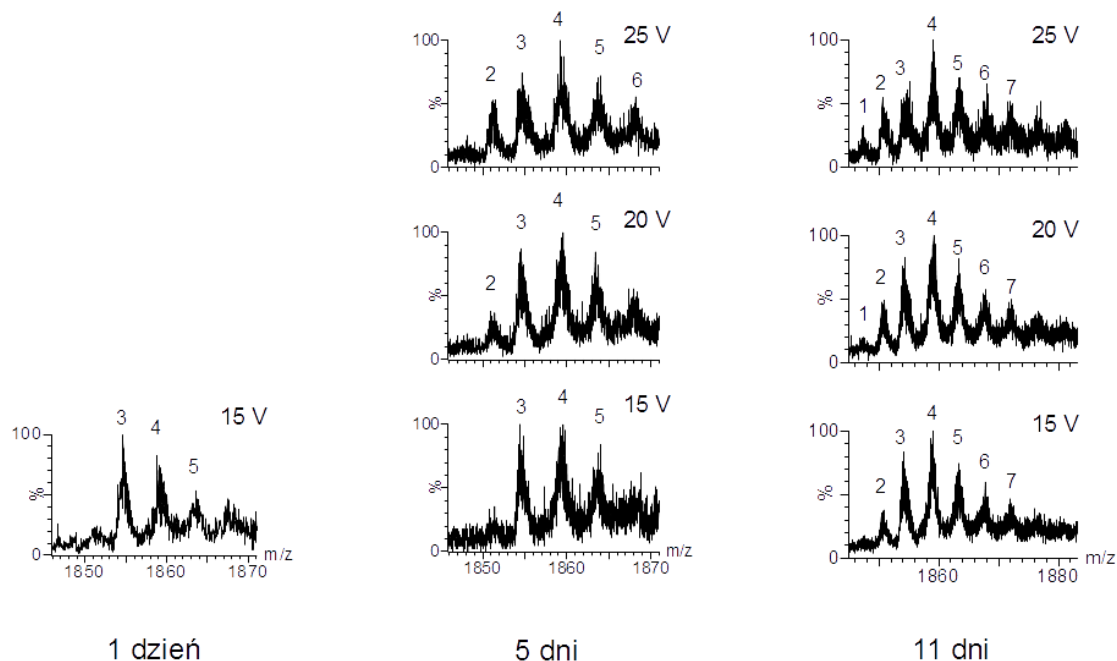
Dla obu próbek zawierających 0.5 mM stężenie RNA wykonałam dodatkowe pomiary po upływie pięciu oraz jedenastu dni od momentu ich przygotowania, aby sprawdzić, czy wraz z upływem czasu zmieni się populacja poszczególnych form w roztworze. Zaobserwowałam, że w przypadku obu cząsteczek wraz z upływem czasu w roztworze narastała ilość formy czteroniciowej (Rys. 49 A, B). Po jedenastu dniach forma ta występowała w przewadze, pojawiły się również sygnały pochodzące od jonu molekularnego o ładunku 6-, również odpowiadający czteroniciowej strukturze ze skoordynowanymi jonami NH_4^+ . W widmach cząsteczki 2'-O-Me (AGG)₂A narastały dodatkowe sygnały pochodzące od krótszych fragmentów RNA (Rys. 49 B, sygnały zaznaczone gwiazdką).



Rys. 49. Widma ESI-MS zarejestrowane po upływie 1, 5 i 11 dni, dla próbek (A) (AGG)₂A i (B) 2'-O-Me (AGG)₂A, zawierających 0.5 mM RNA. Podpis jonu molekularnego, [n]^{z-} określa liczbę nici RNA (n) i całkowity ładunek jonu molekularnego (z). Gwiazdkami zaznaczono sygnały pochodzące od krótszych fragmentów RNA.

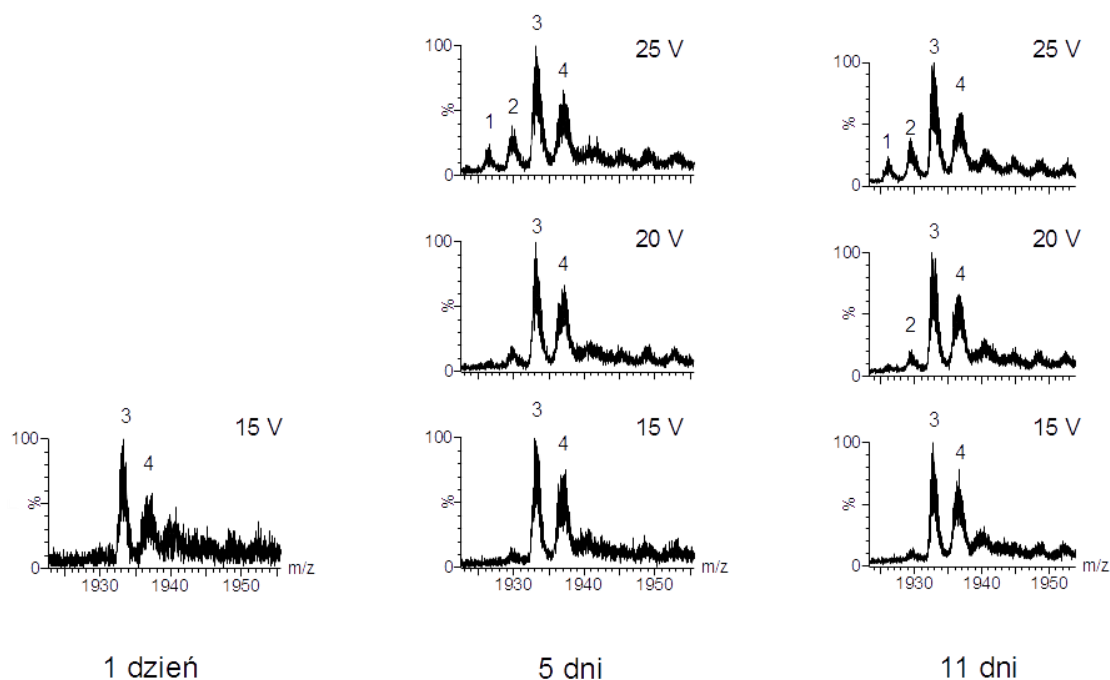
Zbliżenie na jon molekularny odpowiadający czteroniciowej strukturze (AGG)₂A pokazało, że w zastosowanych przeze mnie warunkach jonizacji struktura kwadrupleksu jest stabilizowana przez trzy, cztery lub nawet pięć kationów amonowych (Rys. 50). Taki sam wynik, jak w czasie pierwszego pomiaru, uzyskałam w widmie zarejestrowanym po upływie pięciu dni, natomiast w widmie otrzymanym po jedenastu dniach od momentu przygotowania próbki zaobserwowałam jeszcze szerszą dystrybucję kationów amonowych (Rys. 50). Taka sytuacja może obrazować występowanie różnych form kwadrupleksu w roztworze lub wynikać z niespecyficznego przyłączenia kationu amonu, np. w miejscu pętli

(182). W celu sprawdzenia, która z form kwadrupleksu jest najbardziej stabilna, w kolejnych pomiarach stopniowo zwiększałam wartość napięcia elektrycznego do 20 i 25 V. Oczekiwałam, że w takich warunkach jonizacji jon molekularny odpowiadający najbardziej stabilnej formie kwadrupleksu będzie najbardziej intensywny. Jak się okazuje, dla cząsteczki (AGG)₂A najbardziej trwała jest struktura kwadrupleksu stabilizowana przez cztery kationy amonu (Rys. 50).



Rys. 50. Dystrybucja jonów NH_4^+ skoordynowanych wewnątrz czteroniciowej struktury formowanej przez AGGAGGA, w zależności od wielkości napięcia elektrycznego panującego wewnątrz komory jonizacyjnej.

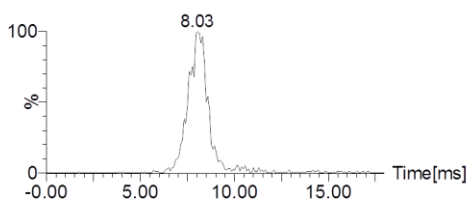
W najłagodniejszych stosowanych przeze mnie warunkach jonizacji strukturę kwadrupleksu 2'-O-Me (AGG)₂A stabilizowały trzy lub cztery jony NH_4^+ (Rys. 51). Jak widać w widmach zarejestrowanych po czasie, liczba kationów skoordynowanych wewnątrz struktury kwadrupleksu oraz ich dystrybucja nie uległa zmianie (Rys. 51). Stopniowe zwiększanie napięcia elektrycznego ukazało, że najbardziej trwała jest struktura stabilizowana przez trzy kationy amonu (Rys. 51).



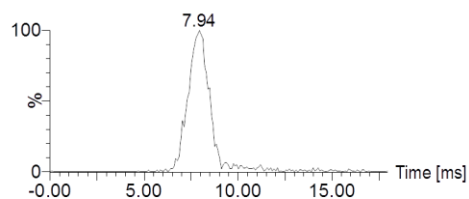
Rys. 51. Dystrybucja jonów NH_4^+ skoordynowanych wewnątrz czteroniciowej struktury formowanej przez 2'-O-Me AGGAGGA, w zależności od wielkości napięcia elektrycznego panującego wewnątrz komory jonizacyjnej.

Postanowiłam sprawdzić, czy obecność trzech i czterech jonów NH_4^+ związana jest z ich niespecyficznym przyłączeniem, czy też jest to wynikiem współlistnienia w formie gazowej różnych struktur kwadrupleksów. Zarejestrowałam w tym celu widma masowe z jednoczesnym pomiarem mobilności jonów IMS. Przykładowe widma IMS otrzymane dla poszczególnych jonów molekularnych cząsteczki $(\text{AGG})_2\text{A}$, odpowiadających formom stabilizowanym przez 3 lub 4 jony NH_4^+ prezentuję na rysunku 52. Dla każdego jonu molekularnego odczytałam czas dryfowania danej formy kwadrupleksu w komorze jonizacyjnej. Czasy te różnią się między sobą i wynoszą odpowiednio 8.03 ms i 7.94 ms (Rys. 52), co sugeruje, że w fazie gazowej znajdowały się dwie różne formy kwadrupleksu. Czasy odczytane dla cząsteczki modyfikowanej, 2'-O-Me $(\text{AGG})_2\text{A}$, były identyczne, bez względu na liczbę skoordynowanych kationów i wynosiły 8.75 ms.

Obszar jonu molekularnego $[4]^{5+} + 3 \text{NH}_4^+$: 1853.781-1856.02 m/z

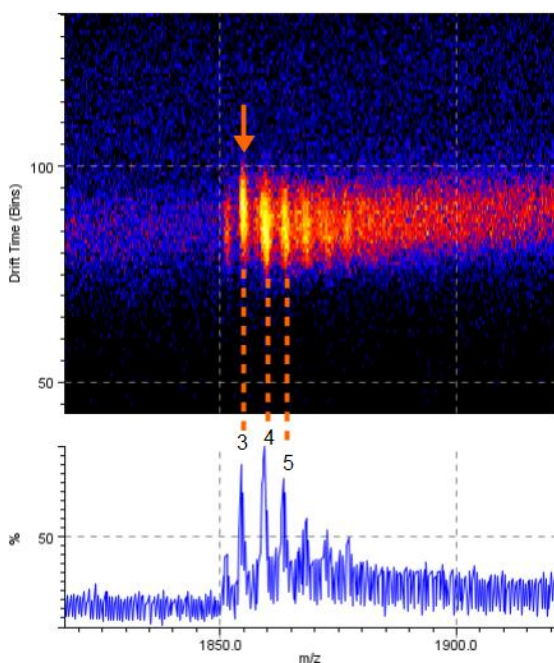


Obszar jonu molekularnego $[4]^{5+} + 4 \text{NH}_4^+$: 1857.859-1861.06 m/z

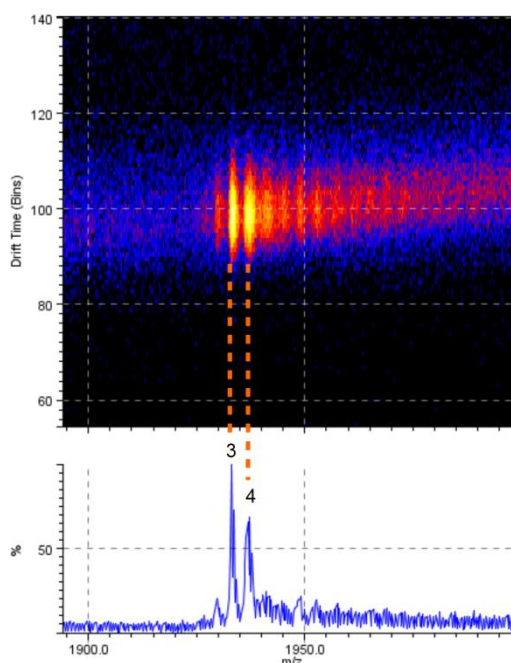


Rys. 52. Chromatogram przedstawiający czas dryfowania jonu molekularnego cząsteczki $(\text{AGG})_2\text{A}$ w komorze jonizacyjnej dla jonu ze skoordynowanymi trzema kationami amonu (A) oraz czterema kationami amonu (B).

Jak widać na rysunku 53 a, w widmie dwuwymiarowym zarejestrowanym dla cząsteczki $(\text{AGG})_2\text{A}$, przedstawiającym obrazowo czas dryfowania jonów molekularnych, smuga odpowiadająca jonowi molekularnemu z trzema kationami amonu dryfuje nieznacznie wolniej od pozostałych (zaznaczona strzałką). Na rysunku 53 b wszystkie smugi są na tym samym poziomie, co jest zgodne z identycznym czasem dryfowania jonów molekularnych, odczytanym dla cząsteczki modyfikowanej.



a) AGGAGGA

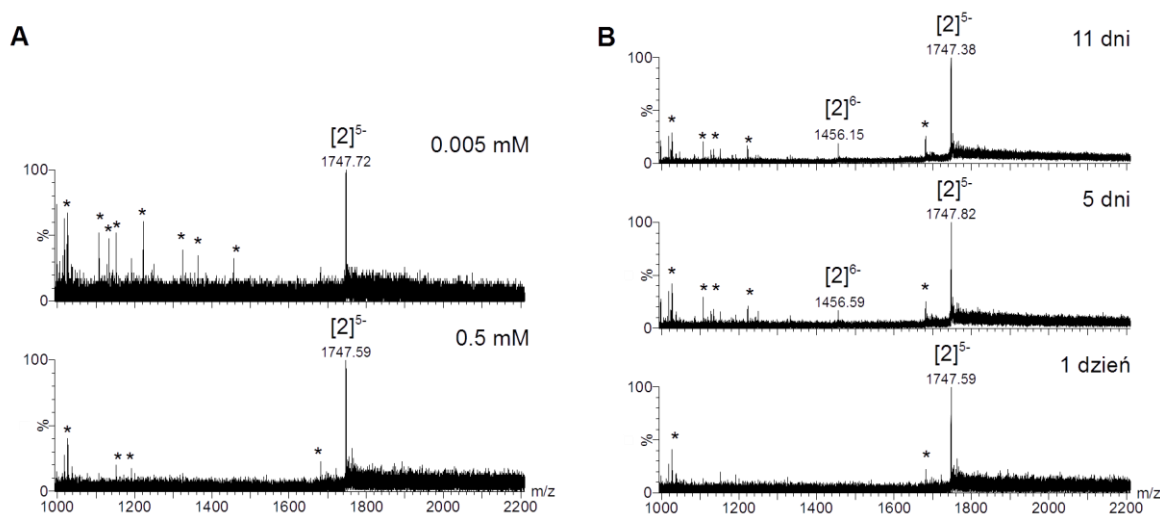


b) 2'-O-Me AGGAGGA

Rys. 53. Graficzne przedstawienie pomiaru mobilności jonów molekularnych w komorze jonizacyjnej dla (a) $(\text{AGG})_2\text{A}$ oraz (b) 2'-O-Me $(\text{AGG})_2\text{A}$.

AGGAGGAGGAGGA

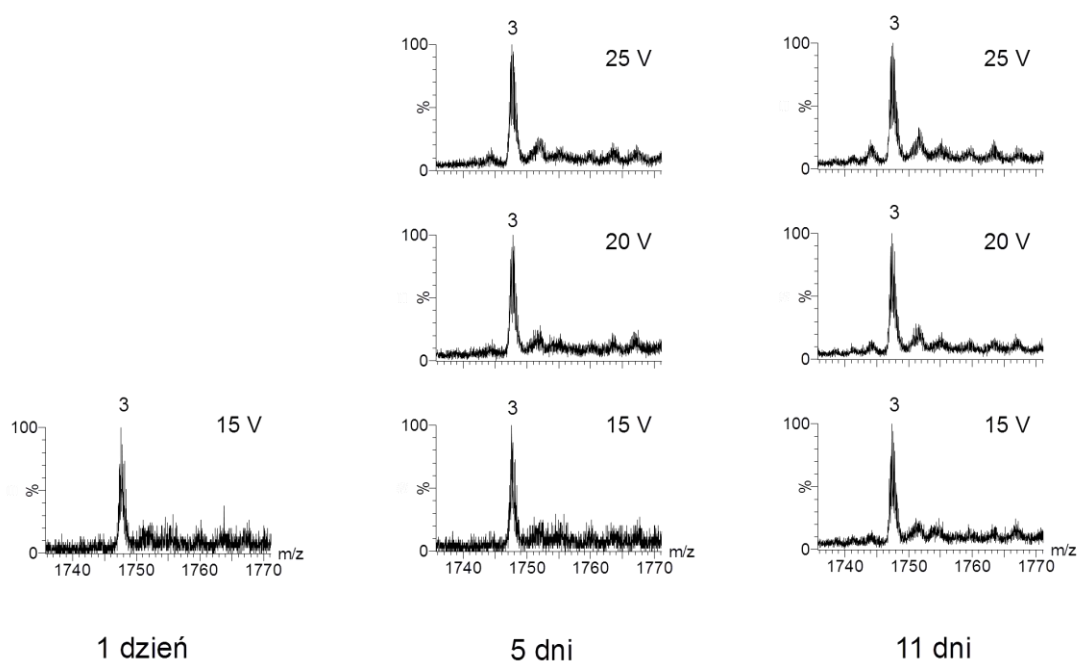
Na podstawie analizy widm ESI-MS ustaliłam, że niezależnie od stężenia RNA cząsteczka $(AGG)_4A$ tworzy dwuniciową strukturę kwadrupleksu ze skoordynowanymi trzema kationami amonu (Rys. 54 A). Świadczyła o tym obecność w widmie ESI-MS tylko jednego sygnału od jonu molekularnego o ładunku 5- i wartości m/z 1747.59 (wartość odczytana dla stężonej próbki), odpowiadającej masie dwóch nici RNA $_{(AGG)_4A}$ i trzech jonów NH_4^+ . W widmie brak jest sygnału od jonu molekularnego odpowiadającego pojedynczej nici bez skoordynowanych kationów, ale obecne są sygnały pochodzące od krótszych fragmentów RNA (zaznaczone gwiazdką). W widmach zarejestrowanych po upływie pięciu i jedenastu dni od momentu przygotowania próbki nie pojawiły się żadne dodatkowe sygnały, które mogłyby świadczyć o powstaniu innej formy, ale obserwowałam dodatkowy sygnał pochodzący od jonu molekularnego o ładunku 6-, również odpowiadający dwuniciowej strukturze ze skoordynowanymi trzema jonami NH_4^+ . (Rys. 54 B).



Rys. 54. Widma ESI-MS zarejestrowane dla próbki $(AGG)_4A$, (A) dla stężenia RNA wynoszącego 0.005 mM i 0.5 mM oraz (B) widma zarejestrowane po upływie 1, 5 i 11 dni, dla próbki zawierającej 0.5 mM RNA. Podpis jonu molekularnego, $[n]^z-$ określa liczbę nici RNA (n) i całkowity ładunek jonu molekularnego (z). Gwiazdkami zaznaczono sygnały pochodzące od krótszych fragmentów RNA.

Również i dla tej cząsteczki sprawdziłam, czy wraz ze wzrostem napięcia elektrycznego wewnątrz komory jonizacyjnej pojawią się inne formy kwadrupleksu oraz, czy powstająca dwuniciowa struktura jest stabilna. Jak się okazało, niezależnie od zastosowanych warunków jonizacji obserwowałam tylko formę

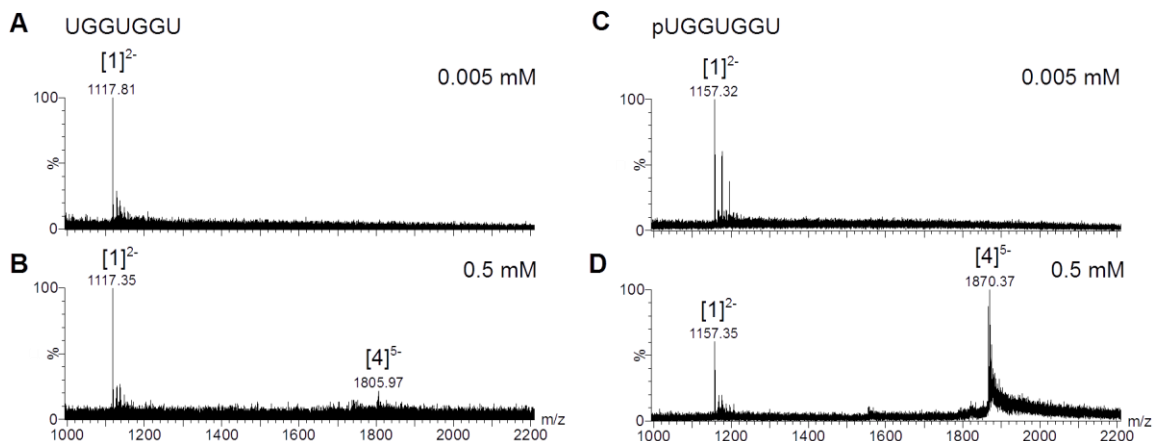
dwuniciową stabilizowaną przez trzy kationy amonu (Rys. 55). Ten wynik obrazuje niezwykle trwałość powstającej struktury, ponieważ nawet przy napięciu 25 V dystrybucja jonów wewnątrz struktury nie uległa zmianie.



Rys. 55. Dystrybucja jonów NH_4^+ skoordynowanych wewnątrz dwuniciowej struktury formowanej przez AGGAGGAGGAGGA, w zależności od wielkości napięcia elektrycznego panującego wewnątrz komory jonizacyjnej.

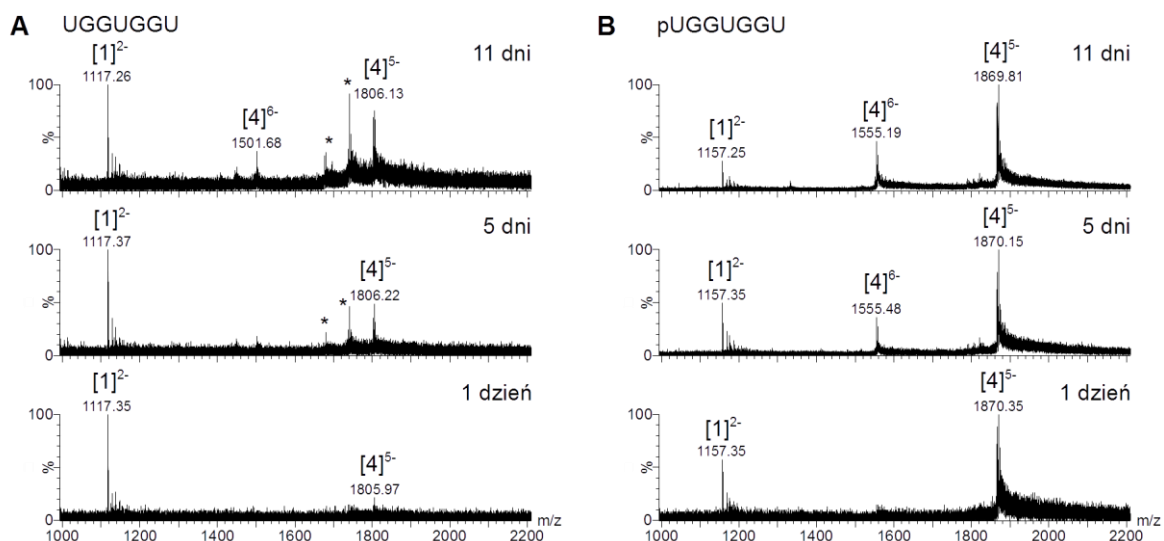
UGGUGGU i pUGGUGGU

Na rysunku 56. przedstawiłam wpływ stężenia RNA na widma masowe cząsteczek $(\text{UGG})_2\text{U}$ (Rys. 56 A, B) i $\text{p}(\text{UGG})_2\text{U}$ (Rys. 56 C, D). Dla próbek zawierających 0.005 mM RNA obserwowałam jedynie sygnał pochodzący od pojedynczej nici, bez skoordynowanych kationów amonu (m/z 1117.35 i m/z 1157.35, odpowiednio dla $(\text{UGG})_2\text{U}$ i $\text{p}(\text{UGG})_2\text{U}$, wartość odczytana dla stężonej próbki). W widmie próbki $(\text{UGG})_2\text{U}$ o stężeniu 0.5 mM RNA dominuje sygnał pochodzący od formy jednoniciowej, ale widoczny jest również bardzo słaby sygnał odpowiadający formie czteroniciowej ze skoordynowanymi kationami amonu (Rys. 56 B, m/z 1805.97). Główny sygnał widoczny w widmie zarejestrowanym dla próbki $\text{p}(\text{UGG})_2\text{U}$ o stężeniu RNA 0.5 mM (Rys. 56 D) przypisałam czteroniciowej strukturze kwadrupleksu ze skoordynowanymi kationami amonu (m/z 1870.37).



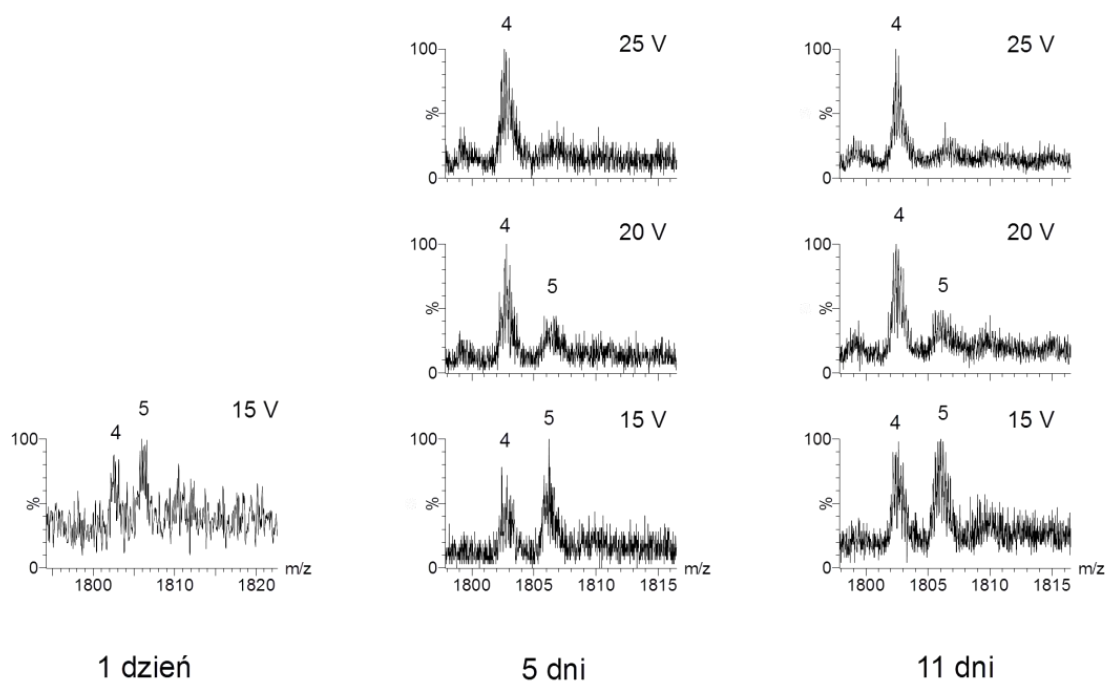
Rys. 56. Widma ESI-MS zarejestrowane dla próbek (A, B) (UGG)₂U oraz (C, D) p(UGG)₂U dla stężenia RNA wynoszącego (A, C) 0.005 mM i (B, D) 0.5 mM. Podpis jonu molekularnego, [n]^{z-} określa liczbę nici RNA (n) i całkowity ładunek jonu molekularnego (z). Gwiazdką zaznaczono sygnał pochodzący od krótszego fragmentu RNA.

W widmach masowych wykonanych dla (UGG)₂U po upływie pięciu i jedenastu dni zaobserwowałam narastanie sygnałów od krótszych fragmentów RNA, co świadczyło o degradacji próbki (Rys. 57 A, zaznaczone gwiazdką). Z kolei w widmach cząsteczki p(UGG)₂U, wraz z upływem czasu, zaobserwowałam narastanie sygnału odpowiadającego formie czteroniciowej oraz pojawienie się sygnału od jonu molekularnego o ładunku 6-, również odpowiadający formie czteroniciowej ze skoordynowanymi jonami NH₄⁺ (Rys. 57 B).



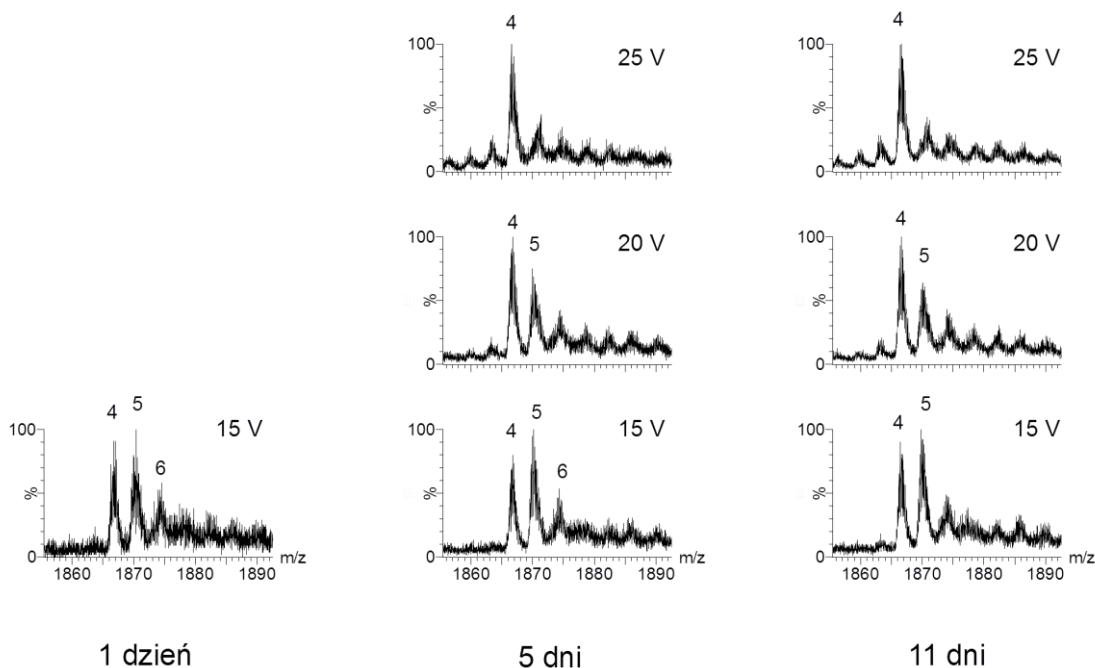
Rys. 57. Widma ESI-MS zarejestrowane po upływie 1, 5 i 11 dni, dla próbek (A) (UGG)₂U i (B) p(UGG)₂U, zawierających 0.5 mM RNA. Podpis jonu molekularnego, [n]^{z-} określa liczbę nici RNA (n) i całkowity ładunek jonu molekularnego (z). Gwiazdkami zaznaczono sygnały pochodzące od krótszych fragmentów RNA.

Pomimo stosunkowo słabej jakości widm uzyskanych dla cząsteczki (UGG)₂U byłam w stanie ustalić, że struktura czteroniciowa jest stabilizowana przez cztery lub pięć kationów amonu (Rys. 58). Sprawdziłam również trwałość poszczególnych jonów molekularnych w zależności od napięcia elektrycznego panującego w komorze jonizacyjnej i jak się okazało, najbardziej stabilna jest forma zawierająca w swej strukturze cztery kationy amonu (Rys. 58).



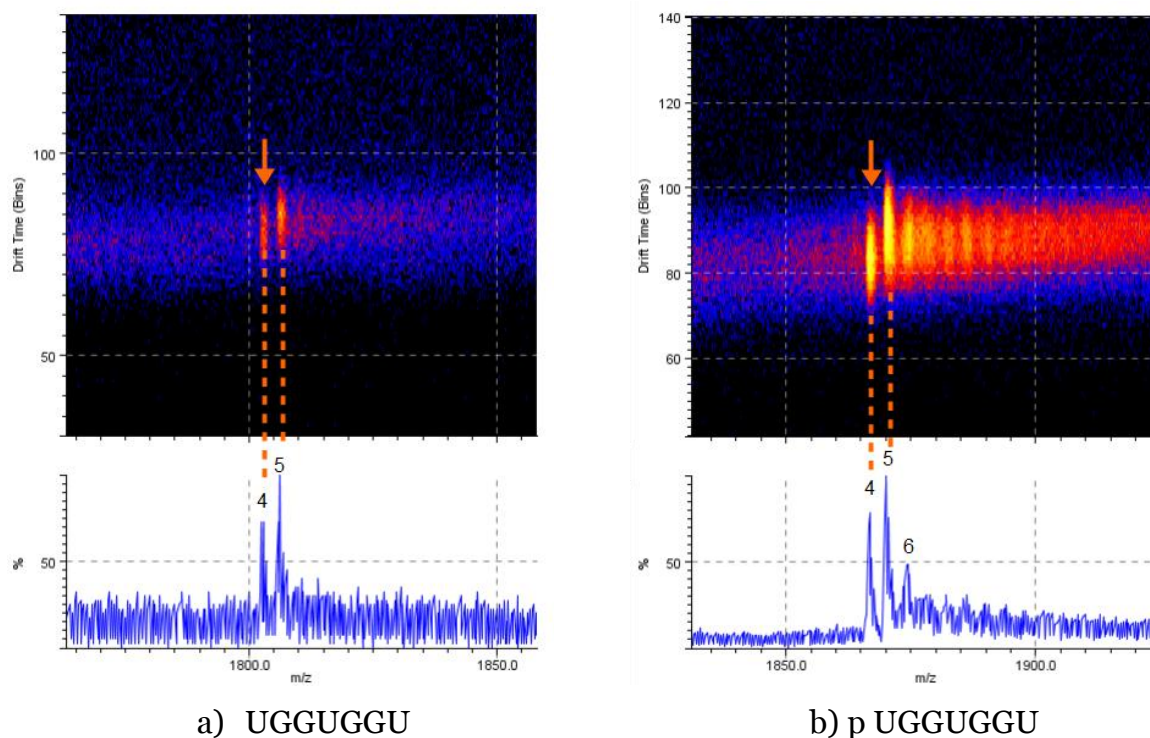
Rys. 58. Dystrybucja jonów NH_4^+ skoordynowanych wewnątrz czteroniciowej struktury formowanej przez UGGUGGU, w zależności od wielkości napięcia elektrycznego panującego wewnątrz komory jonizacyjnej.

Praktycznie taki sam wynik uzyskałam dla cząsteczki p(UGG)₂U. Jediną różnicę stanowiło pojawienie się w widmie zarejestrowanym przy użyciu najłagodniejszych warunków sygnału odpowiadającego formie stabilizowanej przez sześć kationów amonu (Rys. 59).



Rys. 59. Dystrybucja jonów NH_4^+ skoordynowanych wewnątrz czteroniciowej struktury formowanej przez pUGGUGGU, w zależności od wielkości napięcia elektrycznego panującego wewnątrz komory jonizacyjnej.

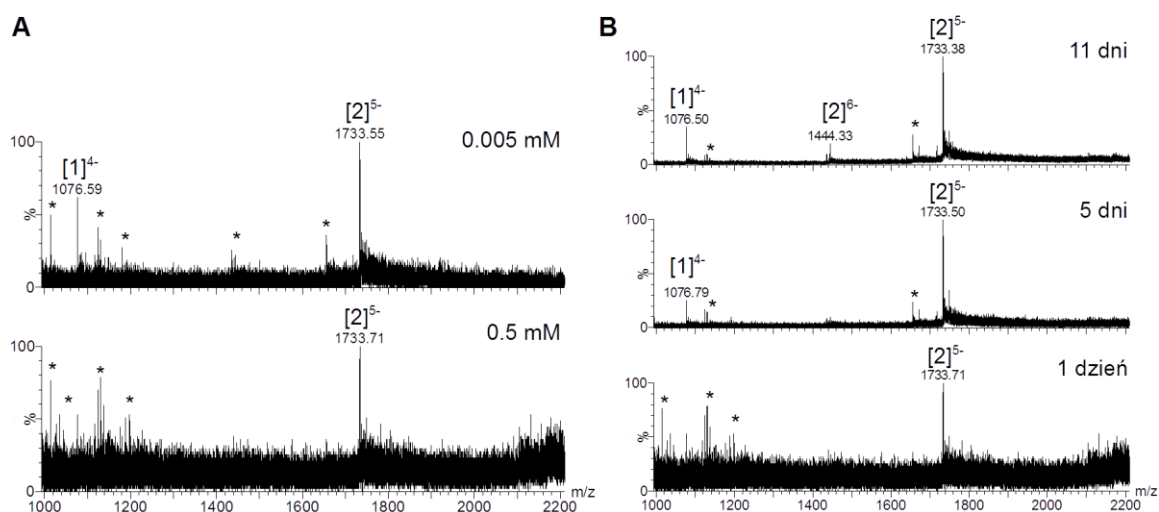
Ponieważ w przypadku cząsteczki $(\text{AGG})_2\text{A}$ okazało się, że struktura stabilizowana przez trzy kationy amonowe jest różna od tej stabilizowanej przez cztery kationy, interesowało mnie, czy w warunkach pomiaru ESI-IMS-MS kwadrupleksy $(\text{UGG})_2\text{U}$ i $\text{p}(\text{UGG})_2\text{U}$ również tworzą różne formy. Na podstawie pomiaru mobilności jonów ustaliłam, że cząsteczki $(\text{UGG})_2\text{U}$ oraz $\text{p}(\text{UGG})_2\text{U}$ także w fazie gazowej występują w postaci dwóch odmiennych form. Jon molekularny cząsteczki bez dodatkowej grupy fosforanowej, zawierający cztery kationy amonu dryfował z czasem 7.40 ms, a jon zawierający pięć kationów z czasem 7.58 ms. Z kolei jon molekularny cząsteczki $\text{p}(\text{UGG})_2\text{U}$, odpowiadający strukturze zawierającej cztery kationy amonu dryfował z czasem 7.58 ms, a jon zawierający pięć kationów z czasem 7.94 ms. Różnicę tę dobrze obrazuje widmo dwuwymiarowe pokazane na rysunku 60. a, b. W obu przypadkach smuga odpowiadająca jonom molekularnym zawierającym cztery kationy amonowe dryfuje szybciej od pozostałych (zaznaczone strzałką).



Rys. 60. Graficzne przedstawienie pomiaru mobilności jonów molekularnych w komorze jonizacyjnej dla (a) $(\text{UGG})_2\text{U}$ oraz (b) $\text{p}(\text{UGG})_2\text{U}$.

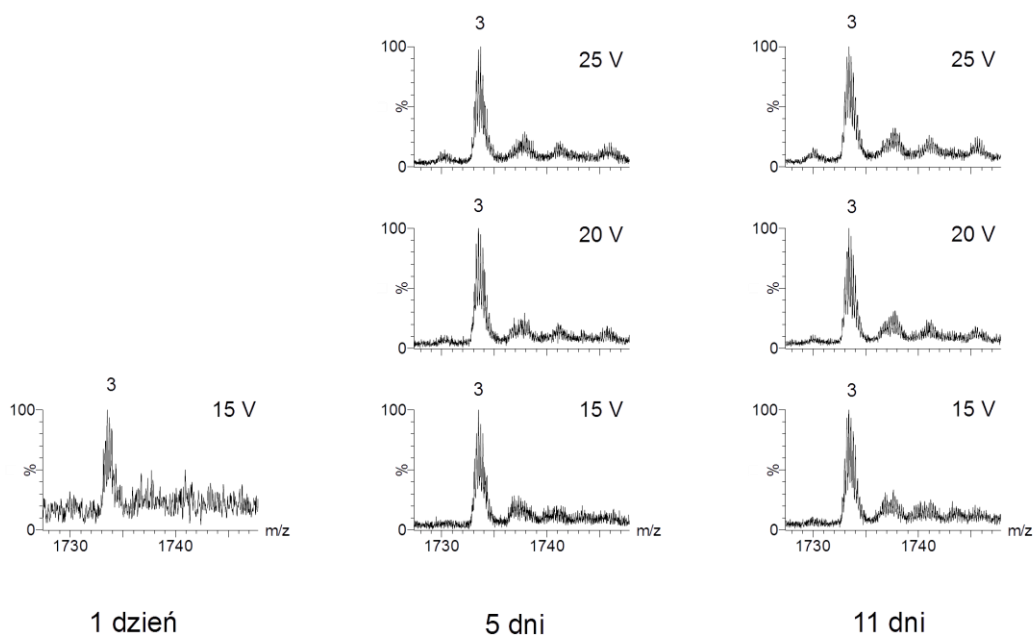
pUGGUGGUGGUGGU

Widma ESI-MS otrzymane dla $\text{p}(\text{UGG})_4\text{U}$ w zależności od stężenia RNA oraz rejestrowane wraz z upływem czasu dla próbek o stężeniu RNA 0.005 mM i 0.5 mM zostały zestawione na rysunku 61 A. We wszystkich widmach, bez względu na stężenie RNA, obserwowałam jon molekularny o ładunku 5-, odpowiadający dwuniciowej strukturze z trzema skoordynowanymi kationami amonu (m/z 1733.55 w widmie cząsteczki o 0.005 mM RNA i m/z 1733.53 dla 0.5 mM RNA). W widmach tych obserwowałam również sygnał odpowiadający pojedynczej nici (m/z 1076.59) oraz sygnały pochodzące najprawdopodobniej od degradacji próbki (zaznaczone gwiazdką). W widmach zarejestrowanych po upływie pięciu i jedenastu dni od momentu przygotowania próbki obserwowałam te same sygnały (Rys. 61 B), z tym, że po upływie jedenastu dni obserwowałam dodatkowy sygnał pochodzący od jonu molekularnego o ładunku 6-, również odpowiadający dwuniciowej strukturze ze skoordynowanymi trzema jonami NH_4^+ .



Rys. 61. Widma ESI-MS zarejestrowane dla próbki p(UGG)₄U, (A) dla stężenia RNA wynoszącego 0.005 mM i 0.5 mM oraz (B) widma zarejestrowane po upływie 1, 5 i 11 dni, dla próbki zawierającej 0.5 mM RNA. Podpis jonu molekularnego, [n]^{z-} określa liczbę nici RNA (n) i całkowity ładunek jonu molekularnego (z). Gwiazdkami zaznaczono sygnały pochodzące od krótszych fragmentów RNA.

Podobnie jak w przypadku cząsteczki zbudowanej z czterech powtórzeń AGG, niezależnie od stosowanego napięcia elektrycznego wewnątrz komory jonizacyjnej, obserwowałam tylko formę dwuniciową stabilizowaną przez trzy kationy amonu (Rys. 62).



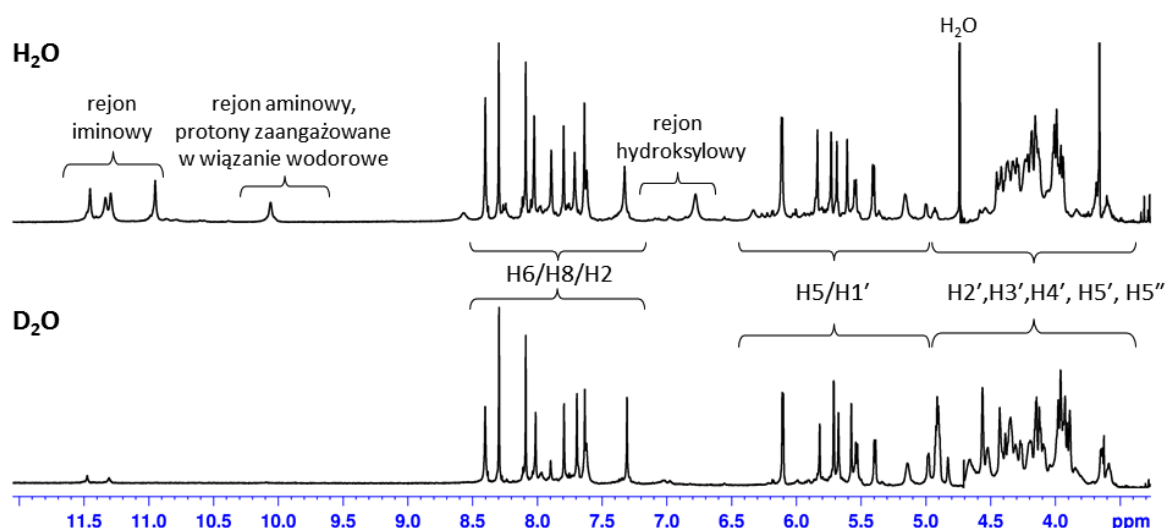
Rys. 62. Dystrybucja jonów NH₄⁺ skoordynowanych wewnątrz dwuniciowej struktury formowanej przez pUGGUGGUGGUGGU, w zależności od wielkości napięcia elektrycznego panującego wewnątrz komory jonizacyjnej.

4.3. Ustalenie pofałdowania kwadrupleksów AGGAGGA i pUGGUGGU

Jak już wcześniej wspomniałam (Rozdział 4.1) przeprowadzone przeze mnie wstępne wyniki badań wykazały, że jedynie cząsteczki (AGG)₂A oraz p(UGG)₂U występują w roztworze w postaci pojedynczej formy. Dlatego też dla obu tych cząsteczek postanowiłam ustalić sposób ich pofałdowania, wykorzystując dostępne metody spektroskopii NMR.

4.3.1. AGGAGGA

Na rysunku 63. zestawiałam jednowymiarowe widma ¹H NMR zarejestrowane dla próbki (AGG)₂A rozpuszczonej w H₂O (90% H₂O : 10% D₂O, v:v) i D₂O. Na widmach tych zaznaczyłam charakterystyczne zakresy spektralne dla różnych typów protonów (rejon iminowy, aminowy, aromatyczny, anomeryczny i cukrowy). Obecność w widmie dobrze rozdzielonych, stosunkowo wąskich linii rezonansowych wskazywała, że struktura, którą przyjmuje cząsteczka (AGG)₂A jest stabilna i jednorodna. W widmie zarejestrowanym w D₂O po 24 godzinach od wymiany rozpuszczalnika nadal były widoczne dwa sygnały iminowe (~ 11.5 ppm), które nie uległy wymianie na deuter, co oznaczało, że są one uwikłane w tworzenie wiązań wodorowych i są silnie chronione wewnątrz struktury.



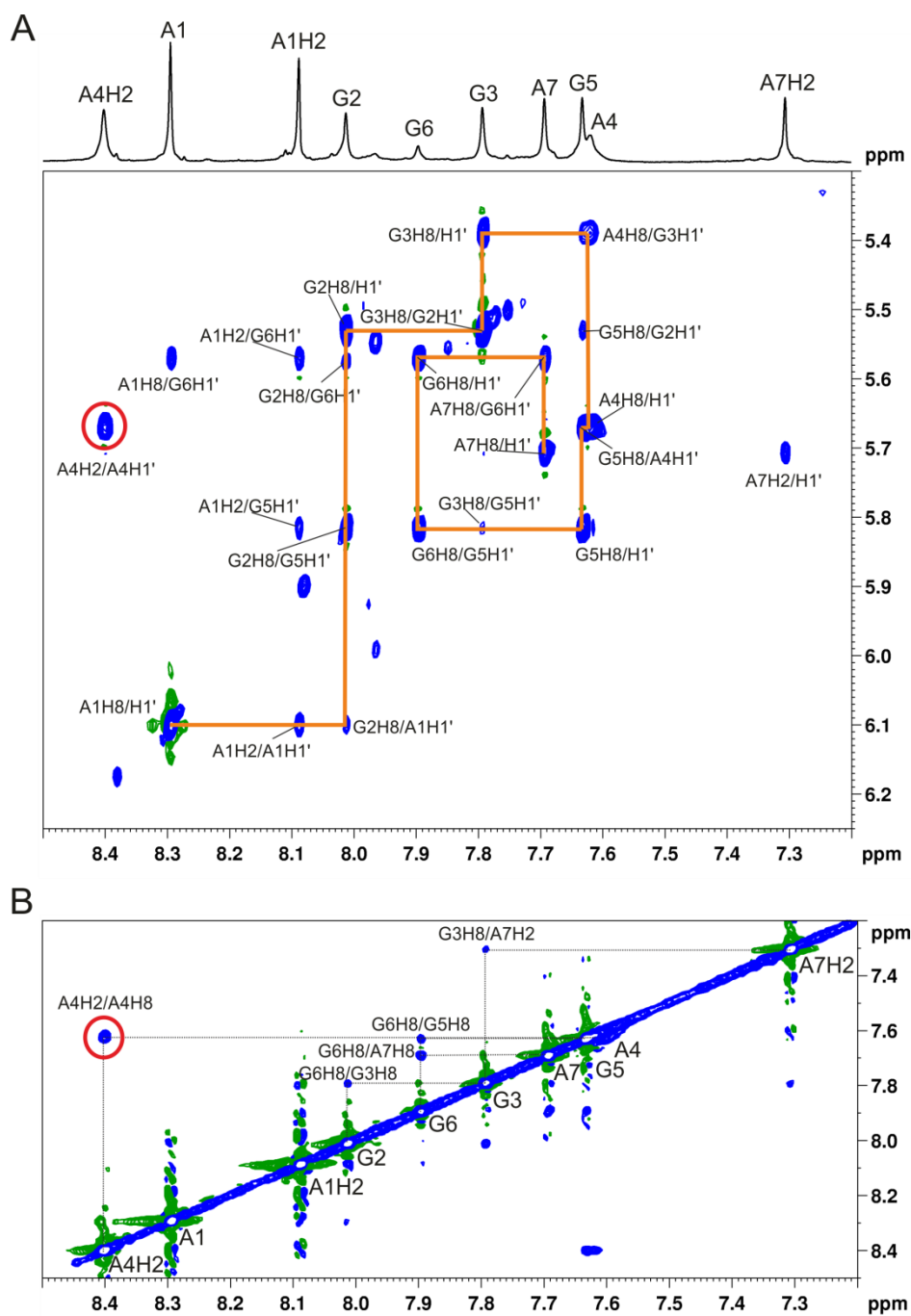
Rys. 63. Widma ¹H NMR, cząsteczki (AGG)₂A, zarejestrowane w 25 °C, z zaznaczonymi rejonami charakterystycznymi dla różnych grup protonów; [50 mM KCl, 10 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, 0.1 mM EDTA, pH 6.8].

Przypisanie sygnałów rezonansowych poszczególnym protonom rozpoczęłam od analizy widm wykonanych w D₂O. W tym celu zarejestrowałam zestaw dwuwymiarowych widm homo- i heterojądrowych: ¹H-¹H NOESY, ¹H-¹H COSY, ¹H-¹³C HSQC, ¹H-¹⁵N HSQC oraz ¹H-³¹P HSQC. Jako pierwsze przeanalizowałam widmo 2D NOESY przy czasie mieszania 400 ms, gdzie w rejonie aromatyczno – anomerycznym wyznaczyłam nieprzerwaną sekwencyjną ścieżkę NOE (Rys. 64 A). Na tej podstawie przypisałam sygnały protonów H8 i H1'. Pozostałe cztery sygnały w rejonie aromatycznym widma, nie należące do ścieżki NOE, mogłam przypisać do sygnałów od protonów H2. Obserwowane korelacje pomiędzy protonami H2 i H1' umożliwiły mi na przypisanie ich poszczególnym resztom adenozyiny. Zauważyłam jednak, że intensywność sygnału odpowiadającego oddziaływaniom pomiędzy protonami A4H2 i A4H1' jest dużo większa niż można by oczekiwać (Rys. 64 A, sygnał zaznaczony kolorem czerwonym). Na podstawie względnej objętości sygnałów w widmach NOESY można wnioskować o odległości pomiędzy atomami wodoru. Oszacowana przeze mnie odległość pomiędzy atomami H2 a H1' była dużo mniejsza niż 5 Å (mniej więcej tyle wynosi odległość pomiędzy atomami H2 a H1' pochodzącymi od tej samej reszty adenozyiny), co oznaczało, że sygnał ten musi pochodzić od oddziaływań międzycząsteczkowych. Jednocześnie analizowałam rejon aromatyczno-aromatyczny widma (Rys. 64 B), aby ustalić, czy istnieją oddziaływania warstwowe pomiędzy kolejnymi resztami (5'-A1→G2→G3→A4→G5→G6→A7-3'). W rejonie tym obserwowałam sygnały korelacyjne świadczące o istnieniu oddziaływań warstwowych jedynie pomiędzy resztami G2 a G3, G5 a G6 i G6 a A7 (Rys. 64 B). Dodatkowo, obserwowałam sygnał NOE pomiędzy protonami G3H8 a A7H2 oraz bardzo intensywny sygnał pomiędzy protonami A4H8 a A4H2 (Rys. 64 B, sygnał zaznaczony kolorem czerwonym). Ponieważ nie jest możliwe występowanie tego typu oddziaływania pomiędzy protonami należącymi do jednej reszty adenozyiny (odległość pomiędzy protonami A4H8 a A4H2 dla danej reszty jest większa niż 5 Å), obecność tego sygnału sugerowała, że reszta A4 oddziałuje warstwowo z resztą A4 pochodzącą od drugiej cząsteczki. Brak sekwencyjnych oddziaływań warstwowych pomiędzy resztami A1 a G2, G3 a A4 oraz A4 a G5 oznaczał, że kwadrupleks (AGG)₂A nie jest typową, liniową czteroniciową strukturą (Rys. 13), a reszta A4 jest najprawdopodobniej

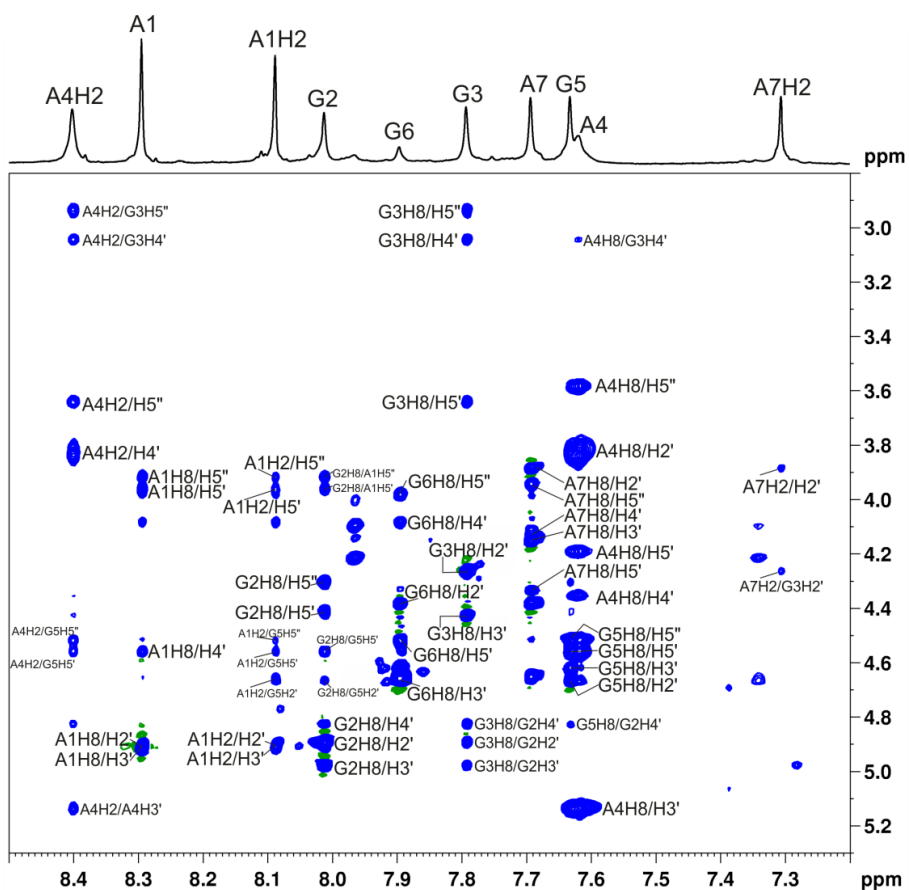
wybrzuszone lub stanowi element pętli. W następnej kolejności przypisałam sygnały korelacyjne pomiędzy protonami H6/H8 a pozostałymi protonami reszty cukrowej, H2', H3', H4', H5' oraz H5'' (Rys. 65). Na tym etapie bardzo pomocne okazały się widma ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HSQC oraz ^1H - ^{31}P HSQC (Rys. 66, 67, 68). Niestety, pomimo równoczesnej analizy wszystkich widm, dla reszty G5 nie byłam w stanie przypisać sygnału od protonu H4'. Wartości przesunięć chemicznych, $\delta(^1\text{H})$, dla cząsteczki (AGG)₂A zebrałam w tabeli 5.

Tabela 5. Wartości przesunięć chemicznych ^1H , $\delta(^1\text{H})$, dla cząsteczki (AGG)₂A, [ppm].

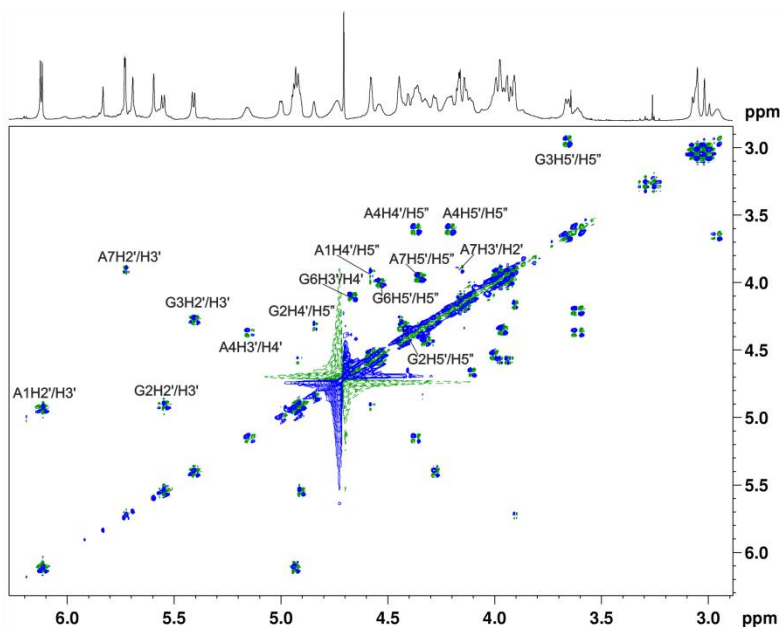
reszta	H6/H8	H2	H1'	H2'	H3'	H4'	H5'	H5''
A1	8.29	8.08	6.10	4.91	4.91	4.55	3.96	3.91
G2	8.01	-	5.53	4.89	4.97	4.82	4.41	4.30
G3	7.79	-	5.39	4.26	4.42	3.04	3.64	2.93
A4	7.62	8.40	5.67	3.83	5.13	4.35	4.19	3.58
G5	7.63	-	5.82	4.66	4.61	-	4.55	4.51
G6	7.89	-	5.57	4.38	4.65	4.10	4.52	3.97
A7	7.79	7.69	5.70	3.88	4.14	4.14	4.33	3.94



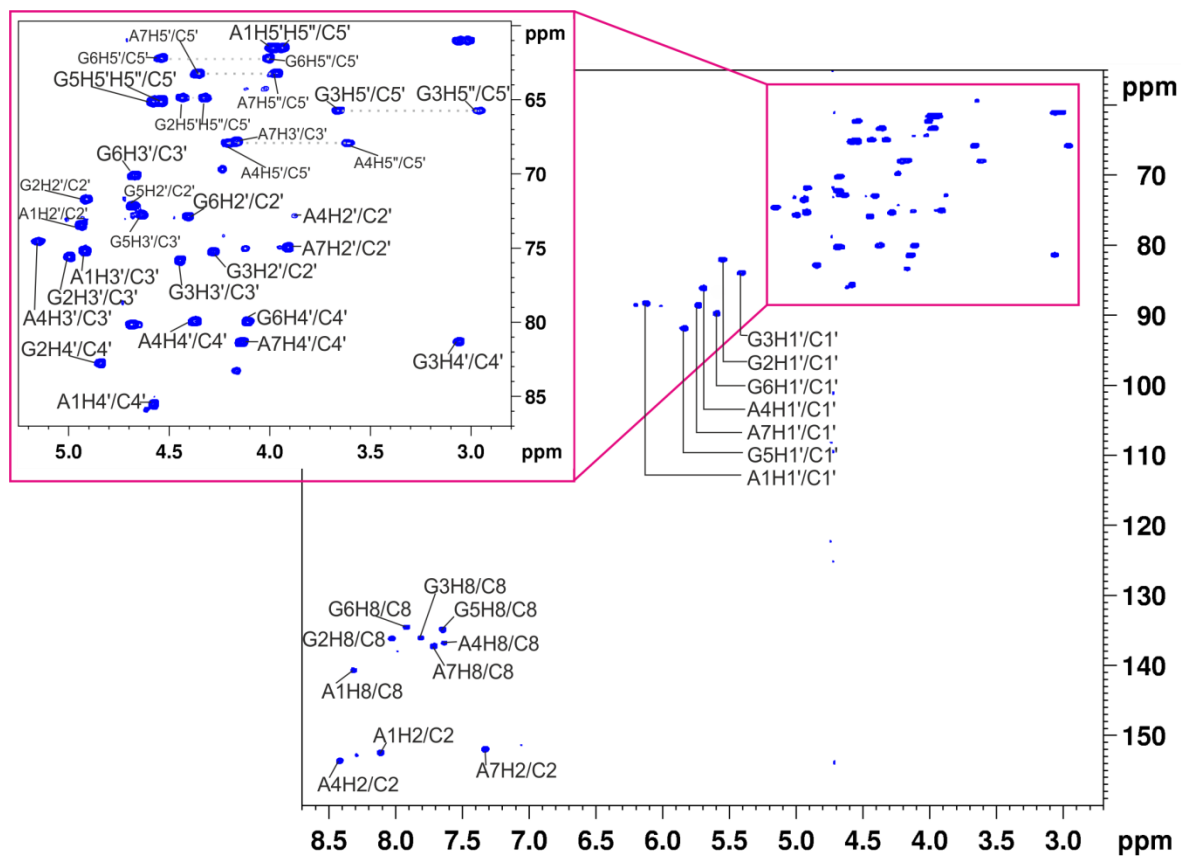
Rys. 64. Fragmenty widma 2D NOESY zarejestrowanego dla $(AGG)_2A$ w D_2O wraz z przypisaniami sygnałów w rejonach (A) aromatyczno – anomerycznym oraz (B) aromatyczno – aromatycznym. Kolorem pomarańczowym zaznaczona została sekwencyjna ścieżka NOE; [50 mM KCl, 10 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 , 0.1 mM EDTA, 90% H_2O : 10% D_2O , v:v, 25 °C, pH 6.8].



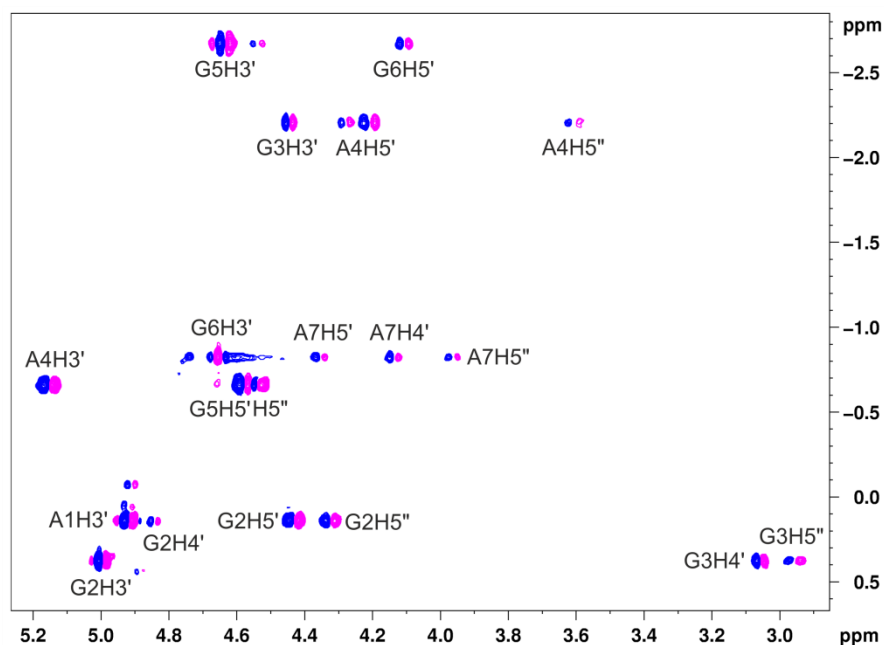
Rys. 65. Fragment widma 2D NOESY zarejestrowanego dla $(AGG)_2A$ w D_2O wraz z przypisaniami sygnałów [50 mM KCl, 10 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 , 0.1 mM EDTA, 25 °C, pH 6.8]



Rys. 66. Widmo 1H - 1H COSY zarejestrowane dla $(AGG)_2A$ w D_2O wraz z przypisaniami sygnałów; [50 mM KCl, 10 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 , 0.1 mM EDTA, 90% H_2O : 10% D_2O , v:v, 25 °C, pH 6.8].

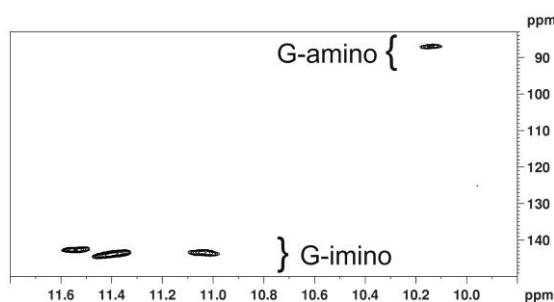


Rys. 67. Widmo ^1H - ^{13}C HSQC zarejestrowane dla $(\text{AGG})_2\text{A}$ w D_2O wraz z przypisaniami sygnałów; [50 mM KCl, 10 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, 0.1 mM EDTA, 25 °C, pH 6.8]

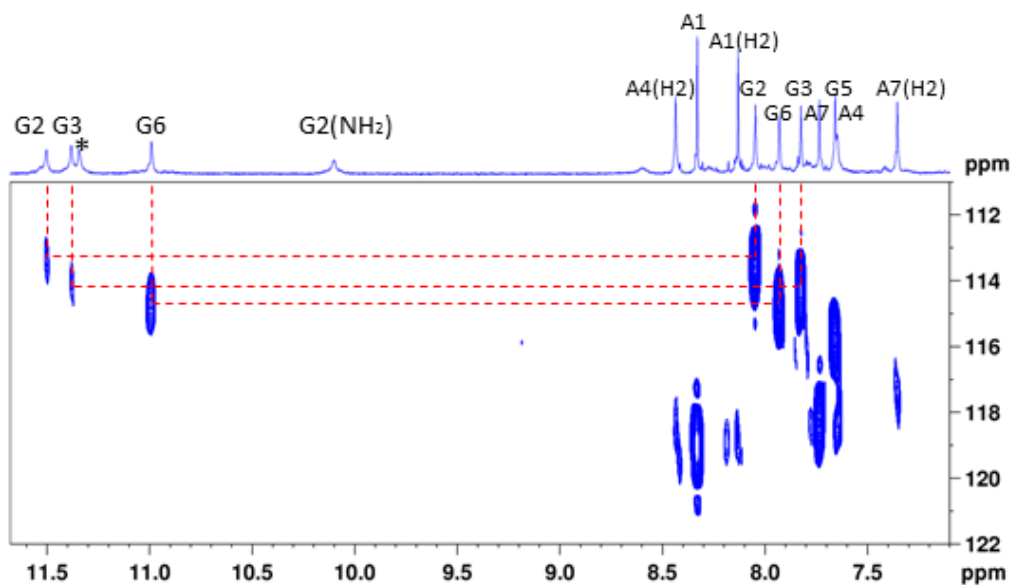


Rys. 68. Widmo ^1H - ^{31}P HSQC zarejestrowane dla $(\text{AGG})_2\text{A}$ w D_2O wraz z przypisaniami sygnałów; [50 mM KCl, 10 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, 0.1 mM EDTA, 90% H_2O : 10% D_2O , v:v, 25 °C, pH 6.8]

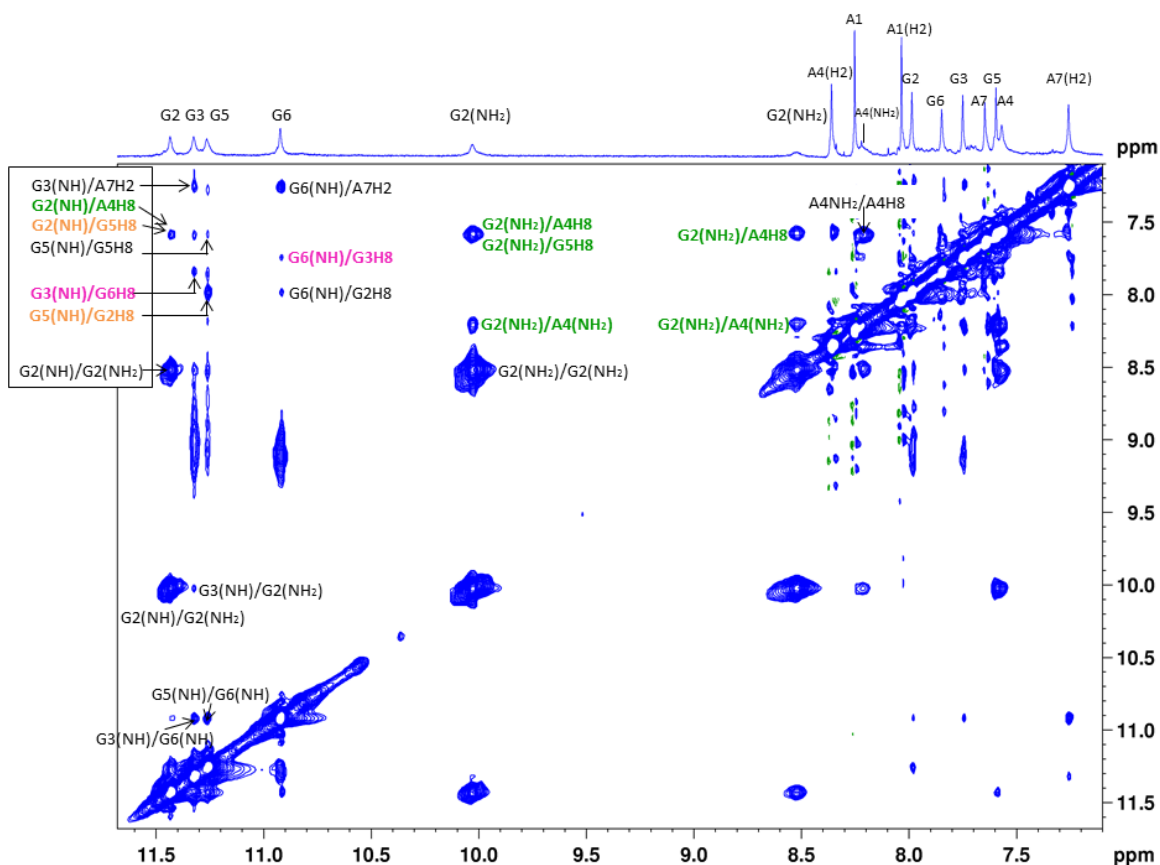
W następnym etapie należało zidentyfikować, które reszty zaangażowane są w tworzenie poszczególnych G-tetrad. Analizę rozpoczęłam od widma ^1H - ^{15}N HSQC, zarejestrowanego dla cząsteczki $(\text{AGG})_2\text{A}$ w wodzie (90% H_2O : 10% D_2O , v:v). Na podstawie charakterystycznych wartości przesunięć chemicznych atomów ^{15}N kowalencyjnie związanych z iminowymi i aminowymi atomami wodoru rozróżniłam sygnały protonów iminowych od aminowych (Rys. 69). Następnie dokonałam przypisania sygnałów iminowych do poszczególnych reszt guanozyny na podstawie analizy widm 2D: ^1H - ^{13}C HMBC oraz ^1H - ^1H NOESY, również zarejestrowanych dla próbki rozpuszczonej w wodzie (Rys. 70, 71). Miałam szczęście, gdyż sygnały protonów iminowych były ostre i dobrze rozdzielone, mogłam więc wykorzystać widma ^1H - ^{13}C HMBC, korelujące protony N1H i H8 do atomu węgla C5, które należą do tej samej reszty guanozyny. W taki sposób udało mi się jednoznacznie przypisać sygnały iminowe reszt G2 (11.46 ppm), G3 (11.35 ppm) i G6 (10.95 ppm). Oznaczało to, że pozostały nieprzypisany sygnał przy 11.29 ppm, najprawdopodobniej pochodzi od protonu iminowego reszty G5 (Rys. 70, zaznaczony gwiazdką). W kolejnym kroku, analizując widma NOESY zidentyfikowałam sygnały należące do dwóch G-tetrad: G2:G5:G2:G5 (Rys. 71, sygnały zaznaczone kolorem pomarańczowym) oraz G3:G6:G3:G6 (Rys. 71, sygnały zaznaczone kolorem różowym). Dla reszty A4, o której wiedziałam, że nie oddziałuje warstwowo z sąsiednimi resztami G3 i G5, zaobserwowałam w widmie kilka sygnałów korelacyjnych. Dla protonu A4H8 zidentyfikowałam sygnały NOE do protonu iminowego reszty G2 oraz do obu jej protonów aminowych. Ponadto zaobserwowałam sygnały NOE pomiędzy grupami aminowymi reszt G2 i A4 oraz pomiędzy G5H8 a G2NH₂ (Rys. 71, sygnały zaznaczone kolorem zielonym). W oparciu o dane literaturowe (8, 181) ustaliłam, że obecność wymienionych powyżej sygnałów w widmach NOESY świadczy o zawiązywaniu się w strukturze kwadrupleksu motywu heksady A4:(G2:G5:G2:G5):A4 (Rys. 19 B).



Rys. 69. Widmo ^1H - ^{15}N HSQC zarejestrowane dla cząsteczki $(\text{AGG})_2\text{A}$; [50 mM KCl, 10 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, 0.1 mM EDTA, 90% H_2O : 10% D_2O , v:v, 25 °C, pH 6.8].

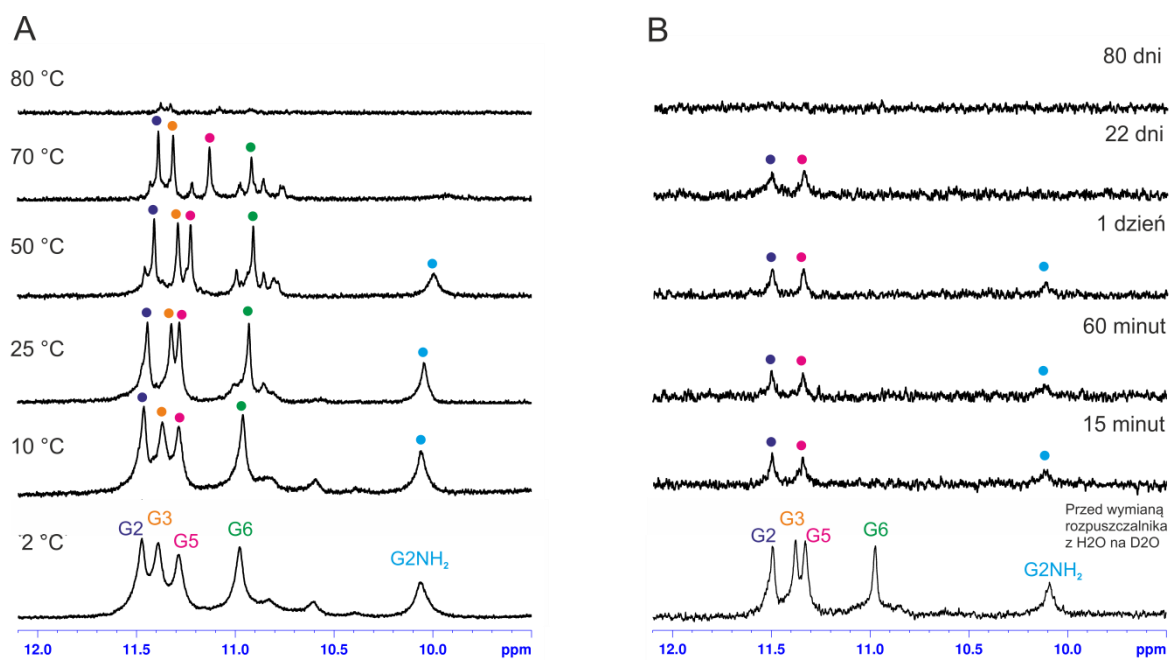


Rys. 70. Fragment widma ^1H - ^{13}C HMBC cząsteczki $(\text{AGG})_2\text{A}$. Linie przerywane łączą sygnały korelacyjne N1H - C5 oraz H8 - C5, dla tej samej reszty guanozyny [50 mM KCl, 10 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, 0.1 mM EDTA, 90% H_2O : 10% D_2O , v:v, 25 °C, pH 6.8].



Rys. 71. Iminowo – aromatyczny fragment widma 2D NOESY zarejestrowanego dla $(\text{AGG})_2\text{A}$ w wodzie wraz z przypisaniami sygnałów świadczących o powstawaniu poszczególnych G-tetrad i heksady A:(G:G:G:G):A; [50 mM KCl, 10 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, 0.1 mM EDTA, 90% H_2O : 10% D_2O , v:v, 25 °C, pH 6.8].

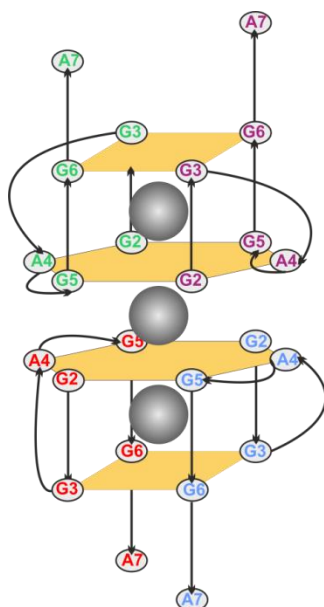
Jak już wcześniej wspomniałam, w przypadku struktur kwadrupleksów, iminowe atomy wodoru zaangażowane w tworzenie G-tetrazy wykazują niezwykle trwałość oraz są chronione przed wymianą na atom deuteru. Na rysunku 72 A pokazane są zmiany zachodzące w widmie ^1H NMR wraz ze wzrostem temperatury. Jak widać, sygnały pochodzące od protonów iminowych zanikają dopiero w temperaturze 80 °C, co oznacza, że powstający kwadrupleks jest bardzo trwały. Nieoczekiwanie sygnał przy 10.16 ppm od protonu aminowego reszty G2, biorącej udział w tworzeniu motywu heksady był również widoczny przy wyższych temperaturach i zanikał dopiero przy około 60 °C. Oznaczało to, że w jakiś sposób musi być chroniony wewnątrz struktury kwadrupleksu. Z kolei eksperyment wymiany rozpuszczalnika z H_2O na D_2O wykazał, że iminowe atomy wodoru reszt G2 i G5 (zaangażowane w tworzenie heksady) również są chronione wewnątrz struktury, ponieważ nie były dostępne dla atomu deuteru nawet po upływie 22 dni (Rys. 72 B). Co ciekawe, także aminowy atom wodoru reszty G2, nie uległ natychmiastowej wymianie na deuter.



Rys. 72. (A) Zależność widm ^1H NMR $(\text{AGG})_2\text{A}$ od temperatury [50 mM KCl, 10 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, 0.1 mM EDTA, 90% H_2O : 10% D_2O , v:v]. (B) Obserwowana w czasie wymiana iminowych atomów wodoru na deuter [50 mM KCl, 10 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, 0.1 mM EDTA, 100% D_2O , 25 °C, pH 6.8].

Biorąc pod uwagę wszystkie uzyskane wyniki, a szczególnie obecność międzycząsteczkowych sygnałów NOE pomiędzy A4H2 a $\text{A4H1}'$ oraz A4H2

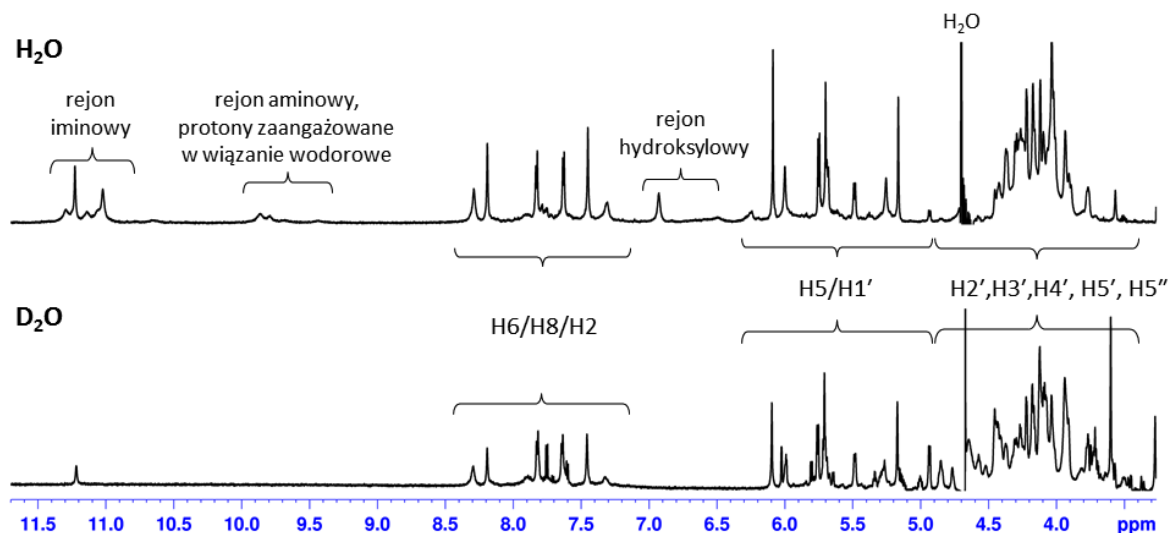
a A4H8, wskazujących na istnienie międzycząsteczkowego oddziaływania warstwowego pomiędzy resztami A4 oraz fakt, że iminowe atomy wodoru reszt G2 i G5 oraz aminowy atom wodoru reszty G2 są silnie chronione wewnątrz struktury, dla cząsteczki (AGG)₂A zaproponowałam model struktury kwadrupleksu przedstawiony na rysunku 73. Struktura ta utworzona jest z dwóch podjednostek – dwuniciowych, równoległych kwadrupleksów, których G-tetrazy połączone są pętlą zewnętrzną, a wypętlna reszta A4 zaangażowana jest w tworzenie heksady z tetradą G2:G5:G2:G5. Reszty A7 ułożone są nad tetradą G3:G6:G3:G6, o czym świadczy obecność sygnału NOE pomiędzy A7H8 a G6H8. W roztworze, w obecności kationów potasu dwie takie podjednostki asocjują tworząc czteroniciową strukturę stabilizowaną przez oddziaływania warstwowe pomiędzy heksadami oraz trzy kationy potasu.



Rys. 73. Model struktury kwadrupleksu (AGG)₂A. Kolorem szarym zaznaczyłam kationy potasu skoordynowane pomiędzy G-tetradami.

4.3.2. pUGGUGGU

Na rysunku 74. zestawiałam widma ^1H NMR, zarejestrowane dla cząsteczki $\text{p(UGG)}_2\text{U}$ w 90% H_2O : 10% D_2O , v:v, i w D_2O z zaznaczonymi charakterystycznymi zakresami spektralnymi. Widma te wskazywały, że w obecności kationów potasu w roztworze istnieje jedna, stabilna forma kwadrupleksu.



Rys. 74. Widma ^1H NMR, cząsteczki $\text{p(UGG)}_2\text{U}$, zarejestrowane w 25 °C, z zaznaczonymi rejonami występowania poszczególnych grup protonów; [50 mM KCl, 10 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, 0.1 mM EDTA, pH 6.8].

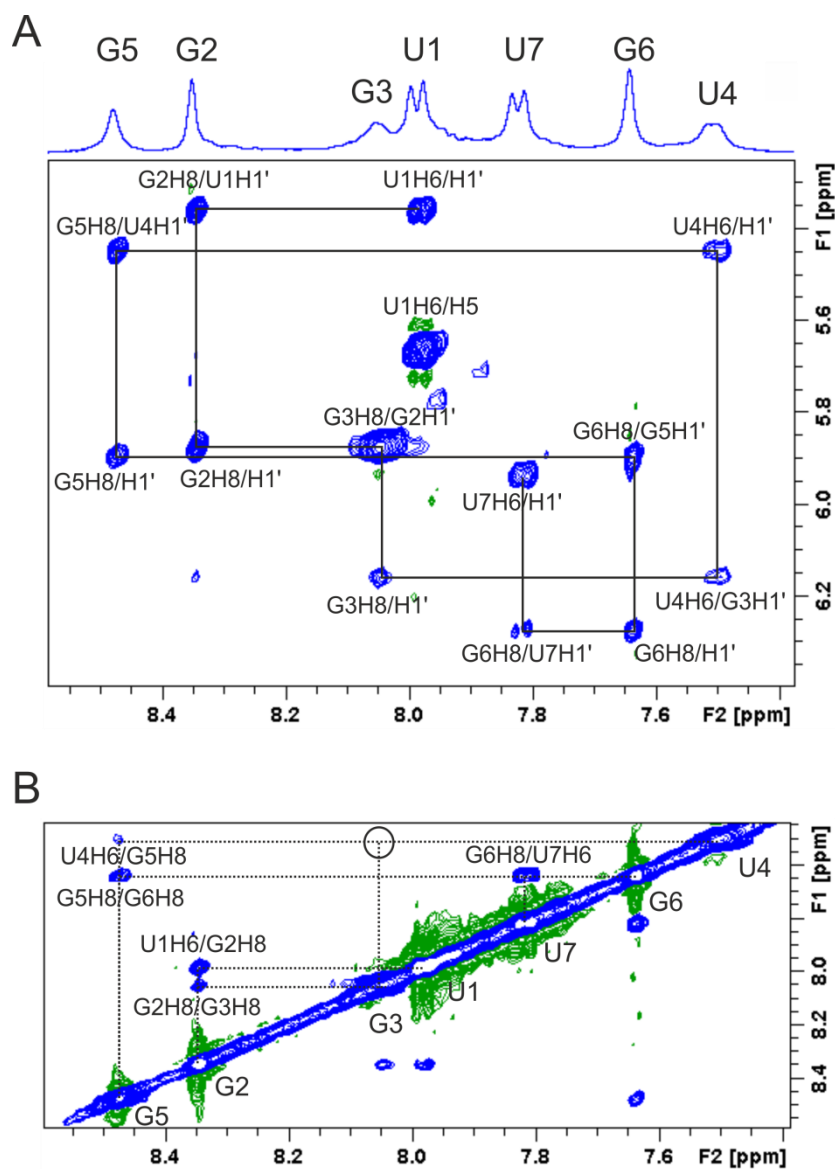
Podobnie jak w omawianym wcześniej przypadku, sygnały rezonansowe przypisałam analizując dwuwymiarowe, homo- i heterojądrowe widma ^1H - ^1H NOESY, ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{15}N HSQC oraz ^1H - ^{31}P HSQC. Na rysunku 75 A. pokazany jest rejon aromatyczno-anomeryczny widma 2D NOESY, zarejestrowanego dla cząsteczki $\text{p(UGG)}_2\text{U}$ w D_2O . W tym rejonie, jako pierwsze zidentyfikowałam sygnały korelacyjne pomiędzy protonami H5 i H6 urydyn. Takie sygnały w widmie 2D NOESY charakteryzują się dużą intensywnością. Ponadto w widmach 2D COSY są to jedyne sygnały korelacyjne występujące w tym rejonie, dzięki czemu zostają one łatwo rozpoznane przez nałożenie obu widm. W ten sposób przypisałam wszystkie trzy sygnały H5/H6. Następnie wyznaczyłam sekwencyjną ścieżkę NOE pomiędzy protonami reszt H6 i H8 a protonami anomerycznymi (H1'). W celu sprawdzenia poprawności przypisań w rejonie aromatyczno-aromatycznym analizowałam, czy pomiędzy kolejnymi resztami w sekwencji występują oddziaływania warstwowe (5'-pU1→G2→G3→ U4→G5→G6→U7-3'). Sygnału od oddziaływań warstwowych

nie obserwowalam jedynie pomiedzy resztami G3 i U4, co moglo oznaczac, ze srodkowa reszta urydyny jest w tych warunkach wybrzuszona (Rys. 75 B). Nieobecność tego sygnału korelacyjnego w widmie NOESY może również wynikać z silnego poszerzenia sygnałów G3H8 i U4H6, co jest widoczne w górnej części rysunku 75, gdzie pokazany jest fragment widma 1D ¹H NMR.

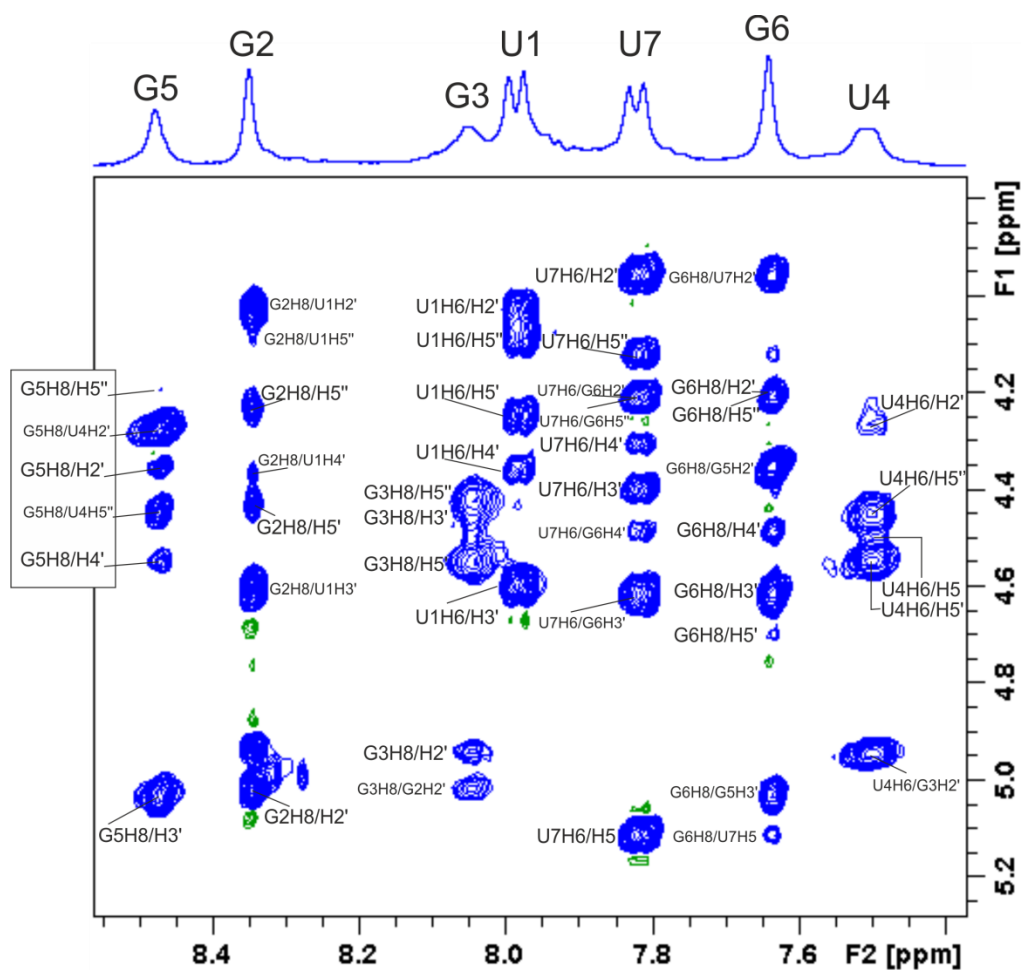
Następnie przypisałam sygnały korelacyjne pomiedzy protonami H6/H8 a pozostałymi protonami reszty cukrowej, H2', H3', H4', H5' oraz H5'' (Rys. 76). Jednocześnie analizowałam widma ¹H-¹H COSY, ¹H-¹³C HSQC oraz ¹H-³¹P HSQC (Rys. 77, 78, 79). Niestety, dla reszty G2 nie byłam w stanie zidentyfikować sygnałów protonów H3' oraz H4', dla reszty U4 sygnału protonu H4', a dla reszty U7 sygnału protonu H5'. Mogło to być następstwem silnego poszerzenia tych sygnałów. W tabeli 6. zebrałam wartości przesunięć chemicznych δ(¹H) dla p(UGG)₂U otrzymane z widm NMR wykonanych w temperaturze 30 °C.

Tabela 6. Wartości przesunięć chemicznych atomów wodoru dla cząsteczki p(UGG)₂U.

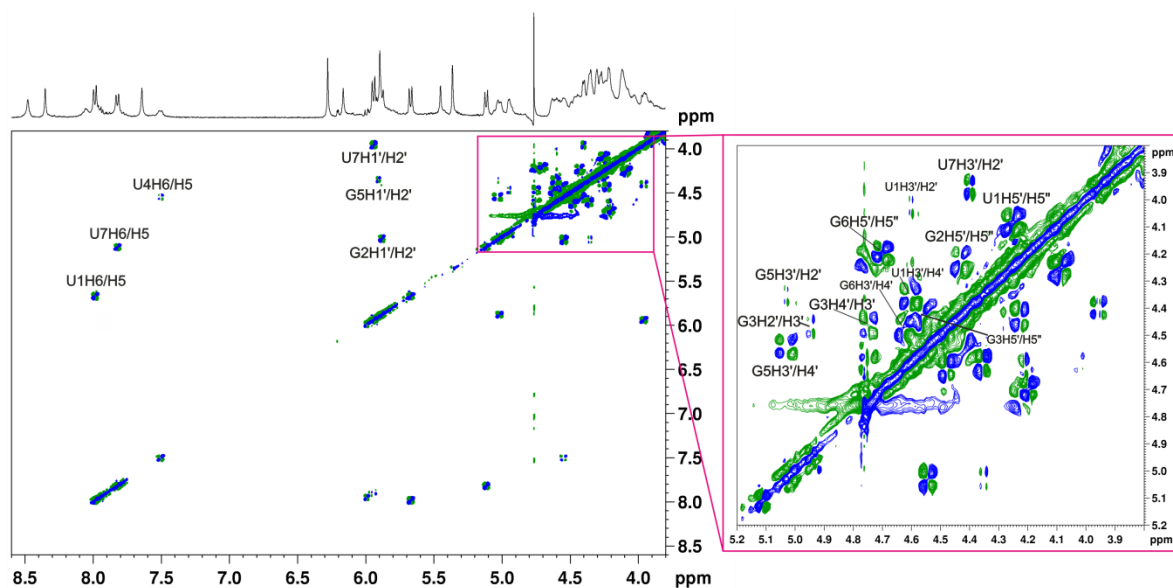
reszta	H6/H8	H5	H1'	H2'	H3'	H4'	H5'	H5''
U1	7.98	5.66	5.35	4.02	4.60	4.36	4.24	4.08
G2	8.34		5.87	5.01	-	-	4.42	4.22
G3	8.05		6.16	4.94	4.46	4.75	4.23	4.38
U4	7.50	4.54	5.44	4.26	4.47	-	4.54	4.44
G5	8.47		5.89	4.35	5.03	4.54	4.75	4.19
G6	7.64		6.27	4.20	4.61	4.48	4.69	4.20
U7	7.82	5.11	5.93	3.95	4.39	4.30	-	4.11



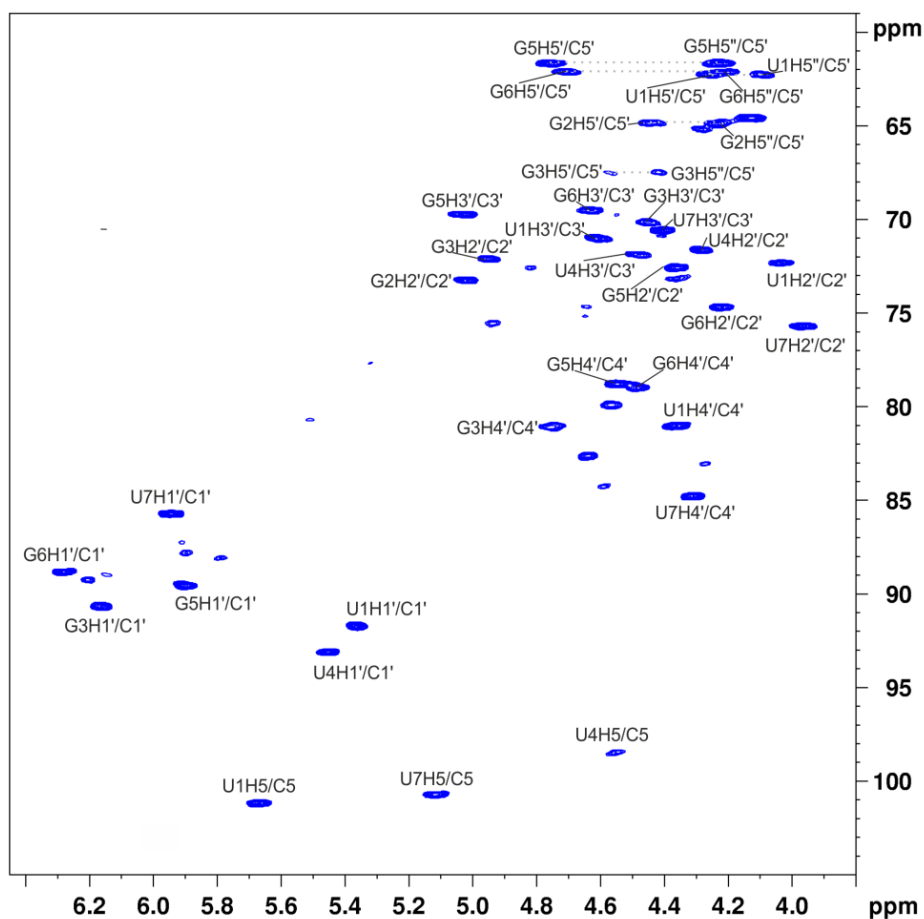
Rys. 75. Fragmenty widma 2D NOESY zarejestrowanego dla p(UGG)₂U w D₂O wraz z przypisaniami sygnałów w rejonach (A) aromatyczno – anomerycznym oraz (B) aromatyczno – aromatycznym; [50 mM KCl, 10 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, 0.1 mM EDTA, 30 °C, pH 6.8]. Czarną linią ciągłą zaznaczyłam sekwencyjną ścieżkę NOE (A). Czarną przerywaną linią zaznaczyłam sygnały pochodzące od sekwencyjnych oddziaływań warstwowych (B).



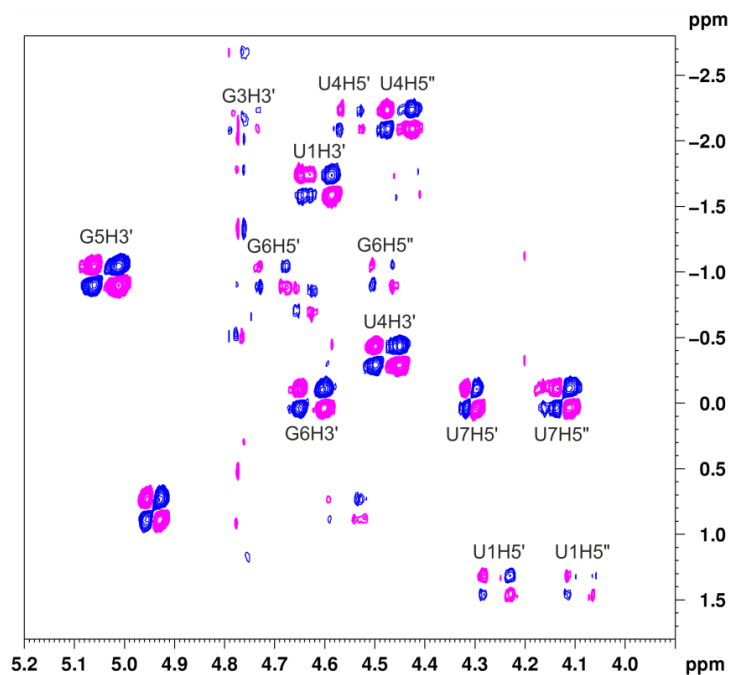
Rys. 76. Fragment widma 2D NOESY zarejestrowanego dla p(UGG)₂U w D₂O wraz z przypisaniami sygnałów [50 mM KCl, 10 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, 0.1 mM EDTA, 30 °C, pH 6.8].



Rys. 77. Widmo ¹H-¹H COSY zarejestrowane dla p(UGG)₂U w D₂O wraz z przypisaniami sygnałów; [50 mM KCl, 10 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, 0.1 mM EDTA, 30 °C, pH 6.8]



Rys. 78. Widmo ^1H - ^{13}C HSQC zarejestrowane dla p(UGG)₂U w D₂O wraz z przypisaniami sygnałów; [50 mM KCl, 10 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, 0.1 mM EDTA, 30 °C, pH 6.8]

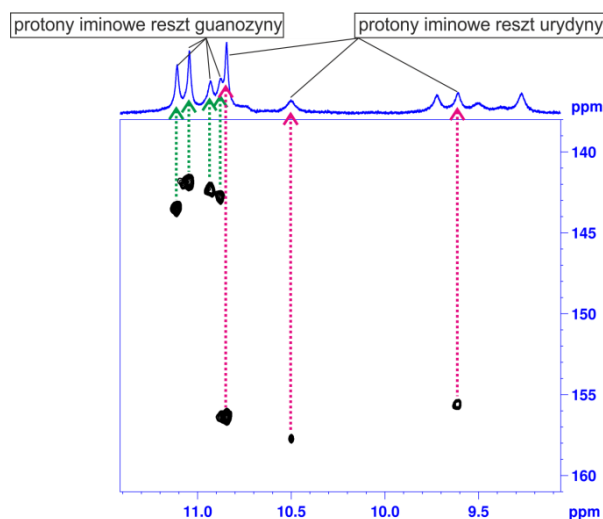


Rys. 79. Widmo ^1H - ^{31}P HSQC zarejestrowane dla p(UGG)₂U w D₂O wraz z przypisaniami sygnałów; [50 mM KCl, 10 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, 0.1 mM EDTA, 30 °C, pH 6.8]

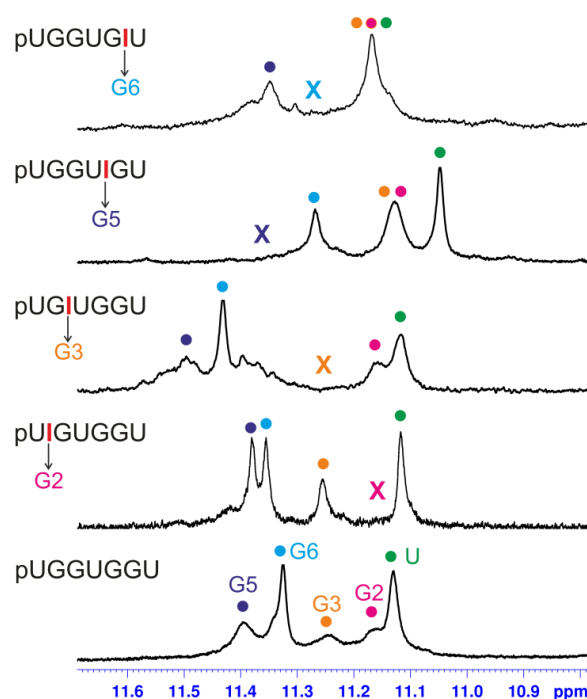
Następnym krokiem było przypisanie sygnałów iminowych pochodzących od reszt guanozyny i urydyny. Na podstawie analizy widma ^1H - ^{15}N HSQC mogłam rozróżnić protony iminowe reszt guanozyny od protonów iminowych reszt urydyny, gdyż atomy azotu N1 reszt guanozyny są zawsze silniej ekranowane niż atomy N3 reszt urydyny. Typowe wartości przesunięć chemicznych dla atomów N3 reszt urydyny to ~ 160 ppm, natomiast dla atomów N1 reszt guanozyny: 140 - 150 ppm. Widmo to zarejestrowałam w temperaturze 3 °C w celu spowolnienia procesu wymiany iminowych i aminowych atomów wodoru z wodą. Dzięki temu udało mi się zidentyfikować trzy protony iminowe pochodzące od reszt urydyny (9.85 ppm, 10.73 ppm i 11.08 ppm) oraz cztery iminowe atomy wodoru reszt guanozyny (11.11 ppm, 11.17 ppm, 11.28 ppm i 11.34 ppm) (Rys. 80).

Niestety w przypadku tej cząsteczki, pomimo wielu prób, nie uzyskałam spodziewanych sygnałów korelacyjnych w widmie ^1H - ^{13}C HMBC. Jak już wcześniej wspomniałam, widmo to charakteryzuje się niezwykle małą czułością, dlatego wykonuje się je dla możliwie jak największego stężenia RNA, zazwyczaj w podwyższonej temperaturze, aby otrzymać wąskie sygnały. Niestety w widmie ^1H NMR cząsteczki p(UGG)₂U, niektóre sygnały były znacznie poszerzone, zarówno w rejonie iminowym, jak i aromatycznym i wyostrzały się dopiero w temperaturze 70 °C. Ponieważ rejestracja widma ^1H - ^{13}C HMBC trwa przynajmniej dwa dni, przetrzymywanie RNA w tak wysokiej temperaturze groziło degradacją próbki. Dlatego też w celu jednoznacznego przypisania sygnałów iminowych do poszczególnych reszt guanozyny postanowiłam wykorzystać podejście, w którym reszty guanozyny zastępuje się kolejno resztą inozyny. Otrzymałam cztery różne cząsteczki, w których reszty guanozyny G2, G3, G5 i G6 zostały zastąpione przez resztę inozyny. Dla każdej z tych cząsteczek zarejestrowałam widmo ^1H NMR i na podstawie obserwacji, który z sygnałów zanika w zakresie 10 – 12 ppm, w stosunku do widma cząsteczki niemodyfikowanej, przypisałam sygnały iminowe reszt guanozyny (Rys. 81). Chociaż spodziewałam się, że eksperyment ten dostarczy mi bardziej jednoznacznych informacji, uważna analiza widm zamieszczonych na rysunku 81., poparta obserwacją odpowiednich kontaktów w widmach NOESY, pozwoliła mi na przypisanie sygnałów iminowych poszczególnym resztom guanozyny. Kolejnym krokiem było przypisanie sygnałów iminowych od reszt urydyny. W tym celu prześledziłam ścieżkę połączeń sekwencyjnych w rejonie iminowo – iminowym widma NOESY (Rys. 82). Dużym

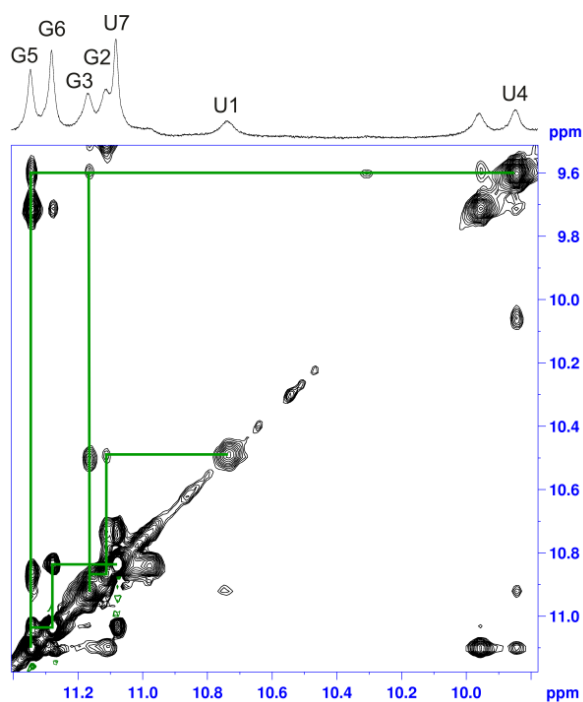
ułatwieniem w poprawnym wyznaczeniu tej ścieżki była znajomość położenia protonów iminowych reszt guanozyny. Dzięki temu udało mi się ustalić, że najbardziej ekranowany jest sygnał pochodzący od protonu U4N3H (9.85 ppm). Szeroki sygnał przy 10.73 ppm przypisałam do U1N3H, a ostry sygnał przy 11.08 ppm do protonu U7N3H.



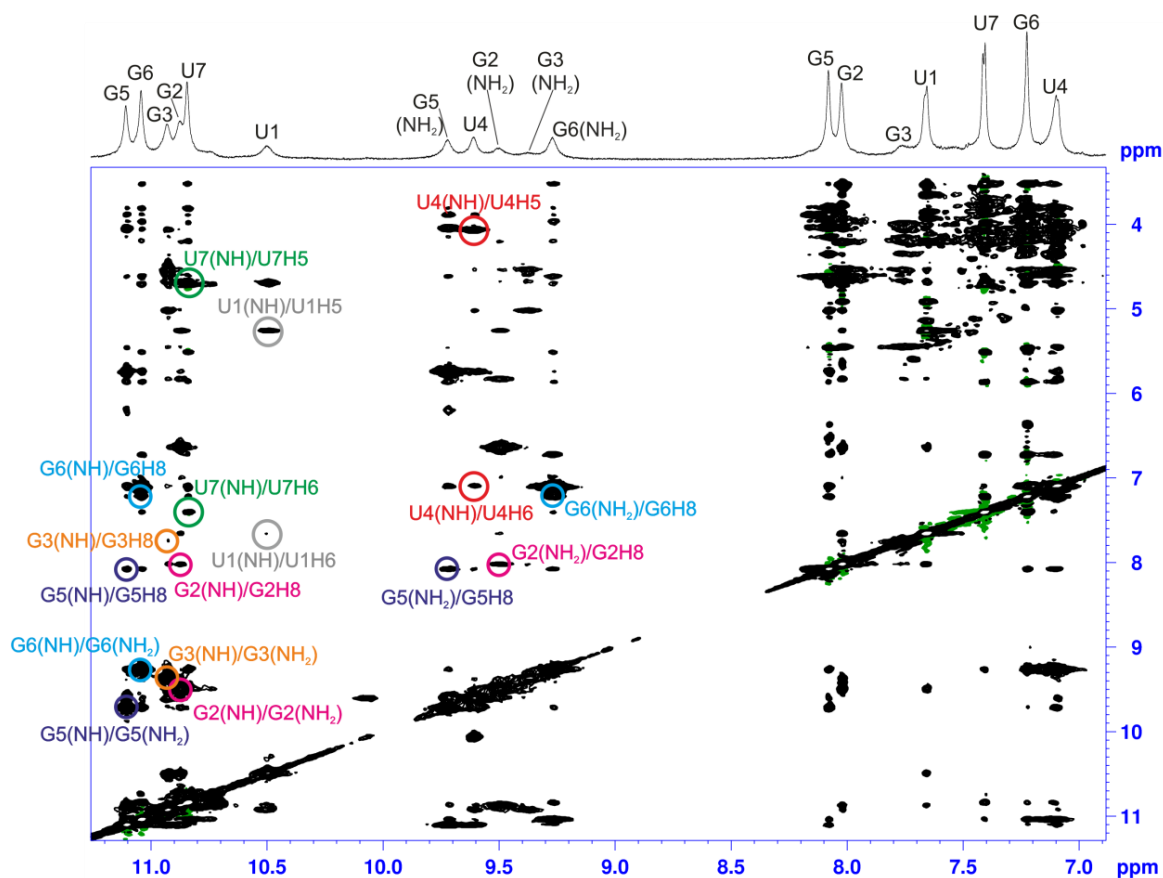
Rys. 80. Fragment widma 2D ^1H - ^{15}N HSQC zarejestrowanego dla $p(\text{UGG})_2\text{U}$, na podstawie którego zidentyfikowane zostały sygnały iminowych atomów wodoru reszt guanozyny oraz reszt urydyny [50 mM KCl, 10 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, 0.1 mM EDTA, 90% H_2O : 10% D_2O , v:v, 3 °C, pH 6.8].



Rys. 81. Porównanie rejonu iminowego widm ^1H NMR otrzymanych dla cząsteczki $p(\text{UGG})_2\text{U}$ oraz cząsteczek, w których reszty guanozyny G2, G3, G5 i G6 zostały zastąpione przez resztę inozyny [50 mM KCl, 10 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, 0.1 mM EDTA, 90% H_2O : 10% D_2O , v:v, 25 °C].

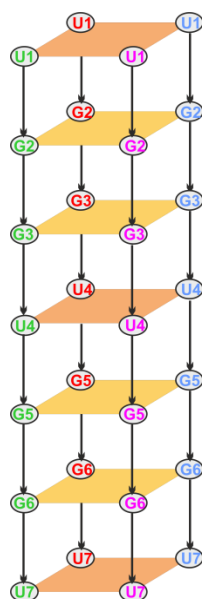


Rys. 82. Rejon iminowo-iminowy widma 2D NOESY zarejestrowanego dla p(UGG)₂U w wodzie wraz z zaznaczoną ścieżką połączeń sekwencyjnych [50 mM KCl, 10 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, 0.1 mM EDTA, 90% H₂O : 10% D₂O, v:v, 3 °C, pH 6.8].



Rys. 83. Fragment widma 2D NOESY zarejestrowanego dla p(UGG)₂U w wodzie wraz z przypisaniami sygnałów świadczących o powstawaniu poszczególnych G-tetrad i U-tetrad [50 mM KCl, 10 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, 0.1 mM EDTA, 90% H₂O : 10% D₂O, v:v, 3 °C, pH 6.8].

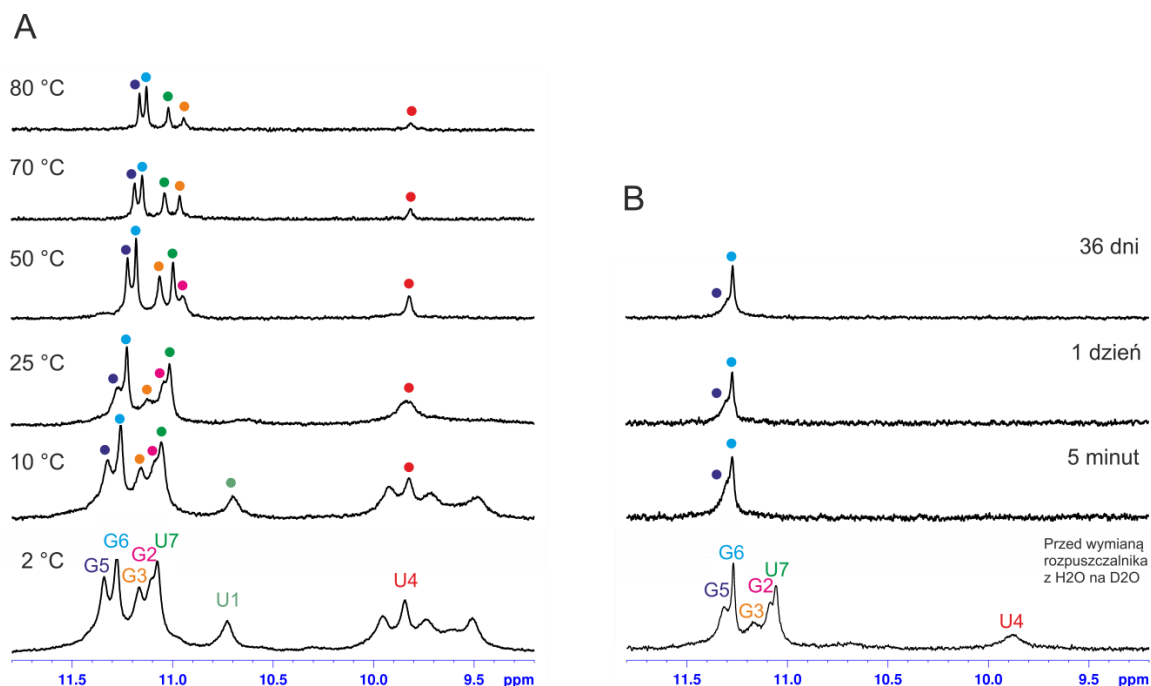
W widmie 2D NOESY zarejestrowanym w wodzie w temperaturze 3 °C zidentyfikowałam sygnały korelacyjne pomiędzy protonem H8 jednej reszty guanozyny a protonem iminowym sąsiadującej z nią reszty guanozyny, wewnątrz G-tetrazy (Rys. 83). Obecność tych charakterystycznych dla G-tetrad sygnałów pozwoliła mi ustalić, że w strukturze kwadrupleksu p(UGG)₂U występują cztery G-tetrazy: G2:G2:G2:G2 (Rys. 83, sygnały zaznaczone kolorem różowym), G3:G3:G3:G3 (Rys. 83, sygnał zaznaczony kolorem pomarańczowym), G5:G5:G5:G5 (Rys. 83, sygnał zaznaczony kolorem granatowym) i G6:G6:G6:G6 (Rys. 83, sygnał zaznaczony kolorem niebieskim). Ponadto w widmie tym dla reszt U1, U4 i U7 zaobserwowałam sygnały korelacyjne pomiędzy protonami H6 i H5 a protonem iminowym urydyny (Rys. 83, sygnały zaznaczone kolorem: szarym dla U1, czerwonym dla U4 oraz zielonym dla U7), co jest typowym wzorem dla U-tetrad (Rozdział 3.3.1.). Wynik ten, łącznie z uzyskanymi wcześniej wynikami CD i ESI-MS wskazywał, że p(UGG)₂U tworzy czteroniciowy, równoległy, kwadrupleks zbudowany z czterech G-tetrad i trzech U-tetrad, schematycznie przedstawiony na rysunku 84.



Rys. 84. Model struktury kwadrupleksu p(UGG)₂U.

Następnie zarejestrowałam widma ¹H NMR w funkcji temperatury (Rys. 85 A) oraz sprawdziłam dostępność iminowych atomów wodoru reszt guanozyny oraz urydyny dla atomu deuteru (Rys. 85 B). Okazało się, że sygnały reszt iminowych, pochodzących od reszt G6 i G5 były najbardziej trwałe i razem z protonami reszt G3, U4 i U7 nie zanikały nawet w temperaturze 80 °C

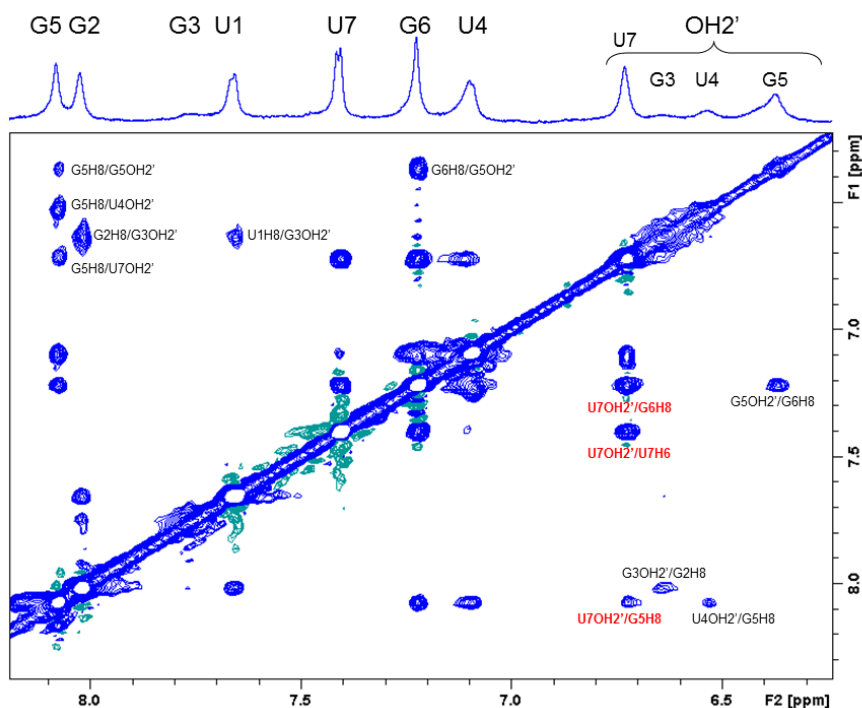
(Rys. 85 A). Ten wynik wykazał niezwykle stabilność struktury na końcu 3'. Spodziewałam się, że proces topnienia struktury rozpocznie się od rozplatania obu końców, 5' i 3', czyli, że w widmie zarejestrowanym w podwyższonej temperaturze będę najpierw obserwować zanikanie sygnałów iminowych reszt terminalnych. Analiza widm zarejestrowanych w D₂O ukazała, że protony iminowe reszt G5 i G6 są silnie chronione wewnątrz struktury i nie ulegają wymianie na deuter nawet po upływie 36 dni (Rys. 85 B).



Rys. 85. (A) Zależność widm ¹H NMR p(UGG)₂U od temperatury [50 mM KCl, 10 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, 0.1 mM EDTA, 90% H₂O : 10% D₂O, v:v]. (B) Obserwowana w czasie wymiana iminowych atomów wodoru na deuter [50 mM KCl, 10 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, 0.1 mM EDTA, 100% D₂O, 25 °C, pH 6.8].

W widmie 2D NOESY wykonanym w 90% H₂O : 10% D₂O, v:v, w temperaturze 3 °C udało mi się przypisać sygnały pochodzące od protonów grup OH2' reszt G3, U4, G5 i U7. Należy podkreślić, że jest to niezwykle, ponieważ dotychczas znanych jest niewiele przypadków, gdzie w widmach NMR obserwuje się sygnały od protonów OH2', gdyż zazwyczaj ulegają one bardzo szybkiej wymianie z wodą i są niewidoczne nawet w widmie rejestrowanym w niskich temperaturach. Najbardziej zaskakująca była obecność w widmie NOESY intensywnych sygnałów korelacyjnych pomiędzy atomem wodoru U7OH2' a G5H8, G6H8 i U7H6 (zaznaczone na czerwono, Rys. 86), co świadczyło o bliskim sąsiedztwie tych

atomów wodoru w przestrzeni (odległość < 5 Å). Takie sygnały mogłabym obserwować jedynie wtedy, gdy reszta U7 byłaby skierowana częścią cukrową do środka struktury (w kierunku 5'), co przy równoległym ułożeniu czterech nici RNA jest niemożliwe. Zaczęłam więc przypuszczać, że kwadrupleks p(UGG)₂U w jakiś sposób dimeryzuje oddziałując końcami 3'.



Rys. 86. Fragment widma NOESY dla p(UGG)₂U w wodzie; [50 mM KCl, 10 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, 0.1 mM EDTA, 90% H₂O : 10% D₂O, v:v, 3 °C, pH 6.8]. Kolorem czerwonym zostały zaznaczone sygnały korelacyjne sugerujące możliwość powstania dimeru kwadrupleksów z zażębionymi końcami 3'.

Powstawanie takiego dimeru tłumaczyłoby dużą stabilność termiczną końca 3' oraz obecność nietypowych sygnałów korelacyjnych dla protonu U7OH2'. Niestety pomiar ESI-MS (Rozdział 4.2.4.) nie wykazał istnienia struktury złożonej z ośmiu nici, co byłoby jednoznacznym dowodem na powstawanie dimeru czteroniciowych kwadrupleksów. Należy jednak pamiętać, że widma masowe wykonywane były w innych warunkach niż widma NMR. Co prawda porównanie widm ¹H NMR otrzymanych w obecności kationów K⁺ i NH₄⁺ sugerowało tworzenie się takiej samej struktury w przypadku próbek zawierających 0.01 mM stężenie RNA, mimo wszystko postanowiłam sprawdzić, czy w kwadrupleks p(UGG)₂U może dimeryzować w obecności jonów NH₄⁺. W tym celu przygotowałam próbkę w buforze Tris-HCl (10 mM) z dodatkiem 150 mM NH₄Cl i zarejestrowałam widmo

^1H NMR. W widmie tym przesunięcia linii rezonansowych w rejonie aromatycznym dla atomów H6 i H8 są bardzo podobne do sygnałów obserwowanych w widmie zarejestrowanym w obecności jonów K^+ , co potwierdza powstawanie analogicznej struktury w obu tych warunkach. Jednakże w widmie otrzymanym w obecności jonów NH_4^+ nie ma sygnału od atomu wodoru OH2' reszty U7, co oznaczało, że ten atom wodoru ulegał szybkiej wymianie z wodą (widmo rejestrowane w 90% H_2O : 10% D_2O , v:v). Ten wynik sugerował, że kation amonowy nie wspomaga tworzenia dimeru. W celu potwierdzenia tej tezy, porównać współczynniki dyfuzji translacyjnej dla kwadrupleksu $\text{p}(\text{UGG})_2\text{U}$ w obu tych warunkach. Wartość współczynnika dyfuzji zależy pośrednio od wielkości cząsteczki, spodziewałam się więc otrzymać różne jego wartości dla czteroniciowego monomeru (dla roztworu zawierającego jony NH_4^+) i ośmioniciowego dimeru (dla roztworu zawierającego jony K^+). Zgodnie z oczekiwaniem otrzymane metodami spektroskopii NMR współczynniki różnią się i wynoszą odpowiednio 1.154×10^{-10} [m^2s^{-1}] dla kwadrupleksu obecnego w roztworze zawierającym jony K^+ oraz 1.228×10^{-10} [m^2s^{-1}] dla kwadrupleksu obecnego w roztworze zawierającym jony NH_4^+ . Oznacza to, że struktura powstająca w obecności kationów potasu dyfunduje wolniej, czyli musi być większa od struktury powstającej w obecności kationów amonu, co potwierdzało możliwość dimeryzacji.

4.4. Badania w ekstrakcie z komórek HeLa

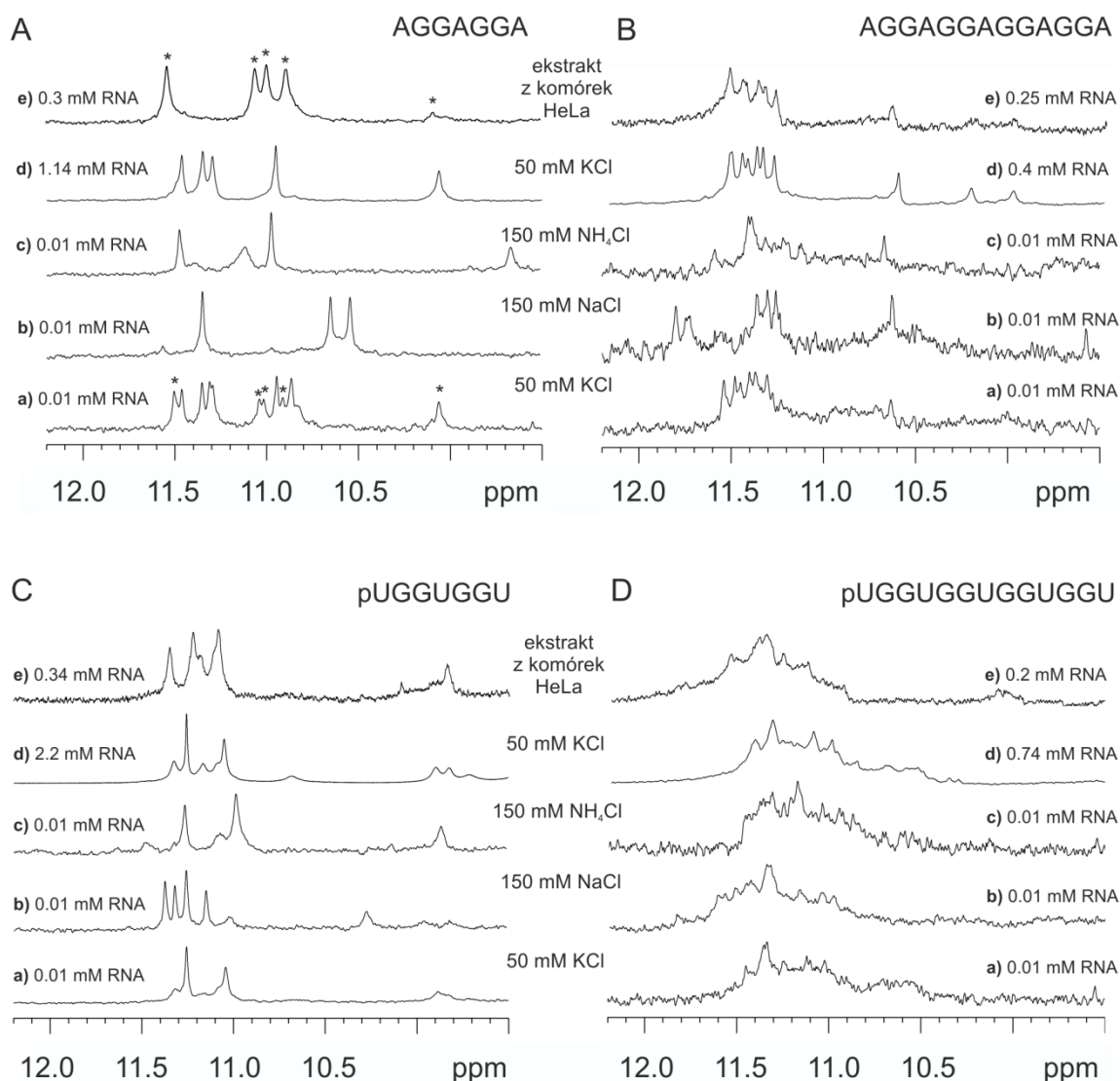
Badania opisane w rozdziale 4.2. wykazały, że cząsteczki zbudowane z powtórzeń AGG i UGG tworzą różne formy w roztworach zawierających kationy potasu lub sodu, dwóch powszechnie występujących w komórce kationów. Postanowiłam sprawdzić, która z tych form występuje w środowisku komórkowym. Aby zbliżyć się do warunków panujących wewnątrz komórki zastosowałam ekstrakt z komórek HeLa, do którego dodawałam 5 OD odpowiednio (AGG)₂A, (AGG)₄A, p(UGG)₂U oraz p(UGG)₄U. Ekstrakt z komórek HeLa jest dobrym systemem modelowym do badań ¹H NMR, ponieważ w jego widmie nie występują sygnały w zakresie spektralnym powyżej 9.5 ppm, w którym obserwowane są kluczowe sygnały iminowe pochodzące od G-tetrad.

Dla każdej próbki zarejestrowałam widmo ¹H NMR. Otrzymane widma porównałam z widmami otrzymanymi wcześniej dla niskich stężeń RNA w obecności jonów K⁺ NH₄⁺ i Na⁺ oraz dla wysokiego stężenia RNA w środowisku jonów K⁺ (Rys. 87 A-D).

Na rysunku 87 A zestawiałam widma ¹H NMR zarejestrowane dla cząsteczki (AGG)₂A. Jak widać, sygnały obecne w widmie wykonanym w ekstrakcie odpowiadają jednej z trzech form widocznych w widmie zarejestrowanym w środowisku jonów K⁺ i niskim stężeniu RNA (sygnały zaznaczone gwiazdką). Na dodatek nie jest to struktura, która staje się dominującą, gdy zwiększa się stężenie RNA. W przypadku cząsteczki zbudowanej z czterech powtórzeń AGG, widmo ¹H NMR otrzymane w warunkach komórkowych było praktycznie takie samo jak widma otrzymane zarówno dla małego (0.01 mM), jak i dużego (1.14 mM) stężenia RNA, w obecności kationów potasu (Rys. 87 B). Wynik ten wskazuje na to, że wydłużenie sekwencji do czterech powtórzeń AGG doprowadziło do utworzenia bardziej konserwatywnej struktury kwadrupleksu.

W widmie zarejestrowanym dla cząsteczki p(UGG)₂U w ekstrakcie z komórek HeLa, przesunięcia chemiczne sygnałów iminowych są zbliżone do tych obserwowanych w widmach rejestrowanych w obecności kationów potasu (Rys. 87 C). Widoczny jest również sygnał od protonu iminowego U₄ przy 9.8 ppm, co sugeruje, że środkowa U-tetrada zawiązuje się również w tych warunkach. Niestety widmo otrzymane dla cząsteczki p(UGG)₄U w ekstrakcie komórkowym, podobnie jak widma rejestrowane w roztworach różnych buforów, charakteryzuje

się szerokimi, nierozdzielonymi sygnałami rezonansowymi, które nie pozwalają na wyciągnięcie wniosków na temat topologii powstającego kwadrupleksu (Rys. 87 D).

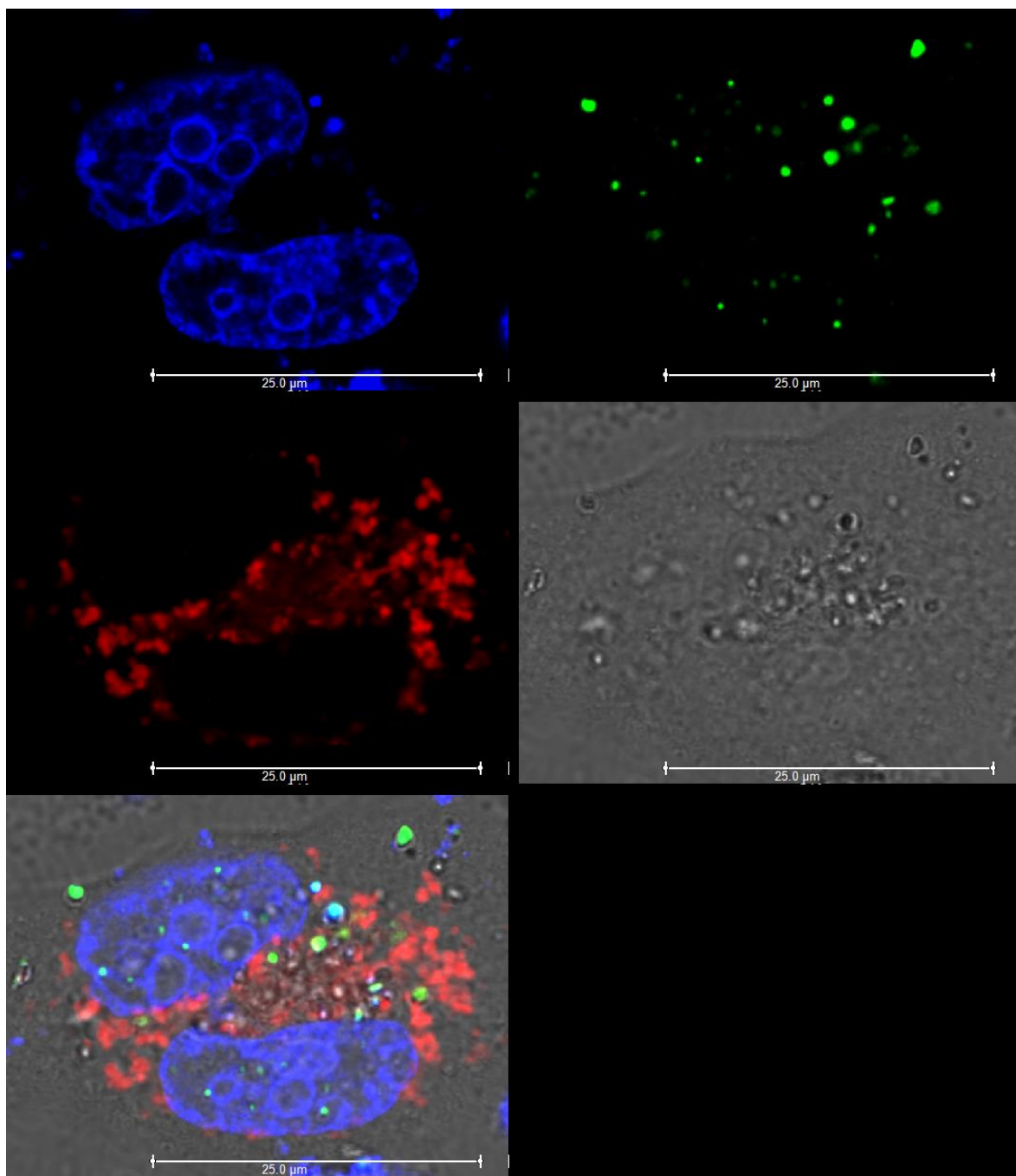


Rys. 87. Widma ^1H NMR zarejestrowane dla (A) $(\text{AGG})_2\text{A}$, (B) $(\text{AGG})_4\text{A}$, (C) $\text{p}(\text{UGG})_2\text{U}$ i (D) $\text{p}(\text{UGG})_4\text{U}$ w obecności jonów K^+ (a, d), Na^+ (b), NH_4^+ (c) oraz w ekstrakcie z komórek HeLa (e).

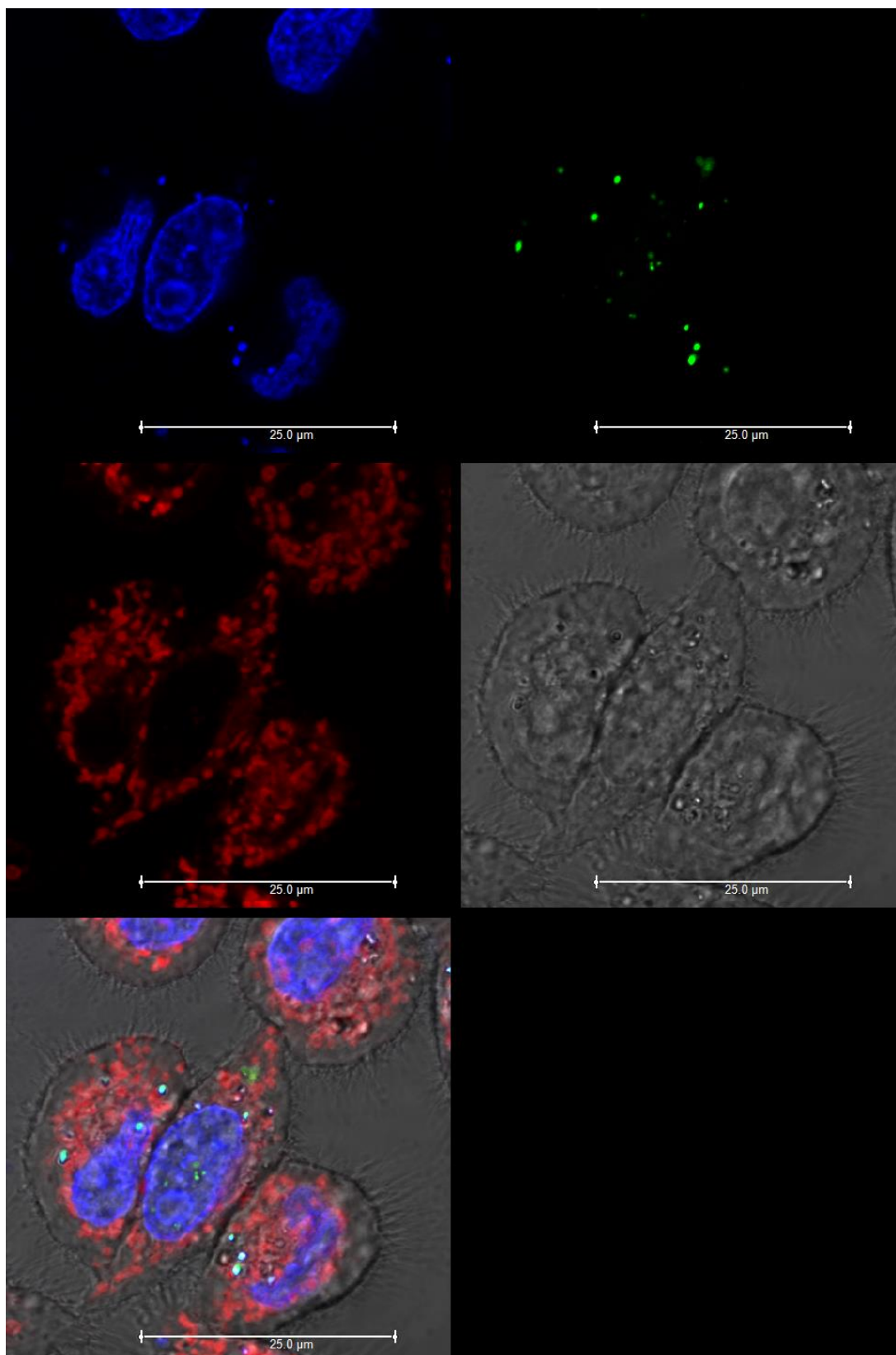
4.5. Badania z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej

Kolejnym etapem moich badań była próba wprowadzenia cząsteczek RNA zbudowanych z powtórzeń AGG i UGG i posiadających zdolność do tworzenia kwadrupleksu w ekstrakcie, do ludzkich komórek. W tym celu, we współpracy z panią profesor Elizą Wyszko oraz panią dr Agnieszką Fedoruk-Wyszomirską z IChB PAN, przeprowadzono transfekcję komórek HeLa cząsteczkami FAM-(AGG)₄A oraz FAM-(UGG)₄U, które do końca 5' miały dołączoną karboksyfluoresceinę (FAM). Rysunki 88 i 89 przedstawiają obrazy komórek HeLa w mikroskopie konfokalnym wykonane 24 godziny po transfekcji. Jak widać na zdjęciach, obie cząsteczki ulokowane były w cytoplazmie oraz w jądrze, wskazując tym samym na bezpośrednie oddziaływania kwadrupleksów z genomowym DNA. Lokalizacja wewnątrzjądrowa została potwierdzona poprzez dodatkowe skanowanie obrazu mikroskopowego w osi Y (Rys. 90). Stosując wybarwienie mitochondriów, wykazano ponadto, że badane cząsteczki nie przenikały do ich wnętrza.

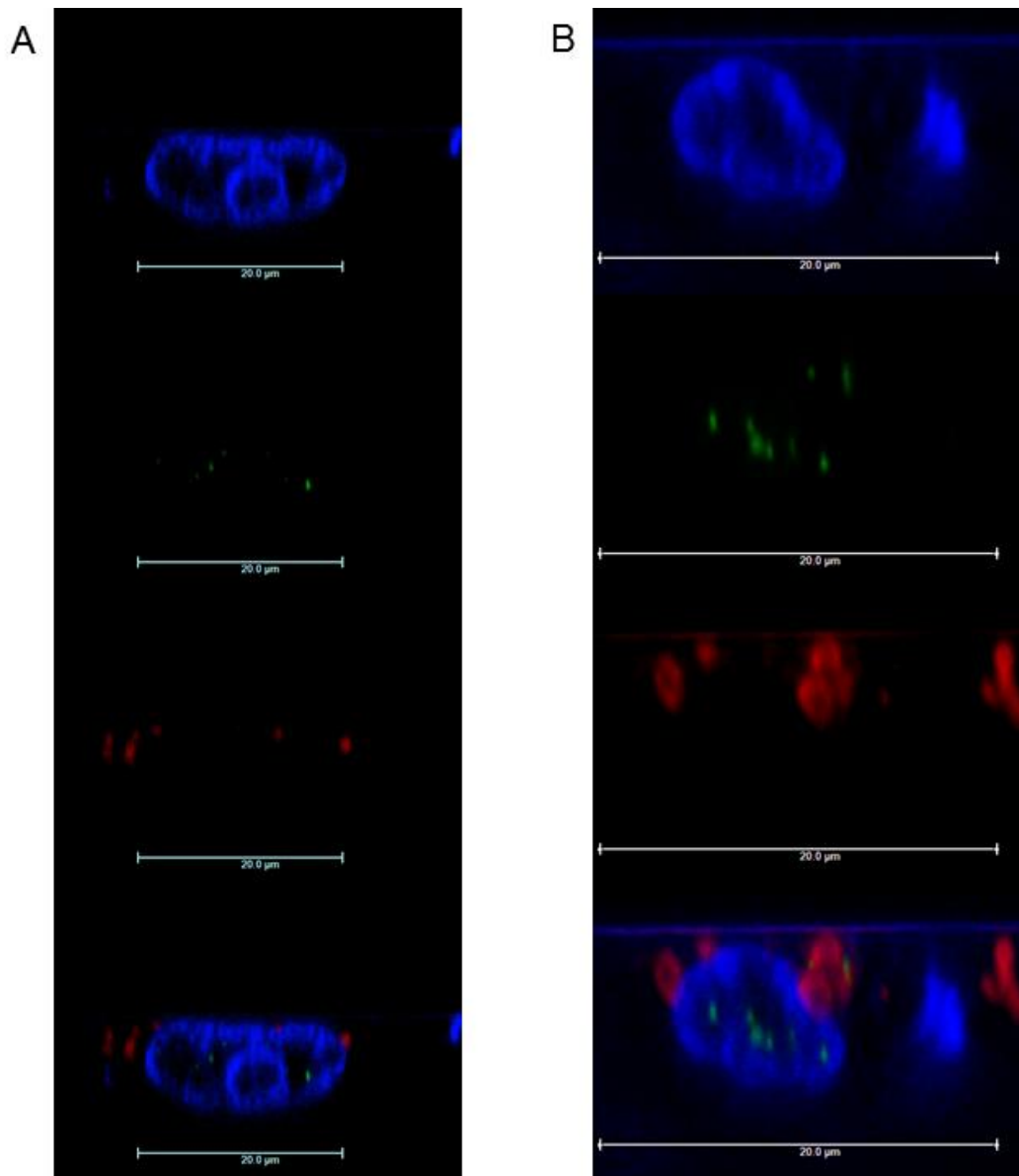
Przeprowadzone przeze mnie badania transfekcji oraz lokalizacji subkomórkowej cząsteczek zbudowanych z powtórzeń AGG i UGG rozpoczynają nowy, niezwykle interesujący rozdział, który najprawdopodobniej w przyszłości pomoże wyjaśnić funkcję, jaką pełnią te cząsteczki w komórce. Dalsze, niezbędne do osiągnięcia tego celu badania wykraczają jednak poza ramy niniejszej rozprawy doktorskiej.



Rys. 88. Zdjęcia wykonane przy pomocy mikroskopu konfokalnego dla FAM-(AGG)₄A. Na zdjęciach, oprócz wykazujących zieloną fluorescencję cząsteczek RNA widać lokalizację jąder komórkowych (kolor niebieski), mitochondria (kolor czerwony) oraz obraz komórek w świetle przechodzącym (kolor szary).



Rys. 89. Zdjęcia wykonane przy pomocy mikroskopu konfokalnego dla FAM-(UGG)₄U. Na zdjęciach, oprócz wykazujących zieloną fluorescencję cząsteczek RNA widać lokalizację jąder komórkowych (kolor niebieski), mitochondria (kolor czerwony) oraz obraz komórek w świetle przechodzącym (kolor szary).



Rys. 90 Zdjęcia wykonane przy pomocy mikroskopu konfokalnego powstały w wyniku skanowania w osi Y dla (A) FAM-(AGG)₄A oraz (B) FAM-(UGG)₄U. Na zdjęciach, oprócz wykazujących zieloną fluorescencję cząsteczek RNA widać lokalizację jąder komórkowych (kolor niebieski) oraz mitochondria (kolor czerwony).

DYSKUSJA WYNIKÓW

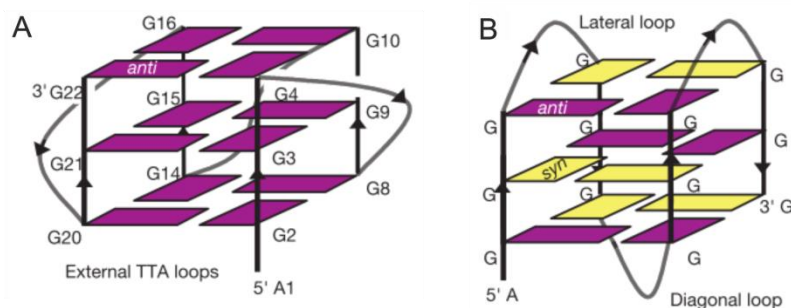
5. DYSKUSJA WYNIKÓW

Pomimo nieustannie rosnącego zainteresowania kwadrupleksami RNA, wciąż niewiele tych struktur jest zdeponowanych w bazie danych RCSB PDB. Podejmując się badań opisanych w rozprawie wierzyłam, że będę mogła powiększyć rodzinę tych struktur, deponując współrzędne atomowe kwadrupleksów zbudowanych z różnej długości powtórzeń AGG i UGG. Jednakże już na początku badań okazało się, że bardzo trudno jest uzyskać dobrej jakości widma NMR, w których sygnały są ostre i dobrze rozdzielone, co jest warunkiem koniecznym dla przeprowadzenia analizy strukturalnej za pomocą wielowymiarowych widm korelacyjnych. Dzieje się tak, ponieważ wiele czynników wpływa na proces tworzenia struktury kwadrupleksów i nawet niewielkie zmiany sekwencji, czy zastosowanie różnych kationów wywiera duży wpływ na ich ostateczną topologię. Na dodatek kwadrupleksy wykazują silną tendencję do tworzenia agregatów, co również jest bardzo niekorzystne dla badań strukturalnych. Dlatego też swoje badania rozpocząłam od przeanalizowania widm NMR różnych cząsteczek zawierających trinukleotydowe powtórzenia AGG i UGG. Ponieważ dotychczas nie są znane żadne reguły, które umożliwiłyby zaprojektowanie kwadrupleksu o odpowiedniej topologii, cząsteczki zbudowane z dwóch i czterech powtórzeń AGG i UGG modyfikowałam na końcach 5' i 3'. Zaobserwowałam, że widma poszczególnych cząsteczek różniły się w zależności od stosowanego kationu (K^+ , Na^+ lub NH_4^+). Chciałam również sprawdzić, czy wnioski uzyskane przy pomocy niskorozdzielczych metod, takich jak UV-Vis i CD są spójne z wnioskami otrzymanymi na podstawie analizy widm NMR i ESI-MS otrzymanymi w różnych warunkach. Interesowało mnie także, jaka struktura tworzy się w warunkach komórkowych, oraz czy kwadrupleksy zbudowane z powtórzeń AGG i UGG mogą przenikać do wnętrza komórki, a jeśli tak, to jaka jest ich lokalizacja wewnątrzkomórkowa.

Wpływ jonów K^+ , Na^+ i NH_4^+ na strukturę kwadrupleksu

Otrzymane przeze mnie wyniki pokazują, że bez względu na typ zastosowanego jonu, cząsteczki zbudowane z powtórzeń AGG i UGG tworzą strukturę kwadrupleksu. Jak wynika z porównania widm 1H NMR oraz profili widm CD, kwadrupleksy powstające w obecności kationów potasu i amonu są takie same, gdy cząsteczki zbudowane są z dwóch powtórzeń AGG lub UGG, natomiast

w obecności kationów sodu powstaje najprawdopodobniej inna forma. Jak wiadomo, promienie jonowe kationów potasu i amonu są zbliżone i wynoszą odpowiednio 1.33 Å i 1.43 Å. Są one ulokowane pomiędzy dwiema G-tetradami, dzięki czemu ich obecność indukuje powstawanie identycznych struktur (36). Z kolei kation sodu ma znacznie mniejszy promień jonowy (0.95 Å), przez co może znajdować się zarówno pomiędzy sąsiadującymi G-tetradami, jak i w płaszczyźnie G-tetrazy, co może prowadzić do tworzenia różnych struktur (36). Obecność różnych struktur kwadrupleksu w zależności od typu kationu, K^+ lub Na^+ , jest już zjawiskiem znanym. Przykładem może być cząsteczka zawierająca powtórzenia ludzkiej sekwencji telomerowej, $d(AGGG(TTAGGG))_3$. Struktura, jaką tworzy ta cząsteczka w obecności kationów potasu w kryształach, to równoległy kwadrupleks zawierający trzy pętle zewnętrzne (ang. *external loop*) utworzone przez reszty TTA i łączące trzy kolejne G-tetrazy. W strukturze tej wszystkie reszty guanozyny znajdują się w konformacji *anti* (183). Natomiast struktura tej samej cząsteczki ustalona metodami NMR, ale w obecności jonów Na^+ , to antyrównoległy kwadrupleks zawierający dwie pętle boczne (ang. *lateral loop*) oraz jedną pętlę przekątną (ang. *diagonal loop*), również tworzone przez reszty TTA. Każda z tych G-tetrad zawiera dwie reszty guanozyny w konformacji *syn* i dwie reszty w konformacji *anti*. Modele struktur obu kwadrupleksów zostały przedstawione na rysunku 91.



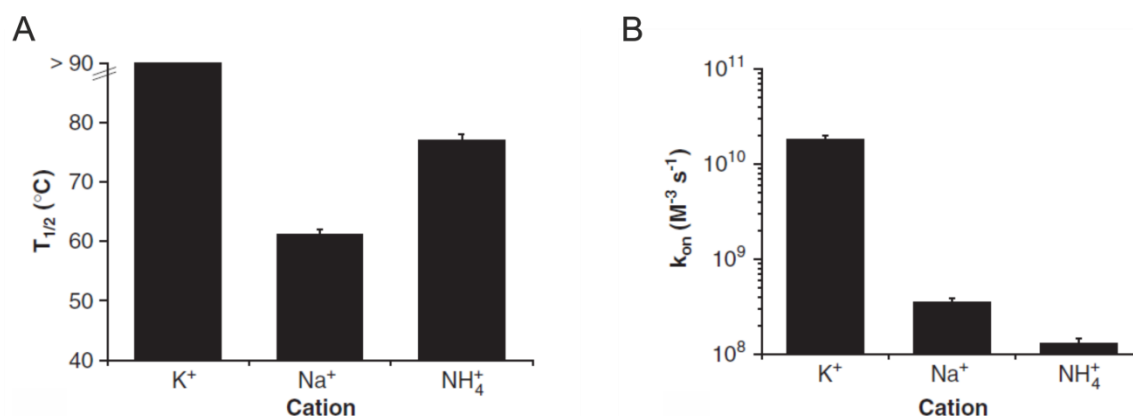
Rys. 91. Modele struktur kwadrupleksów utworzonych przez cząsteczkę $d(AGGG(TTAGGG))_3$ w obecności jonów (A) K^+ i (B) Na^+ (reprodukcja za zgodą © Nature Publishing Group) (183).

Równocześnie z badaniami prowadzonymi dla cząsteczek zawierających powtórzenia AGG i UGG, w Pracowni Biomolekularnego NMR, były prowadzone badania dla cząsteczek zbudowanych z powtórzeń CGG. Zagadnienia te są realizowane przez dr Dorotę Gudanis. Uzyskane przez nią wyniki dla cząsteczek zbudowanych z dwóch i czterech powtórzeń CGG zostały opisane w publikacji stanowiącej załącznik nr 1 do niniejszej dysertacji (20). Jak się okazało, obie

cząsteczki $G(CGG)_2C$ i $G(CGG)_4C$ są zdolne do tworzenia kwadrupleksu, jednak jego powstawanie jest silnie zależne od typu zastosowanego kationu. W roztworze zawierającym 0.01 mM RNA i 50 mM KCl cząsteczka $G(CGG)_2C$ tworzy wyłącznie strukturę kwadrupleksu (Rys. 5 Aa, załącznik nr 1). Natomiast w obecności kationów sodu kwadrupleks jest w równowadze z dupleksem. Gdy stężenie RNA rośnie, to w roztworze narasta forma kwadrupleksu (Rys. 5 Ab,d, załącznik nr 1). Natomiast w widmie 1H NMR zarejestrowanym dla 0.01 mM $G(CGG)_2C$, w buforze zawierającym kationy amonu, zaobserwowano jedynie sygnały odpowiadające formie dupleksu (Rys. 5 Ac, załącznik nr 1) (20). Wyniki uzyskane dla cząsteczki zbudowanej z czterech powtórzeń CGG ($G(CGG)_4C$) pokazują, że przeważającą formą, niezależnie od zastosowanego jonu jest struktura spinki (20). Niemniej jednak, w obecności kationów potasu struktura spinki istnieje w równowadze ze strukturą kwadrupleksu. Współistnienie w tych warunkach roztworu dwóch form można zauważyć analizując na przykład przebieg krzywej topnienia. Przy długości fali 295 nm posiada ona początkowo (w zakresie temperatur 5 – 50 °C) sigmoidalny kształt charakterystyczny dla dupleksu lub spinki, a następnie wartość absorbancji maleje, ujawniając charakterystyczny dla struktury kwadrupleksu odwrócony profil (Rys. S1D, załącznik nr 1). Również w widmie 1H NMR można zaobserwować sygnały w rejonie charakterystycznym dla G-tetrad (~ 11 ppm) oraz sygnały pochodzące od par zasad G:C typu Watsona-Cricka (~ 13 ppm), które zanikają stosunkowo szybko wraz ze wzrostem temperatury (Rys. 5 a,d, S8, załącznik nr 1).

Analiza uzyskanych krzywych topnienia pozwoliła na dokonanie korelacji pomiędzy stabilnością kwadrupleksu a zastosowanym jonem (Rys. 46 oraz Rys. S1 i S6, załącznik nr 1). Niezależnie od typu powtórzenia, AGG, UGG, czy CGG, najbardziej stabilne struktury powstają w obecności kationów potasu. W przypadku pozostałych jonów, Na^+ i NH_4^+ okazało się, że struktury formowane przez cząsteczki zawierające powtórzenia AGG lub UGG są najmniej trwałe w obecności kationów sodu, z kolei cząsteczki zbudowane z powtórzeń CGG tworzą najmniej trwałe struktury w obecności kationów amonu. Ten wynik nie jest zaskakujący, ponieważ, jak wspomniałam powyżej, w roztworze zawierającym jony NH_4^+ , cząsteczki zawierające powtórzenia CGG tworzą dupleks lub spinę, a więc formy termodynamicznie mniej trwałe od struktury kwadrupleksu. Podobne wyniki uzyskali J. L. Mergny, i inni, badając czteroniciowy kwadrupleks DNA

utworzony przez cząsteczkę o sekwencji d(TGGGGT) (184). Trwałość tego kwadrupleksu maleje zgodnie z szeregiem $(K^+) > (NH_4^+) > (Na^+)$ (Rys. 92 A) Autorzy sprawdzali również zależność szybkości asocjacji kwadrupleksu od stosowanego jonu i wykazali, że obecność kationów potasu przyspiesza proces tworzenia kwadrupleksu, natomiast struktura ta powstaje najwolniej w obecności kationów amonowych (Rys. 92 B).



Rys. 92. Wpływ rodzaju kationu na (A) stabilność termiczną i (B) szybkość asocjacji czteroniciowego kwadrupleksu DNA o sekwencji d(TGGGGT) (184). W obecności kationów potasu kwadrupleks powstaje najszybciej i jest on najbardziej trwały. Pomimo, iż struktura kwadrupleksu tworzy się wolniej w obecności jonów amonu w stosunku do jonów sodu, to kwadrupleks powstały w roztworze zawierającym jony NH₄⁺ wykazuje znacznie wyższą stabilność termiczną niż kwadrupleks w roztworze bogatym w jony Na⁺.

Porównanie wyników uzyskanych różnymi metodami – UV-Vis, CD, NMR oraz ESI-IMS-MS

Przeprowadzenie kompleksowych badań sześciu sekwencji RNA za pomocą spektroskopii UV-Vis, CD, NMR oraz spektrometrii mas, ESI-IMS-MS, pozwoliło uzyskać informacje o preferowanych strukturach tych molekuł w różnych warunkach. Jednoczesna analiza widm CD i NMR umożliwiła identyfikację takich motywów strukturalnych, jak heksada A:(G:G:G:G):A, czy U-tetrada. W niektórych przypadkach pobieżna analiza wyników uzyskanych z różnych metod dawała z pozoru niespójne informacje. Tak na przykład, w przypadku cząsteczki 2'-O-Me (AGG)₂A brak ostrych sygnałów iminowych charakterystycznych dla G-tetrady, w widmach otrzymanych w obecności kationów sodu i amonu (Rys. 41 b, c) sugerował, że w tych warunkach roztworu kwadrupleks się nie tworzy. Z drugiej strony obecność w tym rejonie bardzo szerokiego sygnału,

choć o niewielkiej amplitudzie, wskazywała, że najprawdopodobniej kwadrupeks 2'-O-Me (AGG)₂A łatwo ulega agregacji, dając widmo trudno poddające się analizie za pomocą spektroskopii NMR. Analiza innych regionów widm NMR zarejestrowanych w obecności jonów Na⁺ i NH₄⁺ pokazała, że w tych warunkach cząsteczka 2'-O-Me (AGG)₂A występuje głównie w postaci nieustrukturyzowanej. Z kolei krzywe topnienia zarejestrowane przy długości fali 295 nm wskazywały, że cząsteczka ta tworzy stabilny kwadrupeks, bez względu na typ jonu obecnego w roztworze (Rys. 46 C). Ponadto stosunkowo wysoka temperatura topnienia kwadrupeksu 2'-O-Me (AGG)₂A w obecności jonów NH₄⁺ (~ 70 °C) oznaczała, że powstająca struktura jest stabilna (Rys. 46 C, kolor czerwony). Z kolei w widmie CD zarejestrowanym dla tej samej próbki 2'-O-Me (AGG)₂A (zawierającej jony NH₄⁺, Rys. 47 B, kolor czerwony) obserwowalam najniższą intensywność pasma przy 260 nm, co wskazywało na występowanie słabych oddziaływań warstwowych pomiędzy G-tetradami (142). Zjawisko to można wyjaśnić następująco: obecność odwróconego profilu topnienia w widmie UV-Vis odzwierciedla proces rozplątania się kwadrupeksu 2'-O-Me (AGG)₂A, łatwo tworzącego agregaty. Obecna w roztworze nieuporządkowana struktura jednoniciowa nie wpływa na zmianę absorbancji przy 295 nm. Z kolei jej obecność przejawia się w widmie CD w postaci obniżonej amplitudy pasma przy 260 nm, co jest następstwem uśrednienia efektu Cottona i wynika z współistnienia w roztworze zarówno kwadrupeksu, jak i pojedynczej nici. Dla kontrastu, widmo ¹H NMR zarejestrowane dla cząsteczki G(CG)₂C w obecności kationów sodu ukazało współistnienie w roztworze formy dupleksu i kwadrupeksu (Rys. 5 b,d, załącznik nr 1), natomiast zarejestrowana dla tej samej próbki krzywa topnienia przy 295 nm nie posiadała charakterystycznego dla struktury kwadrupeksu odwróconego profilu (Rys. S1c, załącznik nr 1), a w widmie TDS nie wystąpiło ujemne pasmo przy tej samej długości fali, co mogłoby sugerować, że w roztworze tym kwadrupeks nie występuje (Rys. S2c, załącznik nr 1) (20). Wytlumaczenie tych wyników jest proste, jeśli pamięta się, że zmiany absorbancji w zależności od temperatury przy 295 nm dla dupleksu, czy spinki są niewielkie. Uzyskane przeze mnie wyniki zwracają uwagę na konieczność zachowania ostrożności przy formowaniu wniosków odnośnie przyjmowanej przez daną cząsteczkę struktury jedynie na podstawie wyników uzyskanych przy zastosowaniu niskorozdzielczych technik badawczych.

Jak już wspomniałam, z analizy widm ^1H NMR wynikało, że cząsteczki $(\text{AGG})_2\text{A}$ i $\text{p}(\text{UGG})_2\text{U}$ w obecności kationów amonu przyjmują takie same struktury, jak w obecności kationów potasu. Uznałam więc, że informacje uzyskane z widm ESI-IMS-MS, na temat liczby cząsteczek zaangażowanych w tworzenie struktury kwadrupleksu oraz liczby jonów NH_4^+ , stabilizujących tę strukturę, można wykorzystywać do ustalania topologii kwadrupleksu metodami NMR, w przypadku roztworów zawierających jony K^+ . Niemniej jednak, w tym przypadku również należy zachować ostrożność, ponieważ, jak pokazują badania przeprowadzone za pomocą ESI-IMS-MS dla kwadrupleksów, których struktury zostały wcześniej ustalone przy pomocy metod NMR w obecności znakowanych izotopowo jonów $^{15}\text{NH}_4^+$, jednoznaczne określenie liczby jonów stabilizujących kwadrupleks przy pomocy ESI-MS może być trudne (182). Uzyskane wyniki pokazały, że kationy amonu stabilizujące kwadrupleks są labilne w fazie gazowej i w przypadku kwadrupleksów antyrównoległych mogą stosunkowo łatwo opuścić miejsce koordynacji pomiędzy dwiema G-tetradami, co w efekcie prowadzi do zaniżenia liczby kationów zaangażowanych w stabilizację struktury kwadrupleksu. Co więcej, zdarza się, że niektóre struktury posiadają dodatkowe miejsca wiązania jonów, np. w miejscach pętli przekątnych, a to z kolei może prowadzić do zawyżenia liczby kationów stabilizujących kwadrupleks.

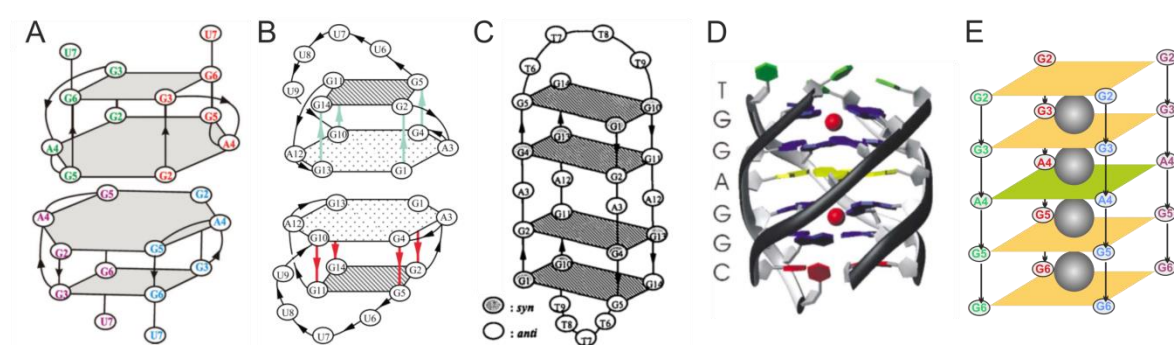
Uzyskane przeze mnie wyniki pokazują, że do badania kwadrupleksów najlepiej stosować kilka metod, dostarczających uzupełniających się informacji o różnych aspektach powstającej struktury. Ważne jest również, aby pomiary wykonywane były w możliwie jak najbardziej zbliżonych warunkach roztworu, gdyż zmiana warunków środowiska może mieć duży wpływ na tworzące się struktury. Uważam, że zastosowane przeze mnie techniki eksperymentalne stanowią optymalny zestaw, pozwalający w pełni scharakteryzować powstającą strukturę kwadrupleksu. Spektroskopia UV-Vis i CD oraz spektrometria mas są bardzo czułymi metodami, które pozwalają stosunkowo szybko potwierdzić występowanie kwadrupleksu w roztworze, ustalić typ powstającej struktury (równoległa lub antyrównoległa), oraz określić jej stechiometrię. Natomiast dzięki zastosowaniu spektroskopii NMR możliwe jest zidentyfikowanie poszczególnych reszt guanozyny zaangażowanych w tworzenie G-tetrady, reszt nukleotydowych wchodzących w skład pętli oraz charakterystycznych dla danej sekwencji motywów strukturalnych.

Ustalenie pofałdowania kwadrupleksów AGGAGGA i pUGGUGGU

AGGAGGA

Analiza danych eksperymentalnych otrzymanych z widm UV-Vis, TDS, CD i ESI-IMS-MS pozwoliła stwierdzić, że cząsteczka (AGG)₂A przyjmuje strukturę czteroniciowego równoległego kwadrupleksu. Za pomocą widm masowych wykazałam, że w fazie gazowej kwadrupleks ten może przyjmować dwie różne formy, stabilizowane przez trzy lub cztery jony. Przeprowadzona przeze mnie szczegółowa analiza strukturalna metodami spektroskopii NMR doprowadziła do ustalenia pofałdowania formy stabilizowanej przez trzy kationy potasu. Struktura ta to dimer dwuniciowych kwadrupleksów zbudowanych z G-tetrazy i heksady A:(G:G:G:G:)A, stabilizowany przez oddziaływanie warstwowe pomiędzy dwiema heksadami. Jak pokazałam na rysunku 73., w strukturze tej dwa jony zaangażowane są w tworzenie poszczególnych podjednostek, natomiast trzeci kation jest elementem wspomagającym oddziaływanie warstwowe, koordynując atomy tlenu obu heksad. Zaproponowany przeze mnie model jest bardzo podobny do innych zdeponowanych w bazie danych RCSB PDB struktur utworzonych przez cząsteczki zawierające powtórzenia GGA, schematycznie przedstawionych na rysunku 20. Co ciekawe, J.M. Lipay, i inni, zasugerowali, że to nie powtórzenia GGA, a motyw sekwencji GGAGG może być kluczowy dla powstawania tego typu struktur (181). Jak pokazali, cząsteczka, która w odróżnieniu od badanej przeze mnie cząsteczki zawierała na końcach 5' i 3' reszty urydyny zamiast reszt adenozyne, r(UGGAGGU), przyjmuje analogiczną formę jak badana przeze mnie cząsteczka r(AGGAGGA) (Rys. 93 A). Analiza dostępnych struktur ukazała również, że może to być prawdziwe tylko dla cząsteczek RNA. Obrazuje to m. in. przykład cząsteczek DNA i RNA, których sekwencje zawierają dwa motywy GGAGG, rozdzielone łącznikiem zbudowanym odpowiednio z czterech reszt tymidyny lub urydyny (185). Cząsteczka RNA o sekwencji r(GGAGGUUUUGGAGG) w roztworze zawierającym kationy potasu tworzy dimer jednoniciowych kwadrupleksów zbudowanych z G-tetrazy i heksady A:(G:G:G:G:)A, stabilizowany oddziaływaniem heksada – heksada (Rys. 93 B). Natomiast cząsteczka DNA o analogicznej sekwencji d(GGAGGTTTTGGAGG), również w obecności kationów potasu, przyjmuje zupełnie inną strukturę. Jest to

dwuniciowy kwadrupleks zawierający cztery G-tetrazy przedzielone środkową A-tetradą (Rys. 93 C). Również cząsteczki DNA o sekwencjach d(TAGGAGGT) oraz d(TGGAGGC), zawierające pojedynczy motyw GGAGG, nie tworzą w roztworze motywu heksady A:(G:G:G:G:)A (186). Powstające struktury to czteroniciowe równoległe kwadrupleksy z wewnętrzną A-tetradą, co jest schematycznie przedstawione na rysunku 93 D. Możliwe, że druga, obecna w fazie gazowej w czasie pomiarów ESI-IMS-MS, forma kwadrupleksu (AGG)₂A, która jest stabilizowana przez cztery kationy amonowe, jest analogiczna do opisanej powyżej struktury formowanej przez cząsteczki DNA (Rys. 93 D). Przeprowadzone dla cząsteczki d(TAGGAGGT) badania z wykorzystaniem metod dynamiki molekularnej wykazały, że kation potasu może znajdować się pomiędzy G-tetradą a A-tetradą (186), co potwierdzałoby możliwość utworzenia heliakalnego, czteroniciowego kwadrupleksu przez cząsteczkę (AGG)₂A, co jest schematycznie przedstawione na rysunku 93 E.



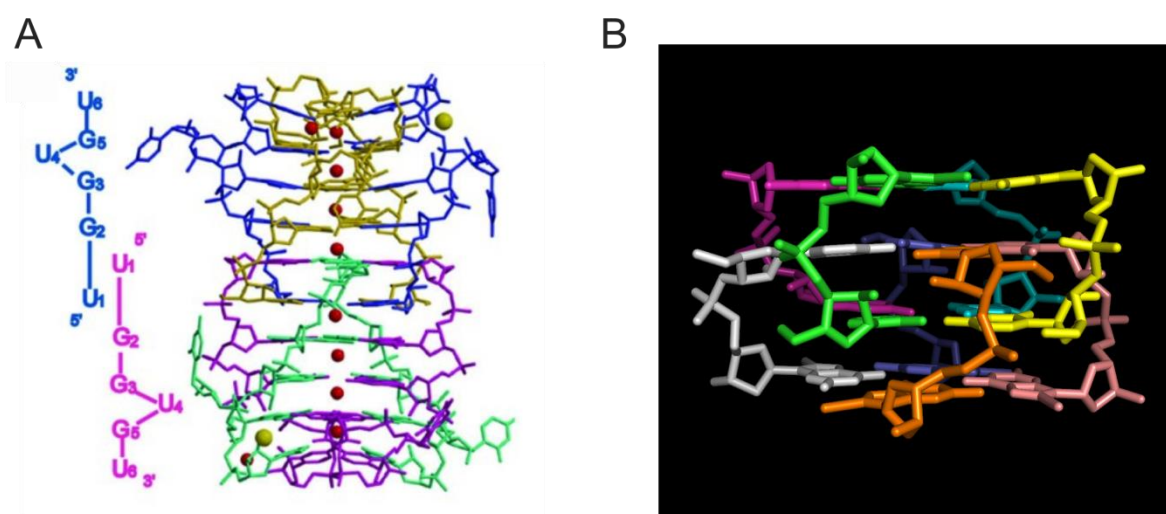
Rys. 93. Modele struktur kwadrupleksów DNA i RNA zawierających sekwencyjny motyw GGAGG. (A) r(UGGAGGU) (reprodukcja za zgodą © Royal Society of Chemistry) (181); (B) r(GGAGGUUUUGGAGG) (reprodukcja za zgodą © Elsevier) (41); (C) d(GGAGGTTTTGGAGG) (185); (D) d(TGGAGGC) (reprodukcja za zgodą © Royal Society of Chemistry) (186). (E) Schemat potencjalnej formy kwadrupleksu (AGG)₂A, stabilizowanej przez cztery jony NH₄⁺.

pUGGUGGU

Analiza wyników uzyskanych za pomocą technik UV-Vis, CD i ESI-IMS-MS wskazywała, że w roztworze zawierającym kationy potasu lub amonu cząsteczka zbudowana z dwóch powtórzeń UGG tworzy czteroniciowy, równoległy kwadrupleks stabilizowany przez cztery, pięć lub sześć kationów (Rys. 59). Przeprowadzone przeze mnie badania za pomocą metod spektroskopii NMR początkowo sugerowały, że kwadrupleks ten jest zbudowany z czterech G-tetrad i trzech U-tetrad. Model takiej struktury został schematycznie przedstawiony

na rysunku 84. Badania NMR przeprowadzone dla kwadrupleksów DNA o sekwencjach TG₄T, TG₄U oraz UG₄T wykazały, że jon NH₄⁺ może stabilizować oddziaływania warstwowe pomiędzy G-tetradą a U-tetradą (54). Jeśli struktura tworzona przez cząsteczkę p(UGG)₂U zawierałaby siedem tetrad (jak to jest przedstawione na rysunku 84.), to powinna być stabilizowana przez sześć kationów ulokowanych pomiędzy kolejnymi tetradami. Forma taka była obserwowana w widmach ESI-MS, ale tylko wówczas, gdy stosowałam najłagodniejsze warunki jonizacji (Rys. 59). Rejestrując widma ¹H NMR w funkcji temperatury ustaliłam, że U-tetrada powstająca na końcu 5' jest bardzo mało stabilna, ponieważ sygnał pochodzący od sygnału iminowego reszty U1 zanikał już w temperaturze 25 °C (Rys. 85). Wynik ten tłumaczy, dlaczego forma stabilizowana przez sześć kationów amonu szybko zanika w warunkach pomiaru ESI-MS. Niestabilna tetrada na końcu 5' powoduje otwieranie się U-tetrazy i uwalnianie jonu NH₄⁺. Analiza widm ¹H NMR zarejestrowanych w obecności jonów K⁺, w wysokiej temperaturze wykazała z kolei niezwykle stabilność U-tetrazy na końcu 3'. Sygnał pochodzący od iminowego atomu wodoru reszty U7 nie zanikał nawet w temperaturze 80 °C (Rys. 85). Szczególnie trudna do wyjaśnienia była obecność sygnałów korelacyjnych pomiędzy atomami wodoru U7OH2' a G5H8, G6H8 i U7H6 (Rys. 86). Jak już wspomniałam, jeśli struktura cząsteczki p(UGG)₂U byłaby taka, jak przedstawiona na rysunku 84., to odległość pomiędzy tymi atomami wodoru musiałaby być znacznie większa niż 5 Å i wówczas nie obserwowałabym tych sygnałów w widmie NOESY. Aby to wyjaśnić przeanalizowałam wszystkie znajdujące się w bazie danych RCSB PDB struktury kwadrupleksów zawierających reszty urydyny na końcach 5' i 3'. Okazało się, że takie kwadrupleksy prawie zawsze ulegają dimeryzacji, która może przebiegać na kilka różnych sposobów, ale wszystkie zachodzą przez oddziaływanie końców 5' (45–47, 49). Dla każdej z tych struktur pomierzyłam odległości pomiędzy atomami wodoru OH2' terminalnej reszty U1 a atomami H8 reszt G2, czyli w miejscu ich dimeryzacji. Okazało się, że tylko w jednej ze struktur odległości pomiędzy tymi atomami wodoru mieszczą się w przedziale 4.1 – 5 Å, wystarczającym do zaobserwowania efektu NOE. Strukturę tą tworzy cząsteczka RNA o sekwencji r(UGGUGU) i numerze PDB ID: 2AWE. Jest to czteroniciowy równoległy kwadrupleks, który dimeryzuje poprzez wzajemną interkalację U-tetrad utworzonych na końcach 5' obu podjednostek (Rys. 94 A) (45). Miejsce dimeryzacji kwadrupleksu

r(UGGUGU) przedstawiłam na rysunku 94 B., zaznaczając różnymi kolorami poszczególne łańcuchy. Kwadrupleks, który tworzy badana przeze mnie cząsteczka p(UGG)₂U wykazuje taki sam mechanizm dimeryzacji, ale zachodzący na końcach 3'. Pierścienie cukrowe reszt U7 znajdują się wówczas jeszcze bliżej atomów H8 reszt G6, co tłumaczyłoby obecność niezwykle intensywnego sygnału NOE pomiędzy U7OH2' a G6H8, jak również zaobserwowaną korelację pomiędzy atomami wodoru U7OH2' a G5H8. Model takiej struktury przedstawiłam na rysunku 95.

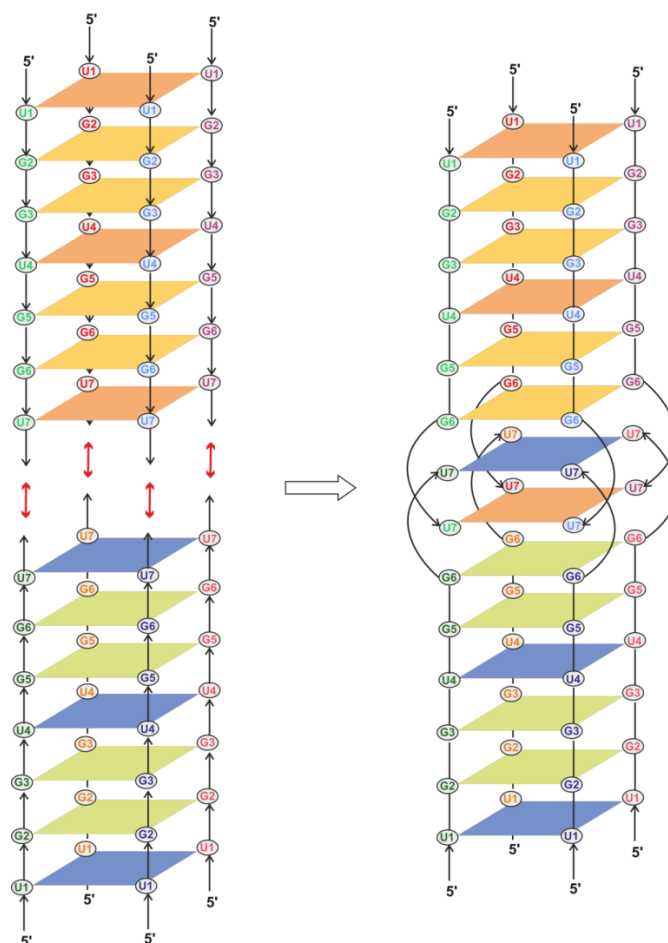


Rys. 94. (A) Model struktury kwadrupleksu r(UGGUGU) (reprodukcja za zgodą © The National Academy of Sciences of the United States of America) (45) (B) Miejsce dimeryzacji końców 5' kwadrupleksu r(UGGUGU) przedstawione na podstawie struktury zdeponowanej w bazie danych PDB o numerze 2AWE. Fragment przedstawia reszty U1 i G2. Nici zaznaczone kolorami zielonym, żółtym, różowym i niebieskim pochodzą od jednej podjednostki, natomiast nici biała, pomarańczowa, lososowa i fioletowa pochodzą od drugiej podjednostki kwadrupleksu.

Ponieważ w widmach ESI-IMS-MS nie obserwowałam piku, który odpowiadałby strukturze zbudowanej z ośmiu nici, co jednoznacznie potwierdziłoby istnienie dimeru kwadrupleksów, sprawdziłam, czy obecność kationów amonu może zapobiegać ząbieniu się końców 3'. W tym celu zarejestrowałam widmo NMR w 10 mM buforze Tris-HCl z dodatkiem 150 mM NH₄Cl. Okazało się, że w tych warunkach sygnał protonu U7OH2' jest niewidoczny, co częściowo potwierdzało moją hipotezę. Kolejnego dowodu na to, że jony amonu nie sprzyjają powstawaniu dimeru kwadrupleksów otrzymałam porównując współczynniki dyfuzji translacyjnej. Okazało się, że kwadrupleks powstający w obecności kationów amonu dyfunduje szybciej niż kwadrupleks

powstający w obecności kationów potasu. Uzyskane przeze mnie wyniki mogą wskazywać na zależność dimeryzacji od typu kationu, jednak konieczne jest przeprowadzenie dalszych badań. W najbliższym czasie planuję wykonanie dla tej próbki pomiarów SAXS. Oczekuję, że za pomocą tej metody poznam kształt struktury, dzięki czemu uzyskam jednoznaczny dowód na obecność w roztworze zawierającym kationy potasu dimeru kwadrupleksów.

Przeprowadzona analiza dostępnych struktur wykazała dodatkowo, że unikatowa może być nie tylko obserwowana przeze mnie dimeryzacja końców 3', ale wyjątkowe jest również tworzenie się centralnej U-tetrady w strukturze kwadrupleksu p(UGG)₂U. W bazie danych RCSB PDB zdeponowane są współrzędne dwóch kwadrupleksów RNA, posiadających resztę urydyny pomiędzy resztami guanozyny (UGGUGU oraz U(dBrG)UGGU) (45, 48). Jednak w obu tych strukturach, otrzymanych za pomocą rentgenowskiej analizy strukturalnej są one wybrzuszone (Rys. 94 A), co może być spowodowane siłami upakowania w kryształach.



Rys.95. Model struktury dimeru kwadrupleksów p(UGG)₂U, powstałego przez zazębianie końców 3'.

Środowisko wewnątrzkomórkowe

Przeprowadzone eksperymenty NMR w ekstrakcie z komórek HeLa pokazały, że badane przeze mnie cząsteczki są trwałe w środowisku komórkowym. Jest to zaskakująca obserwacja, ponieważ szereg badań prowadzonych w ekstraktach komórkowych pokazuje, że niemodyfikowane cząsteczki RNA ulegają natychmiastowej degradacji (187). Widma ^1H NMR zarejestrowane w ekstrakcie komórkowym w większości przypadków były podobne do widm rejestrowanych w obecności jonów K^+ . Wyjątek stanowiły widma otrzymane dla cząsteczki $(\text{AGG})_2\text{A}$. Możliwe jest, że struktura kwadrupleksu powstającego w warunkach komórkowych odpowiada strukturze stabilizowanej przez 4 jony NH_4^+ , widocznej w widmach MS, która, jak sądzę, jest czteroniciowym kwadrupleksem z wewnętrzną A-tetradą. Potwierdzenie tej hipotezy wymaga dalszych badań.

Kolejnym etapem badań było sprawdzenie, czy kwadrupleksy RNA zbudowane z powtórzeń AGG i UGG mogą oddziaływać z komórkowym RNA lub DNA. Eksperyment z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej jednoznacznie udowodnił, że zaprojektowane przeze mnie cząsteczki $\text{FAM}-(\text{AGG})_4\text{A}$ oraz $\text{FAM}-(\text{UGG})_4\text{U}$, mogą przenikać do wnętrza komórki eukariotycznej. Interesujące okazało się także, że niezależnie od typu powtórzeń, AGG lub UGG, wprowadzone do komórki cząsteczki RNA wykazują zarówno lokalizację cytoplazmatyczną, jak i jądrową. W cytoplazmie, wprowadzone cząsteczki mają możliwość bezpośredniego oddziaływania z białkami oraz różnego typu RNA i modulowania różnych procesów wewnątrzkomórkowych jak np., translacja. Interesująca jest również obserwacja obu cząsteczek w jądrze komórkowym, co umożliwia ich potencjalne oddziaływanie z genomowym DNA, jak i RNA powstałym w wyniku transkrypcji, co w efekcie daje możliwość regulacji ekspresji genów na różnym poziomie.

Dostępne w literaturze dane na temat lokalizacji kwadrupleksów DNA wewnątrz komórki już dziś pokazują ciekawą zależność pomiędzy strukturą wprowadzanego do komórki kwadrupleksu a jego rozmieszczeniem, czy nawet efektywnością przyłączania do powierzchni komórki. Dla przykładu, T. Chang, i inni, sprawdzili zdolność wiązania powierzchniowego 12 różnych kwadrupleksów DNA na kilkunastu liniach komórkowych i pokazali w ten sposób, że jedynie równoległe kwadrupleksy efektywnie przyłączają się do powierzchni komórki

(188). Z kolei, T. Tseng, i inni, pokazali, m.in. za pomocą zdjęć wykonanych mikroskopem konfokalnym oraz stosując selektywne barwniki fluorescencyjne, że równoległe kwadrupleksy DNA selektywnie lokalizują się w lizosomach, natomiast antyrównoległe kwadrupleksy DNA obserwowane były w mitochondriach (189). Jak widać na zdjęciach przedstawionych na rysunkach 88, 89 i 90, badane przeze mnie cząsteczki RNA, o strukturze równoległego kwadrupleksu (Rys. 47 C, F), nie były obserwowane w mitochondriach (wybarwionych na czerwono), co jest zgodne z zaobserwowaną przez T. Tseng zależnością.

W kolejnym etapie planowana jest izolacja jąder komórkowych i przygotowanie z nich ekstraktu, w którym prowadzona będzie rejestracja widm ^1H NMR dla obu zaprojektowanych cząsteczek, w celu jednoznacznego potwierdzenia powstającej w tych warunkach struktury. Planuję także wykonanie kilku eksperymentów kontrolnych, m.in. przeprowadzenie transfekcji przy pomocy cząsteczek RNA o sekwencjach, które nie będą zdolne do tworzenia struktury kwadrupleksu. Eksperymenty kontrolne będą miały na celu sprawdzenie, czy obserwowana przeze mnie lokalizacja subkomórkowa jest specyficzna dla badanych przeze mnie kwadrupleksów zbudowanych z powtórzeń AGG i UGG. Jak wiadomo, w strukturach kwadrupleksów pokładane są nadzieje na stworzenie skutecznej terapii antynowotworowej. Co więcej, badane przeze mnie cząsteczki należą do rodziny sekwencji TNRs, o których wiadomo, że ich ekspansja, zarówno na poziomie DNA, jak i RNA wywołuje choroby neurodegeneracyjne. Dotychczas nie zidentyfikowano choroby powiązanej z ekspansją badanych przeze mnie powtórzeń, które jako jedyne konserwatywnie tworzą strukturę kwadrupleksu, niezależnie od stosowanych warunków roztworu. Wierzę, że łącząc naszą wiedzę na temat struktur kwadrupleksów, możliwość wykonywania pomiarów NMR dla cząsteczek kwasów nukleinowych o stężeniu mikromolowym oraz obrazowanie ich lokalizacji wewnątrzkomórkowej, pewnego dnia doprowadzimy do poznania biologicznej funkcji kwadrupleksów zbudowanych z powtórzeń AGG i UGG.

PODSUMOWANIE

6. PODSUMOWANIE

Warunki pomiaru widm NMR

Pojedyncza forma kwadrupleksu, niezbędna do przeprowadzenia badań strukturalnych metodami NMR, w roztworze tworzy się niezwykle rzadko. Aby znaleźć odpowiednią sekwencję niezbędne jest sprawdzenie wielu cząsteczek, nieznacznie różniących się sekwencją oraz przetestowanie różnych warunków roztworu.

Wpływ jonów na strukturę kwadrupleksu

Struktury kwadrupleksów (AGG)₂A i p(UGG)₂U powstające w obecności kationów potasu są takie same, jak te w środowisku kationów amonu. Z kolei kationy sodu, posiadające mniejszy promień jonowy, promują powstawanie odmiennej, mniej trwałej formy.

Porównanie wyników uzyskanych różnymi metodami – UV-Vis, CD, NMR oraz ESI-IMS-MS

Zastosowanie tych samych roztworów do pomiarów widm ¹H NMR, UV-Vis i CD (0.01 mM RNA) i porównanie uzyskanych wyników z widmem otrzymanym dla RNA o stężeniu rutynowo stosowanym do pomiarów widm NMR, które jest większe o około trzy rzędy wielkości, wykazało, że w większości przypadków wyniki te dają spójny obraz powstającej struktury. Najszybszym sposobem potwierdzenia zawiązywania się struktury kwadrupleksu w roztworze jest rejestracja krzywych topnienia przy długości fali 295 nm oraz widma ¹H NMR.

Podobieństwo widm CD struktur A-RNA i równoległych kwadrupleksów, nie pozwala na wyciągnięcie jednoznacznego wniosku o istnieniu struktury kwadrupleksu, bez poparcia go innymi metodami. Niemniej jednak, uważna analiza dodatkowych pasm obserwowanych w widmach CD może dostarczyć dowodów na powstawanie nietypowych motywów strukturalnych.

Aby informacje dotyczące stechiometrii powstającego kwadrupleksu, uzyskane z analizy widm ESI-IMS-MS, rejestrowanych w obecności jonów NH₄⁺, można było wykorzystać w procesie ustalania topologii kwadrupleksu metodami NMR, konieczne jest wykonanie widm ¹H NMR w roztworze zawierającym kationy amonu. Dopiero z porównania widm NMR zarejestrowanych w obecności kationów

potasu i amonu, można wnioskować o użyteczności wyników ze spektrometrii mas do analizy strukturalnej metodami spektroskopii NMR.

Pofaldowanie kwadrupleksów AGGAGGA i pUGGUGGU

Wszystkie przebadane przeze mnie cząsteczki RNA, zbudowane z powtórzeń AGG i UGG istnieją w roztworze jako kwadrupleksy, niezależnie od stężenia RNA, czy zastosowanego kationu jednowartościowego. Jednakże jedynie cząsteczki $(AGG)_2A$ i $p(UGG)_2U$ przyjmują pojedynczą formę w roztworze zawierającym 50 mM KCl, 10 mM fosforan potasu i 0.1 mM EDTA. Na podstawie analizy widm NMR zaproponowałam model powstających kwadrupleksów. Dla każdej z cząsteczek zaobserwowałam obecność charakterystycznego motywu strukturalnego oraz odmienny mechanizm dimeryzacji. $(AGG)_2A$ w swojej strukturze posiada motyw heksady $A:(G:G:G:G):A$, natomiast $p(UGG)_2U$ charakteryzuje występowanie U-tetrad. Dimer dwuniciowych kwadrupleksów $(AGG)_2A$ powstaje w wyniku silnych oddziaływań warstwowych pomiędzy dwiema heksadami (oddziaływanie typu głowa-do-głowy), natomiast dimer czteroniciowych kwadrupleksów $p(UGG)_2U$ powstaje przez wzajemną interkalację U-tetrad, znajdujących się na końcach 3' poszczególnych podjednostek (oddziaływanie typu ogon-do-ogona).

Moje badania, oraz wyniki otrzymane w naszej Pracowni dla cząsteczek zbudowanych z powtórzeń CGG, wskazują na niezwykle różnorodność powstających struktur, co może mieć znaczenie podczas prób wyjaśnienia ich funkcji biologicznych.

Środowisko wewnątrzkomórkowe

Struktura formowana przez cząsteczki RNA zbudowane z dwóch lub czterech powtórzeń AGG lub UGG w ekstrakcie z komórek HeLa jest zazwyczaj taka sama jak struktura obserwowana w roztworze zawierającym kationy potasu.

Cząsteczki FAM- $(AGG)_4A$ oraz FAM- $(UGG)_4U$ mogą przenikać przez błonę komórkową i lokalizują się zarówno w cytoplazmie, jak i w jądrze komórkowym.

MATERIAŁY I METODY

7. MATERIAŁY I METODY

7.1. Synteza chemiczna i przygotowanie RNA do badań

Wszystkie wykorzystane w trakcie realizacji rozprawy doktorskiej oligorybonukleotydy zostały otrzymane we współpracy z profesorem Ryszardem Kierzkim. Cząsteczki te były otrzymywane za pomocą syntezy chemicznej stosując metodę amidofosforynową na podłożu stałym (190–192). Synteza była prowadzona w skali 1 mikromolowej przy użyciu handlowo dostępnych amidofosforynów, posiadających blokadę grupy 2' hydroksylowej w postaci grupy 2'-O-triizopropylsiloksymetylowej (2'-O-TOM). Po syntezie otrzymywałam oligorybonukleotyd, który końcem 3' nadal był połączony z podłożem, natomiast miał wolną grupę 5'-OH. Przygotowanie oligomeru RNA do badań przebiegało w kilku, opisanych poniżej etapach:

- W celu odcięcia oligomeru od podłoża, usunięcia zasadolabilnych grup blokujących oraz odsililowania, przyłączony do podłoża oligomer traktowałam roztworem $\text{NH}_4\text{OH}:\text{EtOH}$ (2 ml, 3:1 v/v) i pozostawiałam przez noc w 55 °C. Po tym czasie, próbkę wymrażałam przez 15 minut w temperaturze – 20 °C. Roztwór z osadu kolejno przesączałam przez kolumnę filtracyjną (Fiberbrand Filter Column, 11-387-50), pozostałe podłoże przemywałam 3 × 0.5 ml wody, a przesącz odparowywałam do sucha. Następnie do wysuszonego oligomeru dodawałam 30 µl DMF i 270 µl $(\text{Et})_3\text{N}\cdot 3\text{HF}$. Dbając o bezwodne warunki i całkowite rozpuszczenie osadu, próbkę pozostawiałam w temperaturze 55 °C przez 3 godziny. Po tym czasie dodawałam 5 ml n-butanolu i próbkę umieszczałam w temperaturze – 20 °C w celu wytrącenia osadu oligomeru. Po upływie 1 godziny osad był zwirowywany przez 10 minut, w temperaturze 4 °C (2935 × g), roztwór z nad osadu był zlewany, a osad wysuszony pod zmniejszonym ciśnieniem.
- W celu odsolenia próbek i usunięcia niskocząsteczkowych zanieczyszczeń używałam kolumnienki Sep-Pak C18 (Waters). W pierwszym etapie silanizowane podłoże C18 przemywałam kolejno 10 ml acetonitrylu i 10 ml 10 mM roztworu NH_4HCO_3 . Na tak przygotowane podłoże nanosiłam oligomer, rozpuszczony w 10 ml 10 mM roztworu NH_4HCO_3 i zbierałam frakcję L (od angielskiego słowa *load*, czyli załadować). Był to przesącz otrzymany po nałożeniu próbki na kolumnę. W kolejnym etapie, podłoże z oligomerem

przemywałam 10 ml 10 mM roztworu NH_4HCO_3 i zbierałam frakcję W (od angielskiego słowa *wash* - przemyć), czyli przesącz otrzymywany po przemyciu kolumny. Kolejny etap polegał na wymyciu oczyszczonego materiału z kolumny. Ostatnią frakcję otrzymywałam przez przemycie kolumny 5 ml 30% roztworu acetonitrylu w wodzie. Po odparowaniu rozpuszczalnika pod zmniejszonym ciśnieniem uzyskiwałam wstępnie oczyszczony oligorybonukleotyd.

- Otrzymana w ten sposób próbka była jeszcze zanieczyszczona oligomerami o różnej długości, stanowiącymi produkt uboczny syntezy chemicznej. W celu uzyskania czystego produktu stosowałam cienkowarstwową chromatografię cieczową (TLC). Rozpuszczone w 100 μl wody próbki RNA nakładałam na silikażelowe płytki (20 × 20 cm), które rozwijałam w układzie n-propanol:amoniak:woda, 52:38:10, v/v/v. Rozdział trwał zazwyczaj około pięciu godzin. Główny produkt znajdował się w najwolniej migrującym prążku. Był on wyskrobywany z płytek i eluowany czterokrotnie z 2 ml wody. Połączone frakcje odparowywałam do sucha.
- Ostateczne przygotowanie próbki RNA polegało na usunięciu resztek silikażelu i ich dodatkowym odsoleniu na kolumnkach Sep-Pak C18. W ten sposób oczyszczone oligorybonukleotydy liofilizowałam i przechowywałam w temperaturze – 20 °C. Ostatecznie po syntezie w skali 1 μM i oczyszczaniu otrzymywałam średnio 10 – 20 OD RNA, przy czym 1 OD (ang. *Optical Density*) jest to taka ilość oligonukleotydu, która, gdy zostanie rozpuszczona w 1 ml wody i umieszczona w kuwecie o drodze optycznej równej 1 cm, będzie miała wartość absorbancji, mierzoną przy długości fali 260 nm, równą 1.

Czystość otrzymywanego do badań materiału była potwierdzana przy pomocy widm ^1H NMR lub MALDI-TOF MS.

Inne sposoby odsalania próbek RNA:

Ponieważ stosowane do badań ESI-IMS-MS oligorybonukleotydy muszą być całkowicie pozbawione jonów K^+ i Na^+ (Rozdział 3.3.4.), próbki te poddawałam dodatkowo dializie. Używałam do tego woreczków SpectraIPor®CE (Cellulose Ester), punkt odcięcia 500 Da, średnica 5 mm, o objętości 1 ml. Do czterokrotnie przemytego sterylną wodą dejonizowaną (MiliQ) woreczka dializacyjnego

dodawałam roztwór oligomeru w wodzie i woreczek umieszczałam w butelce wypełnionej 1 l sterylnej wody (MiliQ). Dializę przeprowadzałam przez trzy dni w temperaturze pokojowej, cały czas mieszając, i wymieniając wodę co 24 godziny. Po tym czasie, zawartość woreczka przenosiłam do probówki, odparowywałam pod zmniejszonym ciśnieniem i przechowywałam w temperaturze – 20 °C.

Czasami, w celu zmiany buforu, stosowałam ultrafiltrację wykorzystując probówki Amicon Ultra-4, posiadające membranę z regenerowanej celulozy o punkcie odcięcia 3000 Da i objętości 4 ml. Do czterokrotnie przemytej sterylną wodą (MiliQ) probówki ultrafiltracyjnej dodawałam roztwór oligomeru znajdujący się np. w buforze 10 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 , 0.1 mM EDTA, z dodatkiem 50 mM KCl i probówkę wirowałam z prędkością $6603 \times g$, w temperaturze 10 °C przez 30 minut. Do pozostałego po tym czasie roztworu dodawałam 3 ml buforu, w którym chciałam otrzymać próbkę RNA (np. 10 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 , 0.1 mM EDTA, z dodatkiem 150 mM NaCl), po czym probówkę poddawałam wirowaniu. Czynność tę powtarzałam czterokrotnie. Ostatecznie pozostały roztwór (~ 50 µl) przenosiłam do 3 mm probówki NMR i uzupełniałam buforem do objętości 200 µl.

Obliczanie ilości RNA

Ilość stosowanych do badań oligorybonukleotydów była obliczana na podstawie poniższych wzorów:

$$OD = A_{260} \cdot rozc \cdot V$$

A_{260} – wartość absorbancji, mierzona przy długości fali 260nm;

rozc – rozcieńczenie próbki, znajdującej się w kuwecie o drodze optycznej 1 cm;

V – objętość całkowita roztworu [ml]

$$C = A / \epsilon \cdot l$$

C – stężenie [mol/dm³]

ϵ – współczynnik ekstynkcji [dm³/mol · cm],

obliczony przy użyciu kalkulatora, dostępnego na stronie internetowej:

<http://www.ribotask.com/calculator.asp?PageID=40>

l – droga optyczna [cm]

7.2. Bufory stosowane do badań UV-Vis, CD i NMR:

Bufor fosforanowy zawierający jony K^+ :

50 mM KCl, 10 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 , 0.1 mM EDTA, pH 6.8

KCl – 372.5 mg

K_2HPO_4 – 18.75 ml, 0.2 M - (1.776g w 50 ml wody)

KH_2PO_4 – 31.25 ml, 0.2 M - (1.374g w 50 ml wody)

EDTA – 0.1 mM, 3.72 mg

uzupełniono sterylną, dejonizowaną wodą do 100 ml

Bufor fosforanowy zawierający jony Na^+ :

150 mM NaCl, 10 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 , 0.1 mM EDTA, pH 6.8

NaCl – 877.5 mg

Na_2HPO_4 – 26.62 mg

NaH_2PO_4 – 37.49 mg

EDTA – 1.86 mg

uzupełniono sterylną, dejonizowaną wodą do 50 ml

Bufor Tris-HCl:

10mM Tris-HCl, pH 6.6

Tris-HCl – 12.11 mg

HCl (12.1 M) – 8 μ l

uzupełniono sterylną, dejonizowaną wodą do 10 ml

7.3. Aparatura pomiarowa

- Syntetyzer BioAutomation Corporation MerMade 12
- Syntetyzer DNA/RNA firmy Applied Biosystems 392
- Spektrofotometr UV-Vis JASCO V-650 z termoprogramatorem
- Spetropolarymetr JASCO J-815 z termoprogramatorem
- Spektrometr NMR Bruker AVANCE II 400 MHz
- Spektrometr NMR Bruker AVANCE III 700 MHz wyposażony w głowicę kriogeniczną
- Spektrometr mas MALDI – TOF, micro TOF-Q firmy Bruker

- Spektrometr mas Synapt HDMS firmy Waters, stosowany do pomiarów ESI-IMS-MS
- pH-metr, Denver Instrument
- Mikroskop konfokalny - system Leica TCS SP5 II, zawierający mikroskop odwrócony DMI 6000 CS Trin, laser biały 470 – 670 nm, laser 405, system skanujący SP5, detektory PMT i HyD, obiektyw immersyjny Plan Apo 63 × o aperturze 1.4, kamerę cyfrową Leica DFC450 C oraz oprogramowanie Leica LAS.

7.4. Pomiar krzywych topnienia RNA

Pomiar krzywych topnienia wykonywałam przy długości fali 295 nm i polegał na śledzeniu zmian wartości absorbancji wraz ze wzrostem temperatury. Zakres temperatur wynosił 5 – 90 °C, a szybkość zmian temperatury wynosiła 0.5 °C. Absorbancja rejestrowana była co 0.5 °C. Próbki były umieszczone w kuwecie kwarcowej o drodze optycznej 1 cm i objętości 300 µl. W celu zabezpieczenia próbek przed odparowaniem rozpuszczalnika, na jej powierzchnię był наносzony olej silikonowy. Przed pomiarem, aby uniknąć formowania pęcherzyków powietrza, napełnione próbką kuwety były wirowane przez 3 minuty z prędkością 2935 × g. Jako wzorzec stosowałam ten sam bufor, w którym przygotowałam próbki RNA.

7.5. Pomiar absorpcyjnych widm różnicowych (TDS)

W celu uzyskania absorpcyjnych widm różnicowych rejestrowałam widma UV-Vis w zakresie fal 220 – 340 nm, w temperaturach 20 °C i 90 °C. Szybkość skanowania wynosiła 100 nm/min, absorbancja próbki rejestrowana była co 0.5 nm. Widmo TDS uzyskiwałam po odjęciu widma UV-Vis mierzonego w temperaturze 20 °C od widma UV-Vis zarejestrowanego w 90 °C. Próbki były umieszczone w kuwecie kwarcowej o drodze optycznej 1 cm i objętości 300 µl. W celu zabezpieczenia próbek przed odparowaniem rozpuszczalnika, na jej powierzchnię był наносzony olej silikonowy. Jako wzorzec stosowałam ten sam bufor, w którym przygotowałam próbki RNA. Przed pomiarem, aby uniknąć formowania pęcherzyków powietrza, napełnione próbką kuwety były wirowane przez 3 minuty z prędkością 2935 × g.

7.6. Pomiar widma dichroizmu kołowego (CD)

Widma CD dla 0.01 mM RNA rejestrowałam w zakresie fal 220 – 340 nm, w temperaturze 25 °C. Pomiar był wykonywany co 0.1 nm, z prędkością przemieszczania 50 nm/min, i zawierał trzy powtórzenia. Jako wzorec stosowałam ten sam bufor, w którym przygotowałam próbki RNA. Pomiar wykonywałam w kuwecie kwarcowej o drodze optycznej 1 cm i objętości 2500 µl. Różnica absorpcji światła spolaryzowanego prawo- i lewoskrętnie, $\Delta\epsilon$ [cm² mmol⁻¹] została znormalizowana względem liczby nukleotydów tworzących sekwencje badanych próbek RNA (193).

7.7. Spektrometria mas – ESI-IMS-MS

Badania z wykorzystaniem techniki ESI-IMS-MS wykonywałam we współpracy z dr Valérie Gabelica, w ramach akcji COST MP0802 na University of Liège w Belgii. Dla wszystkich badanych sekwencji przygotowałam dwa roztwory wyjściowe w 150 mM NH₄OAc, różniące się stężeniem RNA. Podałam je topnieniu w łaźni wodnej (90 °C) przez 5 minut, po czym pozostawiłam w temperaturze pokojowej do ochłodzenia i przechowywałam w temperaturze 4 °C. Pierwszy roztwór zawierał 0.005 mM RNA, które jest standardowym stężeniem stosowanym w pomiarach ESI-IMS-MS, natomiast drugi roztwór zawierał 0.5 mM RNA, odpowiadające standardowym pomiarom ¹H NMR. Bezpośrednio przed pomiarem widma pobierałam:

- dla 0.005 mM RNA: 85 µl roztworu wyjściowego (0.005 mM RNA w 150 mM NH₄OAc), 5 µl wzorca intensywności sygnału (dT₆), 10 µl MeOH. Stężenie RNA w nastrzykiwanej do aparatu próbce wynosiło 0.00425 mM.
- dla 0.5 mM RNA: 4 µl roztworu wyjściowego (0.5 mM RNA w 150 mM NH₄OAc), 5 µl wzorca intensywności sygnału (dT₆), 10 µl MeOH. Stężenie RNA w nastrzykiwanej do aparatu próbce wynosiło 0.018 mM.

Metanol był dodawany na 10 minut przed każdym pomiarem (Rozdział 3.3.4.). Pierwszy pomiar był wykonany po dobie od przygotowania roztworów wyjściowych. Dla próbek 0.5 mM RNA wykonałam dodatkowe pomiary po upływie 5 i 11 dni od momentu przygotowania roztworu wyjściowego.

Analizy spektrometryczne przeprowadziłam z wykorzystaniem aparatu Synapt HDMS (Waters, Manchester, UK) pracującego ze źródłem jonizacji poprzez elektrozpraszanie (ESI). Próbkę analizowałam metodą bezpośredniego nastrzyku przy przepływie 4 $\mu\text{l}/\text{min}$ (ang. *direct infusion*). Widma masowe zostały wykonane w trybie jonów ujemnych. Napięcie w źródle wynosiło -2.4 kV. Napięcia na wlocie do analizatora wynosiły odpowiednio: 40 V na pierwszej osłonie (ang. *sampling cone*) i 4 V na drugiej (ang. *extraction cone*). Temperatura w źródle wynosiła 20 °C, a temperatura odparowywania próbki 40 °C. Ciśnienie zwrotne w źródle wynosiło 3.40 milibara. Napięcie wyłapujące oraz napięcie transferu kolizyjnego wynosiło 4 V. Ciśnienie argonu w komorze zderzeń wynosiło 2.57×10^{-2} milibara. Powyższe ustawienia zapewniły łagodne odparowanie i transfer próbki. Aparat pracował w trybie pomiaru mobilności jonów (IMS). Ciśnienie azotu w komorze IMS wynosiło 0.532 milibara z falą postępującą o prędkości 300 m/s i o napięciu 8V.

7.8. NMR

Widma prezentowane w pracy zostały zarejestrowane na spektrometrach Bruker AVANCE II 400 MHz oraz Bruker AVANCE III 700 MHz. Do pomiarów widm NMR, na spektrometrze 400 MHz, używałam sondy z detekcją odwrotną (ang. *Inverse Broadband Probehead H-BB-D*) wyposażoną w cewkę ^1H oraz cewkę szerokopasmową (o zakresie częstotliwości $^{31}\text{P} - ^{109}\text{Ag}$). Natomiast pomiary na spektrometrze 700 MHz były wykonywane przy użyciu głowicy kriogenicznej (ang. *Cryo Probe*), wyposażonej w cewki ^1H - $^{31}\text{P}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}/\text{D}$. Obie sondy posiadały generator gradientów w kierunku osi Z. Kalibracja przesunięć chemicznych ^1H NMR wykonana była względem deuterowanego 3-(trimetylosililo)propionianu sodu (TSP). Otrzymane widma były procesowane i analizowane przy pomocy programu TOPSPIN 3.1 (Bruker Biospin).

Widma ^1H NMR

Jednowymiarowe widma ^1H NMR w D_2O (sekwencja: zgpr) wykonywałam głównie w temperaturze 25°C przy szerokości spektralnej 10 ppm. Resztkowy sygnał wody, HDO, był usuwany za pomocą naświetlania małą mocą, metodą presaturacji (194).

Jednowymiarowe widma ^1H NMR w mieszaninie $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (v/v, 9:1) wykonywałam w zakresie temperatur od 2 °C do 80 °C, przy szerokości spektralnej 20 ppm. Silny sygnał pochodzący od H_2O był wygaszany za pomocą gradientowych impulsów metodą WATERGATE (195) (sekwencja: p3919gp) lub metodą *Excitation Sculpting* z impulsami gradientowymi RF (196) (sekwencja: zgesgp).

Widma 2D NMR

Dwuwymiarowe, fazoczułe widma 2D NOESY w D_2O (sekwencja impulsów: noesyphpr) wykonywałam w tak dobranej temperaturze, aby uzyskać jak najlepsze rozseparowanie sygnałów. Widma wykonywałam przy dwóch różnych czasach mieszania (d8, ang. *mixing time*): 150 ms oraz 400 ms. W celu przypisania sygnałów H_2' , widmo 2D NOESY było rejestrowane z czasem mieszania 80 ms. W eksperymencie zebranych zostało 2K zespolonych punktów pomiarowych w kierunku t_2 oraz 512 inkrementów w kierunku t_1 , przy czym każdy składał się przeważnie z 128 spójnych rejestracji sygnałów precesji swobodnej. Widma były wykonane przy szerokości spektralnej 10 ppm, z interwałem czasowym $d_1 = 1.5$ s. Do wygaszania resztkowego sygnału wody, HDO, zastosowana było naświetlanie małą mocą, metodą presaturacji (194).

Widma 2D NOESY w $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1, v/v) (sekwencja impulsów: noesyegpph) wykonywałam w temperaturze 3°C lub 25°C z czasem mieszania 150 ms lub 400 ms. Do wygaszania sygnału wody stosowana była sekwencja impulsów WATERGATE lub metoda *Excitation Sculpting* z impulsami gradientowymi RF. W eksperymencie zebranych zostało 2K zespolonych punktów pomiarowych w kierunku t_2 oraz 512 inkrementów w kierunku t_1 , przy czym każdy składał się przeważnie z 80 spójnych rejestracji sygnałów precesji swobodnej. Widma były wykonane przy szerokości spektralnej 16 ppm, z interwałem czasowym $d_1 = 1.5$ s.

Fazoczułe widma 2D COSY w D_2O (sekwencja impulsów: cosydfphpr) wykonywałam w temperaturze 25°C lub 30°C. Do wygaszania resztkowego sygnału wody, HDO, zastosowana było naświetlanie małą mocą, metodą presaturacji (194). Widma były wykonane przy szerokości spektralnej 10 ppm, z interwałem czasowym $d_1 = 1.5$ s. W eksperymencie zebranych zostało 2K zespolonych punktów pomiarowych w kierunku t_2 oraz 512 inkrementów w kierunku t_1 , przy czym każdy składał się przeważnie z 64 spójnych rejestracji sygnałów precesji swobodnej.

Fazoczułe widma korelacyjne ^1H - ^{13}C HSQC (sekwencja impulsów: hsqcetgpsisp2.3) rejestrowałam głównie dla zawężonego zakresu obejmującego sygnały ^{13}C tylko od reszt cukrowych (55-100 ppm) w temperaturze 25°C lub 30°C. Aby zniwelować wpływ sprzężeń proton-węgiel, podczas akwizycji danych na kanale ^{13}C przykładana była sekwencja impulsów GARP. W eksperymencie wykonanym dla (AGG)₂A zebranych zostało 1K zespolonych punktów pomiarowych w kierunku t₂ oraz 512 inkrementów w kierunku t₁, przy czym każdy składał się przeważnie z 92 spójnych rejestracji sygnałów precesji swobodnej. Natomiast dla p(UGG)₂U zebranych zostało 2K zespolonych punktów pomiarowych w kierunku t₂ oraz 256 inkrementów w kierunku t₁, przy czym każdy składał się przeważnie z 256 spójnych rejestracji sygnałów precesji swobodnej.

Widmo korelacyjne ^1H - ^{31}P HSQC w D₂O dla cząsteczki (AGG)₂A zarejestrowałam stosując sekwencję impulsów na_xhcoetf3gp. Widmo wykonywane było przy szerokości spektralnej sw = 7 ppm w kierunku ^{31}P (O₂ = -1 ppm, wzorzec trimetylofosforan, TMP) oraz 9 ppm w kierunku ^1H . Zawierało ono 256 sygnałów FID, akumulowanych z 48 przebiegów, przy czym każdy sygnał zawierał 1K punktów zespolonych. Natomiast dla cząsteczki p(UGG)₂U widmo korelacyjne ^1H - ^{31}P HSQC w D₂O zarejestrowałam stosując sekwencję impulsów inv4p31nd.hsg. Widmo wykonywane było przy szerokości spektralnej sw = 3.75 ppm w kierunku ^{31}P (O₂ = -1 ppm, wzorzec trimetylofosforan, TMP) oraz 9 ppm w kierunku ^1H . Zawierało ono 128 sygnałów FID, akumulowanych ze 128 przebiegów, przy czym każdy sygnał zawierał 2K punktów zespolonych.

Dla cząsteczki (AGG)₂A zarejestrowane zostało widmo ^1H - ^{13}C HMBC z użyciem sekwencji impulsów hmbcgpndqf. W eksperymencie tym kluczowe jest dobranie wartości stałej sprzężenia dalekiego zasięgu, J(HX). Prezentowane w pracy widmo zostało zarejestrowane dla stałej sprzężenia 8 Hz. W czasie pomiaru zebranych zostało 2K zespolonych punktów pomiarowych w kierunku t₂ oraz 128 inkrementów w kierunku t₁, przy czym każdy składał się przeważnie z 1904 spójnych rejestracji sygnałów precesji swobodnej.

Widma 2D ^1H - ^{15}N HSQC w H₂O/D₂O (9:1, v/v) (sekwencja impulsów: hsqcftp3gpphwg) rejestrowałam w temperaturze 3°C (dla p(UGG)₂U) oraz 25°C (dla (AGG)₂A). Widma zarejestrowano dla dwóch różnych zakresów: obejmującego przesunięcia chemiczne atomów azotu N1 i N2 reszt guanozyn (zakres

50-160 ppm), jak również dla zakresu obejmującego sygnały NH1 guanozyn i urydyn (zakres 130-170 ppm). W eksperymencie zebranych zostało 2K zespolonych punktów pomiarowych w kierunku t2 oraz 64 inkreментy w kierunku t1, przy czym każdy składał się przeważnie z 512 spójnych rejestracji sygnałów precesji swobodnej. Do wygaszania sygnału wody zastosowana była sekwencja impulsów WATERGATE.

Do pomiaru współczynnika dyfuzji dla próbek p(UGG)₂U zawierających jony K⁺ lub NH₄⁺ zastosowałam sekwencję impulsów stebpgp1s19. Do wygaszania sygnału wody zastosowana była sekwencja impulsów WATERGATE. Współczynnik dyfuzji został wyznaczony przez rejestrację zmiany intensywności widma wraz ze zmianą gradientu pola G, przy ustalonym czasie pomiędzy gradientami 150 ms (Δ) i czasie trwania tych zaburzeń pola magnetycznego – 4 ms (δ). Wartości Δ oraz δ zostały tak dobrane, aby przy mocy gradientu 2% intensywność sygnałów w widmie ¹H NMR była możliwie niezaburzona, natomiast przy mocy gradientów 95% intensywność tych sygnałów była bliska zera. W eksperymencie zebranych zostało 3K zespolonych punktów pomiarowych w kierunku t2 oraz 32 inkreментy w kierunku t1, przy czym każdy składał się przeważnie z 704 spójnych rejestracji sygnałów precesji swobodnej. Wyniki analizowane były w programie TOPSPIN 3.1 z zastosowaniem modułu *T1/T2 Relaxation*.

7.9. NMR w ekstrakcie z komórek HeLa

Badania te wykonywałam we współpracy z Pracownią Analizy Struktur Subkomórkowych IChB PAN. Do badań był stosowany ekstrakt z ludzkich komórek nabłonkowych, pochodzących z raka szyjki macicy. Komórki uległy nowotworowej transformacji na skutek zakażenia wirusem brodawczaka HPV 18 (ang. *Human Papiloma Virus*). Nazwa linii komórkowej (HeLa) pochodzi od imienia i nazwiska dawcy: Henrietta Lacks.

Komórki HeLa były hodowane w pożywce RPMI-1640, w skład której wchodziły: płodowa surowica wołowa (FBS, ang. *Fetal Bovine Serum*) o stężeniu 10 %, roztwór witamin RPMI-1640 o stężeniu 1 × oraz antybiotyk przeciwgrzybowy (Antibiotic-Antimycotic) o stężeniu 1 ×. Hodowlę prowadzono przez 48 godzin w atmosferze zawierającej 5 % CO₂, w temperaturze 37 °C. Następnie, komórki poddawano trypsynizacji i trzykrotnemu płukaniu w buforze PBS (8 g/l NaCl,

0.2 g/l KCl, 1.44 g/l Na₂HPO₄, 0.24 g/l KH₂PO₄, pH 7.4). Ekstrakt komórkowy przygotowywano przez sonikację 1.6×10^7 komórek zawieszonych w 1 ml wody dejonizowanej i wirowano przez 5 minut z prędkością $20\ 000 \times g$.

Próbki przygotowane do eksperymentu ¹H NMR zawierały 0.01 mM RNA, 180 µl ekstraktu z komórek HeLa i 20 µl D₂O. Do pomiarów były stosowane probówki NMR o średnicy 3 mm. Widma były rejestrowane od razu po rozpuszczeniu RNA w ekstrakcie oraz po upływie 24 godzin. Widma ¹H NMR były rejestrowane w temperaturze 25 °C i akumulowane z 256 – 2048 skanów. Szerokość spektralna widma wynosiła 20 ppm, czas akwizycji 1.16 s, a czas relaksacji układu 1s. Resztkowy sygnał wody był tłumiony metodą *Excitation Sculpting* z impulsami gradientowymi RF (196).

7.10. Badania transfekcji i lokalizacji subkomórkowej

Badania te również były wykonywane we współpracy z Pracownią Analizy Struktur Subkomórkowych IChB PAN.

Komórki HeLa (1.2×10^5 komórek) były hodowane według takiej samej procedury, jak opisano w poprzedniej metodzie. Hodowla była prowadzona przez 24 godziny. Po trypsynizacji i płukaniu w buforze PBS, komórki poddawano kotransfekcji z użyciem 0.5 µg FAM-(AGG)₄A lub FAM-(UGG)₄U (FAM – karboksyfluoresceina, przyłączona do końca 5' oligorybonukleotydu) oraz 1 µl lipofektaminy 2000 (zgodnie z opisem producenta – Life Technologies). Następnie, kontynuowano inkubację przez 24 godziny w atmosferze zawierającej 5 % CO₂ i w temperaturze 37 °C. Po tym czasie, komórki płukano trzykrotnie w buforze PBS i zawieszano w 300 µl roztworu barwiącego, zawierającego 3 µg/ml Hoechst 33258 (barwi jądra na kolor niebieski) i 100 nM MitoTracker Red CMXRos (barwi mitochondria na kolor czerwony). Jądra i mitochondria komórek były barwione *in situ* przez 15 do 20 minut. Komórki wizualizowano po upływie 24 godzin od transfekcji, używając systemu Leica TCS SP5 II. Zdjęcia wykonywane były z użyciem obiektywu immersyjnego Plan Apo 63 × o aperturze 1.4. Spektrum wzbudzenia/emisji wynosiło 405/460 nm dla barwnika jąder, 579/599 nm dla barwnika mitochondriów oraz 494/518 nm dla FAM-RNA.

LITERATURA

8. LITERATURA

1. Sobczak,K., de Mezer,M., Michlewski,G., Krol,J. and Krzyzosiak,W.J. (2003) RNA structure of trinucleotide repeats associated with human neurological diseases. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 5469–5482.
2. Li,L.-B. and Bonini,N.M. (2010) Roles of trinucleotide-repeat RNA in neurological disease and degeneration. *Trends Neurosci.*, **33**, 292–298.
3. Krzyzosiak,W.J., Sobczak,K., Wojciechowska,M., Fiszer,A., Mykowska,A. and Kozlowski,P. (2012) Triplet repeat RNA structure and its role as pathogenic agent and therapeutic target. *Nucleic Acids Res.*, **40**, 11–26.
4. Kozlowski,P., de Mezer,M. and Krzyzosiak,W.J. (2010) Trinucleotide repeats in human genome and exome. *Nucleic Acids Res.*, **38**, 4027–4039.
5. Glass,I.A. (1991) X-linked mental retardation. *J. Med. Genet.*, **28**, 361–371.
6. Jacquemont,S., Hagerman,R.J., Leehey,M., Grigsby,J., Zhang,L., Brunberg,J. a, Greco,C., Des Portes,V., Jardini,T., Levine,R., et al. (2003) Fragile X premutation tremor/ataxia syndrome: molecular, clinical, and neuroimaging correlates. *Am. J. Hum. Genet.*, **72**, 869–878.
7. Sobczak,K., Michlewski,G., de Mezer,M., Kierzek,E., Krol,J., Olejniczak,M., Kierzek,R. and Krzyzosiak,W.J. (2010) Structural diversity of triplet repeat RNAs. *J. Biol. Chem.*, **285**, 12755–12764.
8. Mashima,T., Matsugami,A., Nishikawa,F., Nishikawa,S. and Katahira,M. (2009) Unique quadruplex structure and interaction of an RNA aptamer against bovine prion protein. *Nucleic Acids Res.*, **37**, 6249–6258.
9. Kiliszek,A., Kierzek,R., Krzyzosiak,W.J. and Rypniewski,W. (2011) Crystal structures of CGG RNA repeats with implications for fragile X-associated tremor ataxia syndrome. *Nucleic Acids Res.*, **39**, 7308–7315.
10. Neidle,S. and Balasubramanian,S. eds. (2006) *Quadruplex Nucleic Acids*; The Royal Society of Chemistry, Cambridge.
11. Huppert,J.L. and Balasubramanian,S. (2005) Prevalence of quadruplexes in the human genome. *Nucleic Acids Res.*, **33**, 2908–2916.
12. Huppert,J.L., Bugaut,A., Kumari,S. and Balasubramanian,S. (2008) G-quadruplexes: the beginning and end of UTRs. *Nucleic Acids Res.*, **36**, 6260–6268.
13. Biffi,G., Tannahill,D., McCafferty,J. and Balasubramanian,S. (2013) Quantitative visualization of DNA G-quadruplex structures in human cells. *Nat. Chem.*, **5**, 182–186.

14. Biffi,G., Di Antonio,M., Tannahill,D. and Balasubramanian,S. (2014) Visualization and selective chemical targeting of RNA G-quadruplex structures in the cytoplasm of human cells. *Nat. Chem.*, **6**, 75–80.
15. Huppert,J.L. (2008) Four-stranded nucleic acids: structure, function and targeting of G-quadruplexes. *Chem. Soc. Rev.*, **37**, 1375–1384.
16. Millevoi,S., Moine,H. and Vagner,S. (2012) G-quadruplexes in RNA biology. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, **3**, 495–507.
17. Xu,Y. and Komiyama,M. (2012) Structure, function and targeting of human telomere RNA. *Methods*, **57**, 100–105.
18. Murat,P., Zhong,J., Lekieffre,L., Cowieson,N.P., Clancy,J.L., Preiss,T., Balasubramanian,S., Khanna,R. and Tellam,J. (2014) G-quadruplexes regulate Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen 1 mRNA translation. *Nat. Chem. Biol.*, **10**, 358–364.
19. Mashima,T., Nishikawa,F., Kamatari,Y.O., Fujiwara,H., Saimura,M., Nagata,T., Kodaki,T., Nishikawa,S., Kuwata,K. and Katahira,M. (2013) Anti-prion activity of an RNA aptamer and its structural basis. *Nucleic Acids Res.*, **41**, 1355–1362.
20. Malgowska,M., Gudanis,D., Kierzek,R., Wyszko,E., Gabelica,V. and Gdaniec,Z. (2014) Distinctive structural motifs of RNA G-quadruplexes composed of AGG, CGG and UGG trinucleotide repeats. *Nucleic Acids Res.*, **42**, 10196–10207.
21. Malgowska,M., Gudanis,D., Teubert,A., Dominiak,G. and Gdaniec,Z. (2012) How to study G-quadruplex structures. *BioTechnologia*, **93**, 381–390.
22. Saenger,W. (1984) Principles of Nucleic Acid Structures; Springer-Verlag: New York.
23. Schneider,B., Morávek,Z. and Berman,H.M. (2004) RNA conformational classes. *Nucleic Acids Res.*, **32**, 1666–1677.
24. Popena,M., Milecki,J. and Adamiak,R.W. (2004) High salt solution structure of a left-handed RNA double helix. *Nucleic Acids Res.*, **32**, 4044–4054.
25. Popena,Ł. (2008) Analiza strukturalna wybruszonych dupleksów RNA metodami biomolekularnej spektroskopii NMR. Praca doktorska; IChB PAN, Poznań
26. Vicens,Q. and Westhof,E. (2003) Crystal structure of geneticin bound to a bacterial 16 S ribosomal RNA A site oligonucleotide. *J. Mol. Biol.*, **326**, 1175–1188.
27. Peattie,D.A., Douthwaite,S., Garret,R.A. and Noller,H.F. (1981) A “bulged” double helix in a RNA-protein contact site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **78**, 7331–7335.
28. Hermann,T. and Patel,D.J. (2000) RNA bulges as architectural and recognition motifs. *Structure*, **299**, 103–112.

29. Murphy, F.L. and Cech, T.R. (1993) An independently folding domain of RNA tertiary structure within the Tetrahymena ribozyme. *Biochemistry*, **32**, 5291–5300.
30. Szewczak, A.A., Moore, P.B., Chang, Y.L. and Wool, I.G. (1993) The conformation of the sarcin/ricin loop from 28S ribosomal RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **90**, 9581–9585.
31. Burge, S., Parkinson, G.N., Hazel, P., Todd, A.K. and Neidle, S. (2006) Quadruplex DNA: sequence, topology and structure. *Nucleic Acids Res.*, **34**, 5402–5415.
32. Ji, X., Sun, H., Zhou, H., Xiang, J., Tang, Y. and Zhao, C. (2011) Research Progress of RNA Quadruplex. *Nucleic Acid Ther.*, **21**, 185–200.
33. Randazzo, A., Esposito, V., Ohlenschläger, O., Ramachandran, R. and Mayola, L. (2004) NMR solution structure of a parallel LNA quadruplex. *Nucleic Acids Res.*, **32**, 3083–3092.
34. Russo Krauss, I., Parkinson, G.N., Merlino, A., Mattia, C.A., Randazzo, A., Novellino, E., Mazzarella, L. and Sica, F. (2014) A regular thymine tetrad and a peculiar supramolecular assembly in the first crystal structure of an all-LNA G-quadruplex. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, **70**, 362–370.
35. Krishnan-Ghosh, Y., Stephens, E. and Balasubramanian, S. (2004) A PNA4 Quadruplex. *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 5944–5945.
36. Hud, N. V. and Plavec, J. (2006) The Role of Cations in Determining Quadruplex Structure and Stability. In *Quadruplex Nucleic Acids*. pp. 100–130.
37. Collie, G.W. and Parkinson, G.N. (2011) The application of DNA and RNA G-quadruplexes to therapeutic medicines. *Chem. Soc. Rev.*, **40**, 5867–5892.
38. Lane, A.N., Chaires, J.B., Gray, R.D. and Trent, J.O. (2008) Stability and kinetics of G-quadruplex structures. *Nucleic Acids Res.*, **36**, 5482–5515.
39. Martadinata, H. and Phan, A.T. (2013) Structure of Human Telomeric RNA (TERRA): Stacking of Two G-Quadruplex Blocks in K(+) Solution. *Biochemistry*, **52**, 2176–2183.
40. Martadinata, H. and Phan, A.T. (2009) Structure of propeller-type parallel-stranded RNA G-quadruplexes, formed by human telomeric RNA sequences in K⁺ solution. *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 2570–2578.
41. Liu, H., Matsugami, A., Katahira, M. and Uesugi, S. (2002) A Dimeric RNA Quadruplex Architecture Comprised of Two G:G(:A):G:G(:A) Hexads, G:G:G:G Tetrads and UUUU Loops. *J. Mol. Biol.*, **322**, 955–970.
42. Cheong, C. and Moore, P.B. (1992) Solution Structure of an Unusually Stable RNA Tetraplex Containing G- and U-Quartet Structured. *Biochemistry*, **31**, 8406–8414.

43. Collie,G.W., Haider,S.M., Neidle,S. and Parkinson,G.N. (2010) A crystallographic and modelling study of a human telomeric RNA (TERRA) quadruplex. *Nucleic Acids Res.*, **38**, 5569–5580.
44. Pan,B., Shi,K. and Sundaralingam,M. (2006) Crystal structure of an RNA quadruplex containing inosine tetrad: implications for the roles of NH₂ group in purine tetrads. *J. Mol. Biol.*, **363**, 451–459.
45. Pan,B., Shi,K. and Sundaralingam,M. (2006) Base-tetrad swapping results in dimerization of RNA quadruplexes: implications for formation of the i-motif RNA octaplex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **103**, 3130–3134.
46. Pan,B., Xiong,Y., Shi,K., Deng,J. and Sundaralingam,M. (2003) Crystal Structure of an RNA Purine-Rich Tetraplex Containing Adenine Tetrads. *Structure*, **11**, 815–823.
47. Pan,B., Xiong,Y., Shi,K. and Sundaralingam,M. (2003) An Eight-Stranded Helical Fragment in RNA Crystal Structure. *Structure*, **11**, 825–831.
48. Pan,B., Xiong,Y., Shi,K. and Sundaralingam,M. (2003) Crystal Structure of a Bulged RNA Tetraplex at 1.1 Å Resolution. *Structure*, **11**, 1423–1430.
49. Deng,J., Xiong,Y. and Sundaralingam,M. (2001) X-ray analysis of an RNA tetraplex (UGGGGU)₄ with divalent Sr⁽²⁺⁾ ions at subatomic resolution (0.61 Å). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **98**, 13665–13670.
50. Bang,I. (1910) Untersuchungen uber die Guanylsaure. *Biochem. Z.*, **26**, 293–311.
51. Moyzis,R.K., Buckingham,J.M., Crams,L.S., Dani,M., Deaven,L.L., Jones,M.D., Meyne,J., Ratliff,R.L. and Wu,J.-R. (1988) A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **85**, 6622–6626.
52. Wang,Y. and Patel,D.J. (1993) Solution structure of the human telomeric repeat d[AG₃(T₂AG₃)₃] G-tetraplex. *Structure*, **1**, 263–282.
53. Cáceres,C., Wright,G., Gouyette,C., Parkinson,G. and Subirana,J.A. (2004) A thymine tetrad in d(TGGGGT) quadruplexes stabilized with Tl⁺/Na⁺ ions. *Nucleic Acids Res.*, **32**, 1097–1102.
54. Sket,P. and Plavec,J. (2010) Tetramolecular DNA quadruplexes in solution: insights into structural diversity and cation movement. *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 12724–12732.
55. Patel,P.K. and Hosur,R. V. (1999) NMR observation of T-tetrads in a parallel stranded DNA quadruplex formed by *Saccharomyces cerevisiae* telomere repeats. *Nucleic Acids Res.*, **27**, 2457–2464.
56. Oliviero,G., Amato,J., Borbone,N., Galeone,A., Varra,M., Piccialli,G. and Mayol,L. (2006) Synthesis and characterization of DNA quadruplexes containing T-tetrads formed by bunch-oligonucleotides. *Biopolymers*, **81**, 194–201.

57. Borbone,N., Amato,J., Oliviero,G., D'Atri,V., Gabelica,V., De Pauw,E., Piccialli,G. and Mayol,L. (2011) d(CGGTGGT) forms an octameric parallel G-quadruplex via stacking of unusual G(:C):G(:C):G(:C):G(:C) octads. *Nucleic Acids Res.*, **39**, 7848–7857.
58. Patel,P.K., Koti,A.S.R. and Hosur,R. V. (1999) NMR studies on truncated sequences of human telomeric DNA: observation of a novel A-tetrad. *Nucleic Acids Res.*, **27**, 3836–3843.
59. Patel,P.K., Bhavesh,N.S. and Hosur,R. V (2000) NMR observation of a novel C-tetrad in the structure of the SV40 repeat sequence GGGCGG. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **270**, 967–971.
60. Lim,K.W., Alberti,P., Guédin,A., Lacroix,L., Riou,J.-F., Royle,N.J., Mergny,J.-L. and Phan,A.T. (2009) Sequence variant (CTAGGG)_n in the human telomere favors a G-quadruplex structure containing a G.C.G.C tetrad. *Nucleic Acids Res.*, **37**, 6239–6248.
61. Gudanis,D. (2012) Badania równowag konformacyjnych cząsteczek RNA zbudowanych z trójnukleotydowych powtórzeń CGG. Praca doktorska; IChB PAN, Poznań
62. Zhang,N., Gorin,A., Majumdar,A., Kettani,A., Chernichenko,N., Skripkin,E. and Patel,D.J. (2001) Dimeric DNA quadruplex containing major groove-aligned A-T-A-T and G-C-G-C tetrads stabilized by inter-subunit Watson-Crick A-T and G-C pairs. *J. Mol. Biol.*, **312**, 1073–1088.
63. Tran,P.L.T., De Cian,A., Gros,J., Moriyama,R. and Mergny,J.-L. (2013) Tetramolecular quadruplex stability and assembly. *Top. Curr. Chem.*, **330**, 243–273.
64. Kettani,A., Gorin,A., Majumdar,A., Hermann,T., Skripkin,E., Zhao,H., Jones,R. and Patel,D.J. (2000) A dimeric DNA interface stabilized by stacked A · (G · G · G · G) · A hexads and coordinated monovalent cations. *J. Mol. Biol.*, **297**, 627–644.
65. Matsugami,A., Ouhashi,K., Kanagawa,M., Liu,H., Kanagawa,S., Uesugi,S. and Katahira,M. (2001) An intramolecular quadruplex of (GGA)₄ triplet repeat DNA with a G:G:G:G tetrad and a G(:A):G(:A):G(:A):G heptad, and its dimeric interaction. *J. Mol. Biol.*, **313**, 255–269.
66. Matsugami,A., Okuizumi,T., Uesugi,S. and Katahira,M. (2003) Intramolecular higher order packing of parallel quadruplexes comprising a G:G:G:G tetrad and a G(:A):G(:A):G(:A):G heptad of GGA triplet repeat DNA. *J. Biol. Chem.*, **278**, 28147–28153.
67. Zahler,A.M., Williamson,J.R., Cech,T.R. and Prescott,D.M. (1991) Inhibition of telomerase by G-quartet DNA structures. *Nature*, **350**, 718–720.
68. Kim,N.W., Piatyszek,M.A., Prowse,K.R., Harley,C.B., West,M.D., Ho,P.L.C., Coviello,G.M., Wright,W.E., Weinrich,S.L. and Shay,J.W. (1994) Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, **266**, 2011–2015.

69. Mergny, J.-L. (2002) Natural and pharmacological regulation of telomerase. *Nucleic Acids Res.*, **30**, 839–865.
70. Xu, Y. (2011) Chemistry in human telomere biology: structure, function and targeting of telomere DNA/RNA. *Chem. Soc. Rev.*, **40**, 2719–2740.
71. Sun, D., Thompson, B., Cathers, B.E., Salazar, M., Kerwin, S.M., Trent, J.O., Jenkins, T.C., Neidle, S. and Hurley, L.H. (1997) Inhibition of human telomerase by a G-quadruplex-interactive compound. *J. Med. Chem.*, **40**, 2113–2116.
72. Todd, A.K., Johnston, M. and Neidle, S. (2005) Highly prevalent putative quadruplex sequence motifs in human DNA. *Nucleic Acids Res.*, **33**, 2901–2907.
73. Huppert, J.L. and Balasubramanian, S. (2007) G-quadruplexes in promoters throughout the human genome. *Nucleic Acids Res.*, **35**, 406–413.
74. Du, Z., Zhao, Y. and Li, N. (2008) Genome-wide analysis reveals regulatory role of G4 DNA in gene transcription. *Genome Res.*, **18**, 233–241.
75. Simonsson, T., Pecinka, P. and Kubista, M. (1998) DNA tetraplex formation in the control region of c-myc. *Nucleic Acids Res.*, **26**, 1167–1172.
76. Siddiqui-Jain, A., Grand, C.L., Bearss, D.J. and Hurley, L.H. (2002) Direct evidence for a G-quadruplex in a promoter region and its targeting with a small molecule to repress c-MYC transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**, 11593–11598.
77. Balasubramanian, S., Hurley, L.H. and Neidle, S. (2011) Targeting G-quadruplexes in gene promoters: a novel anticancer strategy? *Nat. Rev. Drug Discov.*, **10**, 261–275.
78. Sundquist, W.I. and Heaphy, S. (1993) Evidence for interstrand quadruplex formation in the dimerization of human immunodeficiency virus 1 genomic RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **90**, 3393–3397.
79. Horsburgh, B., Kollmus, H., Hauser, H. and Coen, D. (1996) Translational Recoding Induced by G-Rich mRNA Sequences That Form Unusual Structures. *Cell*, **86**, 949–959.
80. Azzalin, C.M., Reichenbach, P., Khoriantseva, L., Giulotto, E. and Lingner, J. (2007) Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends. *Science*, **318**, 798–801.
81. Schoeftner, S. and Blasco, M.A. (2008) Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II. *Nat. Cell Biol.*, **10**, 228–236.
82. Kumari, S., Bugaut, A., Huppert, J.L. and Balasubramanian, S. (2007) An RNA G-quadruplex in the 5' UTR of the NRAS proto-oncogene modulates translation. *Nat. Chem. Biol.*, **3**, 218–221.

83. Xu, Y., Suzuki, Y. and Komiyama, M. (2009) Click chemistry for the identification of G-quadruplex structures: discovery of a DNA-RNA G-quadruplex. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **48**, 3281–3284.
84. Shrestha, P., Xiao, S., Dhakal, S., Tan, Z. and Mao, H. (2014) Nascent RNA transcripts facilitate the formation of G-quadruplexes. *Nucleic Acids Res.*, **42**, 7236–7246.
85. Deng, Z., Norseen, J., Wiedmer, A., Riethman, H. and Lieberman, P.M. (2009) TERRA RNA binding to TRF2 facilitates heterochromatin formation and ORC recruitment at telomeres. *Mol. Cell*, **35**, 403–413.
86. Redon, S., Reichenbach, P. and Lingner, J. (2010) The non-coding RNA TERRA is a natural ligand and direct inhibitor of human telomerase. *Nucleic Acids Res.*, **38**, 5797–5806.
87. Nandakumar, J., Podell, E.R. and Cech, T.R. (2010) How telomeric protein POT1 avoids RNA to achieve specificity for single-stranded DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **107**, 651–656.
88. Kumari, S., Bugaut, A. and Balasubramanian, S. (2008) Position and stability are determining factors for translation repression by an RNA G-quadruplex-forming sequence within the 5' UTR of the NRAS proto-oncogene. *Biochemistry*, **47**, 12664–12669.
89. Halder, K., Wieland, M. and Hartig, J.S. (2009) Predictable suppression of gene expression by 5'-UTR-based RNA quadruplexes. *Nucleic Acids Res.*, **37**, 6811–6817.
90. Pasternak, A., Hernandez, F.J., Rasmussen, L.M., Vester, B. and Wengel, J. (2011) Improved thrombin binding aptamer by incorporation of a single unlocked nucleic acid monomer. *Nucleic Acids Res.*, **39**, 1155–1164.
91. Pica, A., Russo Krauss, I., Merlino, A., Nagatoishi, S., Sugimoto, N. and Sica, F. (2013) Dissecting the contribution of thrombin exosite I in the recognition of thrombin binding aptamer. *FEBS J.*, **280**, 6581–6588.
92. De Rache, A., Kejnovská, I., Vorlíčková, M. and Buess-Herman, C. (2012) Elongated thrombin binding aptamer: a G-quadruplex cation-sensitive conformational switch. *Chemistry*, **18**, 4392–4400.
93. Jensen, T.B., Henriksen, J.R., Rasmussen, B.E., Rasmussen, L.M., Andresen, T.L., Wengel, J. and Pasternak, A. (2011) Thermodynamic and biological evaluation of a thrombin binding aptamer modified with several unlocked nucleic acid (UNA) monomers and a 2'-C-piperazino-UNA monomer. *Bioorg. Med. Chem.*, **19**, 4739–4745.
94. Jing, N., Zhu, Q., Yuan, P., Li, Y., Mao, L. and Tweardy, D.J. (2006) Targeting signal transducer and activator of transcription 3 with G-quartet oligonucleotides: a potential novel therapy for head and neck cancer. *Mol. Cancer Ther.*, **5**, 279–286.

95. Weerasinghe,P., Li,Y., Guan,Y., Zhang,R., Tweardy,D.J. and Jing,N. (2008) T40214/PEI complex: a potent therapeutics for prostate cancer that targets STAT3 signaling. *Prostate*, **68**, 1430–1442.
96. Bates,P.J., Laber,D.A., Miller,D.M., Thomas,S.D. and Trent,J.O. (2009) Discovery and development of the G-rich oligonucleotide AS1411 as a novel treatment for cancer. *Exp. Mol. Pathol.*, **86**, 151–164.
97. D’Atri,V., Oliviero,G., Amato,J., Borbone,N., D’Errico,S., Mayol,L., Piccialli,V., Haider,S., Hoorelbeke,B., Balzarini,J., et al. (2012) New anti-HIV aptamers based on tetra-end-linked DNA G-quadruplexes: effect of the base sequence on anti-HIV activity. *Chem. Commun. (Camb)*, **48**, 9516–9518.
98. Pedersen,E.B., Nielsen,J.T., Nielsen,C. and Filichev,V. V (2011) Enhanced anti-HIV-1 activity of G-quadruplexes comprising locked nucleic acids and intercalating nucleic acids. *Nucleic Acids Res.*, **39**, 2470–2481.
99. Mukundan,V.T., Do,N.Q. and Phan,A.T. (2011) HIV-1 integrase inhibitor T30177 forms a stacked dimeric G-quadruplex structure containing bulges. *Nucleic Acids Res.*, **39**, 8984–8991.
100. Murakami,K., Nishikawa,F., Noda,K., Yokoyama,T. and Nishikawa,S. (2008) Anti-bovine prion protein RNA aptamer containing tandem GGA repeat interacts both with recombinant bovine prion protein and its beta isoform with high affinity. *Prion*, **2**, 73–80.
101. Petraccone,L., Fotticchia,I., Cummaro,A., Pagano,B., Ginnari-Satriani,L., Haider,S., Randazzo,A., Novellino,E., Neidle,S. and Giancola,C. (2011) The triazatruxene derivative azatrux binds to the parallel form of the human telomeric G-quadruplex under molecular crowding conditions: biophysical and molecular modeling studies. *Biochimie*, **93**, 1318–1327.
102. Wang,Z.-F., Li,M.-H., Hsu,S.-T.D. and Chang,T.-C. (2014) Structural basis of sodium-potassium exchange of a human telomeric DNA quadruplex without topological conversion. *Nucleic Acids Res.*, **42**, 4723–4733.
103. Groves,P. and Webba da Silva,M. (2010) Rapid stoichiometric analysis of G-quadruplexes in solution. *Chemistry*, **16**, 6451–6453.
104. D’Atri,V., Borbone,N., Amato,J., Gabelica,V., D’Errico,S., Piccialli,G., Mayol,L. and Oliviero,G. (2013) DNA-based nanostructures: The effect of the base sequence on octamer formation from d(XGGYGGT) tetramolecular G-quadruplexes. *Biochimie*, **99**, 119-128.
105. Petraccone,L., Erra,E., Esposito,V., Randazzo,A., Galeone,A., Barone,G. and Giancola,C. (2005) Biophysical properties of quadruple helices of modified human telomeric DNA. *Biopolymers*, **77**, 75–85.

106. Li, M.-H., Wang, Z.-F., Kuo, M.H.-J., Hsu, S.-T.D. and Chang, T.-C. (2014) Unfolding kinetics of human telomeric G-quadruplexes studied by NMR spectroscopy. *J. Phys. Chem. B*, **118**, 931–936.
107. Do, N.Q. and Phan, A.T. (2012) Monomer-dimer equilibrium for the 5'-5' stacking of propeller-type parallel-stranded G-quadruplexes: NMR structural study. *Chemistry*, **18**, 14752–14759.
108. Trajkovski, M., Webba da Silva, M. and Plavec, J. (2012) Unique structural features of interconverting monomeric and dimeric G-quadruplexes adopted by a sequence from the intron of the N-myc gene. *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 4132–4141.
109. Webba da Silva, M. (2007) NMR methods for studying quadruplex nucleic acids. *Methods*, **43**, 264–277.
110. Adrian, M., Heddi, B. and Phan, A.T. (2012) NMR spectroscopy of G-quadruplexes. *Methods*, **57**, 11–24.
111. Amrane, S., Adrian, M., Heddi, B., Serero, A., Nicolas, A., Mergny, J. and Phan, A.T. (2012) Formation of pearl-necklace monomeric G-quadruplexes in the human CEB25 minisatellite. *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 5807–5816.
112. Phan, A.T., Kuryavyi, V., Ma, J.-B., Faure, A., Andréola, M.-L. and Patel, D.J. (2005) An interlocked dimeric parallel-stranded DNA quadruplex: a potent inhibitor of HIV-1 integrase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **102**, 634–639.
113. Phan, A.T., Modi, Y.S. and Patel, D.J. (2004) Propeller-type parallel-stranded G-quadruplexes in the human c-myc promoter. *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 8710–8716.
114. Ambrus, A., Chen, D., Dai, J., Jones, R.A. and Yang, D. (2005) Solution structure of the biologically relevant G-quadruplex element in the human c-MYC promoter. Implications for G-quadruplex stabilization. *Biochemistry*, **44**, 2048–2058.
115. Phan, A.T., Kuryavyi, V., Luu, K.N. and Patel, D.J. (2007) Structure of two intramolecular G-quadruplexes formed by natural human telomere sequences in K⁺ solution. *Nucleic Acids Res.*, **35**, 6517–6525.
116. Do, N.Q., Lim, K.W., Teo, M.H., Heddi, B. and Phan, A.T. (2011) Stacking of G-quadruplexes: NMR structure of a G-rich oligonucleotide with potential anti-HIV and anticancer activity. *Nucleic Acids Res.*, **39**, 9448–9457.
117. Hu, L., Lim, K.W., Bouaziz, S. and Phan, A.T. (2009) Giardia telomeric sequence d(TAGGG)₄ forms two intramolecular G-quadruplexes in K⁺ solution: effect of loop length and sequence on the folding topology. *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 16824–16831.
118. Kuryavyi, V., Phan, A.T. and Patel, D.J. (2010) Solution structures of all parallel-stranded monomeric and dimeric G-quadruplex scaffolds of the human c-kit2 promoter. *Nucleic Acids Res.*, **38**, 6757–6773.

119. Lim,K.W., Lacroix,L., Yue,D.J.E., Lim,J.K.C., Lim,J.M.W. and Phan,A.T. (2010) Coexistence of two distinct G-quadruplex conformations in the hTERT promoter. *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 12331–12342.
120. Phan,A.T. and Patel,D.J. (2003) Two-repeat human telomeric d(TAGGGTTAGGGT) sequence forms interconverting parallel and antiparallel G-quadruplexes in solution: distinct topologies, thermodynamic properties, and folding/unfolding kinetics. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 15021–15027.
121. Wijmenga,S.S. and Buuren,B.N.M. Van (1998) The use of NMR methods for conformational studies of nucleic acids. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **32**, 287–387.
122. Fürtig,B., Richter,C., Wöhnert,J. and Schwalbe,H. (2003) NMR spectroscopy of RNA. *Chembiochem*, **4**, 936–962.
123. Phan,A.T. (2001) Through-bond correlation of sugar and base protons in unlabeled nucleic acids. *J. Magn. Reson.*, **153**, 223–226.
124. Kettani,A., Kumar,A.R. and Patel,D.J. (1995) Solution Structure of a DNA Quadruplex Containing the Fragile X Syndrome Triplet Repeat. *J. Mol. Biol.*, **254**, 638–656.
125. Bouaziz,S., Kettani,A. and Patel,D.J. (1998) A K cation-induced conformational switch within a loop spanning segment of a DNA quadruplex containing G-G-G-C repeats. *J. Mol. Biol.*, **282**, 637–652.
126. Xu,Y., Ishizuka,T., Kimura,T. and Komiyama,M. (2010) A U-tetrad stabilizes human telomeric RNA G-quadruplex structure. *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 7231–7233.
127. Webba da Silva,M. (2003) Association of DNA quadruplexes through G:C:G:C tetrads. Solution structure of d(GCGGTGGAT). *Biochemistry*, **42**, 14356–14365.
128. Mergny,J.-L. and Lacroix,L. (2003) Analysis of Thermal Melting Curves. *Oligonucleotides*, **13**, 515–537.
129. Mergny,J.-L., Phan,A.T. and Lacroix,L. (1998) Following G-quartet formation by UV-spectroscopy. *FEBS Lett.*, **435**, 74–78.
130. Rachwal,P. a and Fox,K.R. (2007) Quadruplex melting. *Methods*, **43**, 291–301.
131. Smargiasso,N., Rosu,F., Hsia,W., Colson,P., Baker,E.S., Bowers,M.T., De Pauw,E. and Gabelica,V. (2008) G-quadruplex DNA assemblies: loop length, cation identity, and multimer formation. *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 10208–10216.
132. Martadinata,H. and Phan,A.T. (2014) Formation of a Stacked Dimeric G-Quadruplex Containing Bulges by the 5'-Terminal Region of Human Telomerase RNA (hTERC). *Biochemistry*, **53**, 1595–1600.

133. Aviñó,A., Portella,G., Ferreira,R., Gargallo,R., Mazzini,S., Gabelica,V., Orozco,M. and Eritja,R. (2013) Specific loop modifications of the thrombin-binding aptamer trigger the formation of parallel structures. *FEBS J.*, **281**, 1085–1099.
134. Endoh,T., Kawasaki,Y. and Sugimoto,N. (2013) Stability of RNA quadruplex in open reading frame determines proteolysis of human estrogen receptor α . *Nucleic Acids Res.*, **41**, 6222–6231.
135. Aviñó,A., Mazzini,S., Ferreira,R., Gargallo,R., Marquez,V.E. and Eritja,R. (2012) The effect on quadruplex stability of North-nucleoside derivatives in the loops of the thrombin-binding aptamer. *Bioorg. Med. Chem.*, **20**, 4186–4193.
136. Marusic,M., Veedu,R.N., Wengel,J. and Plavec,J. (2013) G-rich VEGF aptamer with locked and unlocked nucleic acid modifications exhibits a unique G-quadruplex fold. *Nucleic Acids Res.*, **41**, 9524–9536.
137. Mergny,J.-L., Li,J., Lacroix,L., Amrane,S. and Chaires,J.B. (2005) Thermal difference spectra: a specific signature for nucleic acid structures. *Nucleic Acids Res.*, **33**, e138.
138. Kypr,J., Kejnovská,I., Renciuk,D. and Vorlíčková,M. (2009) Circular dichroism and conformational polymorphism of DNA. *Nucleic Acids Res.*, **37**, 1713–1725.
139. Paramasivan,S., Rujan,I. and Bolton,P.H. (2007) Circular dichroism of quadruplex DNAs: applications to structure, cation effects and ligand binding. *Methods*, **43**, 324–331.
140. Gray,D.M., Wen,J., Gray,C.W., Repges,R., Repges,C. and Raabe,G. (2008) Measured and Calculated CD Spectra of G-Quartets Stacked with the Same or Opposite Polarities. *Chirality*, **440**, 431–440.
141. Karsisiotis,A.I., Hessari,N.M., Novellino,E., Spada,G.P., Randazzo,A. and Webba da Silva,M. (2011) Topological characterization of nucleic acid G-quadruplexes by UV absorption and circular dichroism. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **50**, 10645–10648.
142. Randazzo,A., Spada,G.P. and Webba da Silva,M. (2013) Circular dichroism of quadruplex structures. *Top. Curr. Chem.*, **330**, 67–86.
143. Vorlíčková,M., Kejnovská,I., Sagi,J., Renčiuk,D., Bednářová,K., Motlová,J. and Kypr,J. (2012) Circular dichroism and guanine quadruplexes. *Methods*, **57**, 64–75.
144. Włodarczyk,A., Grzybowski,P., Patkowski,A. and Dobek,A. (2005) Effect of ions on the polymorphism, effective charge, and stability of human telomeric DNA. Photon correlation spectroscopy and circular dichroism studies. *J. Phys. Chem. B*, **109**, 3594–3605.
145. Galezowska,E., Gluszynska,A. and Juskowiak,B. (2007) Luminescence study of G-quadruplex formation in the presence of Tb^{3+} ion. *J. Inorg. Biochem.*, **101**, 678–685.

146. Guédin,A., De Cian,A., Gros,J., Lacroix,L. and Mergny,J.-L. (2008) Sequence effects in single-base loops for quadruplexes. *Biochimie*, **90**, 686–696.
147. Guédin,A., Gros,J., Alberti,P. and Mergny,J.-L. (2010) How long is too long? Effects of loop size on G-quadruplex stability. *Nucleic Acids Res.*, **38**, 7858–7868.
148. Dembska,A. and Juskowiak,B. (2010) Effect of metal cations on the fluorescence lifetimes of pyrene-labeled G-quadruplex probes. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, **212**, 36–42.
149. Hayashida,H., Paczesny,J., Juskowiak,B. and Takenaka,S. (2008) Interactions of sodium and potassium ions with oligonucleotides carrying human telomeric sequence and pyrene moieties at both termini. *Bioorg. Med. Chem.*, **16**, 9871–9881.
150. Li,Z., Lech,C.J. and Phan,A.T. (2014) Sugar-modified G-quadruplexes: effects of LNA-, 2'F-RNA- and 2'F-ANA-guanosine chemistries on G-quadruplex structure and stability. *Nucleic Acids Res.*, **42**, 4068–4079.
151. Joachimi,A., Benz,A. and Hartig,J.S. (2009) A comparison of DNA and RNA quadruplex structures and stabilities. *Bioorg. Med. Chem.*, **17**, 6811–6815.
152. Rosu,F., Gabelica,V., Houssier,C., Colson,P. and Pauw,E. De (2002) Triplex and quadruplex DNA structures studied by electrospray mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **16**, 1729–1736.
153. Rosu,F., Gabelica,V., Poncelet,H. and De Pauw,E. (2010) Tetramolecular G-quadruplex formation pathways studied by electrospray mass spectrometry. *Nucleic Acids Res.*, **38**, 5217–5225.
154. Cui,X. and Yuan,G. (2011) Formation and recognition of G-quadruplex in promoter of c-myc oncogene by electrospray ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, **46**, 849–855.
155. Joly,L., Rosu,F. and Gabelica,V. (2012) d(TG(n)T) DNA sequences do not necessarily form tetramolecular G-quadruplexes. *Chem. Commun. (Camb)*, **48**, 8386–8388.
156. Gabelica,V., Baker,E.S., Teulade-Fichou,M.-P., De Pauw,E. and Bowers,M.T. (2007) Stabilization and structure of telomeric and c-myc region intramolecular G-quadruplexes: the role of central cations and small planar ligands. *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 895–904.
157. Rosu,F., De Pauw,E. and Gabelica,V. (2008) Electrospray mass spectrometry to study drug-nucleic acids interactions. *Biochimie*, **90**, 1074–1087.
158. Li,H., Yuan,G. and Du,D. (2008) Investigation of formation, recognition, stabilization, and conversion of dimeric G-quadruplexes of HIV-1 integrase inhibitors by electrospray ionization mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **19**, 550–559.

159. Amato,J., Oliviero,G., De Pauw,E. and Gabelica,V. (2009) Hybridization of short complementary PNAs to G-quadruplex forming oligonucleotides: An electrospray mass spectrometry study. *Biopolymers*, **91**, 244–255.
160. Amato,J., Pagano,B., Borbone,N., Oliviero,G., Gabelica,V., Pauw,E. De, D'Errico,S., Piccialli,V., Varra,M., Giancola,C., et al. (2011) Targeting G-quadruplex structure in the human c-Kit promoter with short PNA sequences. *Bioconjug. Chem.*, **22**, 654–663.
161. Ferreira,R., Marchand,A. and Gabelica,V. (2012) Mass spectrometry and ion mobility spectrometry of G-quadruplexes. A study of solvent effects on dimer formation and structural transitions in the telomeric DNA sequence d(TAGGGTTAGGGT). *Methods*, **57**, 56–63.
162. Gabelica,V., Rosu,F. and De Pauw,E. (2009) A simple method to determine electrospray response factors of noncovalent complexes. *Anal. Chem.*, **81**, 6708–6715.
163. Yuan,G., Zhang,Q., Zhou,J. and Li,H. (2011) Mass spectrometry of G-quadruplex DNA: formation, recognition, property, conversion, and conformation. *Mass Spectrom. Rev.*, **30**, 1121–1142.
164. Gabelica,V. (2010) Determination of equilibrium association constants of ligand-DNA complexes by electrospray mass spectrometry. *Methods Mol. Biol.*, **613**, 89–101.
165. Baker,E.S., Bernstein,S.L. and Bowers,M.T. (2005) Structural characterization of G-quadruplexes in deoxyguanosine clusters using ion mobility mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **16**, 989–997.
166. Arcella,A., Portella,G., Ruiz,M.L., Eritja,R., Vilaseca,M., Gabelica,V. and Orozco,M. (2012) Structure of triplex DNA in the gas phase. *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 6596–6606.
167. Burmistrova,A., Gabelica,V., Duwez,A.-S. and De Pauw,E. (2013) Ion mobility spectrometry reveals duplex DNA dissociation intermediates. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **24**, 1777–1786.
168. Marchand,A. and Gabelica,V. (2014) Native electrospray mass spectrometry of DNA G-quadruplexes in potassium solution. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **25**, 1146–1154.
169. Rosu,F., Gabelica,V., Joly,L., Grégoire,G. and De Pauw,E. (2010) Zwitterionic i-motif structures are preserved in DNA negatively charged ions produced by electrospray mass spectrometry. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **12**, 13448–13454.
170. Baker,E.S., Bernstein,S.L., Gabelica,V., De Pauw,E. and Bowers,M.T. (2006) G-quadruplexes in telomeric repeats are conserved in a solvent-free environment. *Int. J. Mass Spectrom.*, **253**, 225–237.
171. Gellert,M., Lipsett,M.N. and Davies,D.R. (1962) Helix formation by guanylic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **48**, 2013–2018.

172. Campbell,N.H. and Parkinson,G.N. (2007) Crystallographic studies of quadruplex nucleic acids. *Methods*, **43**, 252–263.
173. Spindler,L., Drevensek-Olenik,I., Copic,M., Cerar,J., Skerjanc,J. and Mariani,P. (2004) Dynamic light scattering and ³¹P NMR study of the self-assembly of deoxyguanosine 5'-monophosphate: the effect of added salt. *Eur. Phys. J. E. Soft Matter*, **13**, 27–33.
174. Mariani,P., Spinozzi,F., Federiconi,F., Amenitsch,H., Spindler,L. and Drevensek-Olenik,I. (2009) Small angle X-ray scattering analysis of deoxyguanosine 5'-monophosphate self-assembling in solution: nucleation and growth of G-quadruplexes. *J. Phys. Chem. B*, **113**, 7934–7944.
175. Mariani,P., Spinozzi,F., Federiconi,F., Ortore,M.G., Amenitsch,H., Spindler,L. and Drevensek-Olenik,I. (2010) Guanosine quadruplexes in solution: a small-angle x-ray scattering analysis of temperature effects on self-assembling of deoxyguanosine monophosphate. *J. Nucleic Acids*, **2010**, 1–10.
176. Spindler,L., Rigler,M., Drevensek-Olenik,I., Ma'ani Hessari,N. and Webba da Silva,M. (2010) Effect of base sequence on g-wire formation in solution. *J. Nucleic Acids*, **2010**, 1–8.
177. Ilc,T., Šket,P., Plavec,J., Webba da Silva,M., Drevenšek-Olenik,I. and Spindler,L. (2013) Formation of G-Wires: The Role of G:C-Base Pairing and G-Quartet Stacking. *J. Phys. Chem. C*, **117**, 23208–23215.
178. Kozak,M., Wlodarczyk,A. and Dobek,A. (2009) Synchrotron radiation small angle scattering studies of d(TTAGGG)₄ oligomer in solution. *Radiat. Phys. Chem.*, **78**, S134–S136.
179. Uddin,M.K., Kato,Y., Takagi,Y., Mikuma,T. and Taira,K. (2004) Phosphorylation at 5' end of guanosine stretches inhibits dimerization of G-quadruplexes and formation of a G-quadruplex interferes with the enzymatic activities of DNA enzymes. *Nucleic Acids Res.*, **32**, 4618–4629.
180. Nishikawa,F., Murakami,K., Matsugami,A., Katahira,M. and Nishikawa,S. (2009) Structural studies of an RNA aptamer containing GGA repeats under ionic conditions using microchip electrophoresis, circular dichroism, and 1D-NMR. *Oligonucleotides*, **19**, 179–190.
181. Lipay,J.M. and Mihailescu,M.-R. (2009) NMR spectroscopy and kinetic studies of the quadruplex forming RNA r(UGGAGGU). *Mol. Biosyst.*, **5**, 1347–1355.
182. Balthasart,F., Plavec,J. and Gabelica,V. (2013) Ammonium ion binding to DNA G-quadruplexes: do electrospray mass spectra faithfully reflect the solution-phase species? *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **24**, 1–8.
183. Parkinson,G.N., Lee,M.P.H. and Neidle,S. (2002) Crystal structure of parallel quadruplexes from human telomeric DNA. *Nature*, **417**, 876–880.

184. Mergny, J.-L., Gros, J., DE CIAN, A., Bourdoncle, A., Rosu, F., Saccà, B., Guittat, L., Amrane, S., Mills, M., Alberti, P., et al. (2006) Energetics, Kinetics and Dynamics of Quadruplex Folding. In Neidle, S., Balasubramanian, S. (eds), *Quadruplex Nucleic Acids*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 31–80.
185. Liu, H., Kugimiya, A., Matsugami, A., Katahira, M. and Uesugi, S. (2002) Quadruplex structures of RNA 14-mer, r(GGAGGUUUUGGAGG) and DNA 14-mer, d(GGAGGTTTTGGAGG). *Nucleic acids Res. Suppl. No.2*, **2**, 177–178.
186. Searle, M.S., Williams, H.E.L., Gallagher, C.T., Grant, R.J. and Stevens, M.F.G. (2004) Structure and K⁺ ion-dependent stability of a parallel-stranded DNA quadruplex containing a core A-tetrad. *Org. Biomol. Chem.*, **2**, 810–812.
187. Wyszko, E., Szymański, M., Zeichhardt, H., Müller, F., Barciszewski, J. and Erdmann, V. (2013) Spiegelzymes: sequence specific hydrolysis of L-RNA with mirror image hammerhead ribozymes and DNAzymes. *PLoS One*, **8**, e54741.
188. Chang, T., Qi, C., Meng, J., Zhang, N., Bing, T., Yang, X., Cao, Z. and Shangguan, D. (2013) General cell-binding activity of intramolecular G-quadruplexes with parallel structure. *PLoS One*, **8**, e62348.
189. Tseng, T.-Y., Wang, Z.-F., Chien, C.-H. and Chang, T.-C. (2013) In-cell optical imaging of exogenous G-quadruplex DNA by fluorogenic ligands. *Nucleic Acids Res.*, **41**, 10605–10618.
190. Beaucage, S.L. and Caruthers, M.H. (1981) Deoxynucleoside phosphoramidites—A new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis. *Tetrahedron Lett.*, **22**, 1859–1862.
191. Xia, T., SantaLucia, J., Burkard, M.E., Kierzek, R., Schroeder, S.J., Jiao, X., Cox, C. and Turner, D.H. (1998) Thermodynamic parameters for an expanded nearest-neighbor model for formation of RNA duplexes with Watson-Crick base pairs. *Biochemistry*, **37**, 14719–14735.
192. Kierzek, E. and Kierzek, R. (2003) The synthesis of oligoribonucleotides containing N⁶-alkyladenosines and 2-methylthio-N⁶-alkyladenosines via post-synthetic modification of precursor oligomers. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 4461–4471.
193. Sosnick, T.R., Fang, X. and Shelton, V.M. (2000) Application of Circular Dichroism to Study RNA Folding Transitions. *Methods Enzymol.*, **317**, 393–409.
194. Hoult, D. (1976) Solvent peak saturation with single phase and quadrature fourier transformation. *J. Magn. Reson.*, **21**, 337–347.
195. Piotto, M., Saudek, V. and Sklenar, V. (1992) Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *J. Biomol. NMR*, **2**, 661–665.
196. Hwang, T.-L. and Shaka, A.J. (1995) Water suppression that works. Excitation sculpting using arbitrary waveforms and pulsed field gradients. *J. Magn. Reson. Ser. A*, **112**, 275–279.

9. STRESZCZENIE

Rozprawa doktorska poświęcona jest kwadrupleksom RNA zbudowanym z dwóch i czterech trinukleotydydowych powtórzeń AGG i UGG. Kwadrupleks jest motywem strukturalnym występującym zarówno w cząsteczkach DNA, jak i RNA, których sekwencje są bogate w reszty guanozyny. Dotychczasowe badania strukturalne kwadrupleksów, wykorzystujące technikę NMR, skupiają się głównie wokół cząsteczek DNA. Do końca października 2014 roku w bazie danych RCSB PDB (ang. *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics; Protein Data Bank*) zdeponowanych zostało 100 struktur kwadrupleksów DNA i tylko 5 struktur kwadrupleksów RNA, ustalonych metodami spektroskopii NMR. Ta niewielka liczba poznanych z rozdzielczością atomową struktur obrazuje zarówno poziom obecnej wiedzy, jak i ogromny potencjał dla tego typu badań.

Głównym celem niniejszej dysertacji było ustalenie pofałdowania cząsteczek RNA zbudowanych z trinukleotydydowych powtórzeń AGG i UGG. Wszystkie przebadane cząsteczki RNA istnieją w roztworze jako równoległe kwadrupleksy, niezależnie od stężenia RNA, czy zastosowanego kationu jednowartościowego. Jednakże pojedynczą formę przyjmują jedynie cząsteczki $(AGG)_2A$ i $p(UGG)_2U$ w roztworze zawierającym kationy potasu. Ustalono, że cząsteczki te tworzą dimery czteroniciowych kwadrupleksów. W zależności od rodzaju powtórzenia, w strukturach tych oprócz typowych G-tetrad zidentyfikowano charakterystyczne motywy heksady $A:(G:G:G:G):A$ oraz U-tetrad jak również odmienne mechanizmy dimeryzacji.

W trakcie realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej, na podstawie badań z wykorzystaniem spektroskopii NMR, UV-Vis, CD oraz spektrometrii mas, ustalono również, że badane cząsteczki przyjmują w roztworze w obecności kationów potasu i amonu zazwyczaj takie same struktury, natomiast kationy sodu promują powstawanie odmiennej formy kwadrupleksu. Zarejestrowano widma 1H NMR 0.01 mM stężenia RNA, które jest porównywalne z tym stosowanym do badań CD i UV-Vis. Wykonano także pomiary widm 1H NMR cząsteczek zbudowanych z dwóch lub czterech powtórzeń AGG lub UGG w ekstrakcie z komórek HeLa, sprawdzając wpływ środowiska komórkowego na strukturę badanych kwadrupleksów. Wykazano także, że cząsteczki zbudowane z czterech powtórzeń AGG lub UGG mogą przenikać przez błonę komórkową i lokalizują się zarówno w cytoplazmie, jak i w jądrze komórkowym.

ABSTRACT

The dissertation is devoted to the RNA quadruplexes composed of two and four AGG and UGG trinucleotide repeats. Quadruplex is a structural motif characteristic for DNA and RNA sequences rich in guanosine residues. In general, the NMR structural studies are focused mainly on DNA quadruplexes. Currently, the RCSB PDB data base contains 100 DNA quadruplex structures and only 5 RNA quadruplex structures obtained using methods of NMR spectroscopy. This small number of known RNA quadruplex structures reflects the current level of knowledge as well as a big potential for this type of research.

The main aim of this work was the determination of the fold of RNA molecules composed of AGG and UGG repeats. All of the studied molecules exist as a quadruplexes in solution, regardless of the RNA concentration or the type of monovalent cation. Nevertheless, only (AGG)₂A and p(UGG)₂U molecules adopt single forms in a solution containing potassium cations. For these molecules the structural models were proposed.

It was also shown, using NMR, UV-Vis, CD spectroscopies and mass spectrometry, that the quadruplex folds in the solution containing potassium or ammonium cations are usually similar, but the sodium cations promote the formation of different quadruplex structures. Additionally, the ¹H NMR spectra were collected for very low RNA concentration, 0.01 mM, typically used for the UV-Vis, CD or ESI-IMS-MS experiments. For the molecules composed of two and four AGG or UGG trinucleotide repeats the ¹H NMR spectra were also recorded in the HeLa cells extract in order to test the influence of the cellular environment on the quadruplex folding. Furthermore, it was demonstrated that the molecules containing four AGG or UGG repeats are transported through the cell membrane and are localized in both the cytoplasm and the nucleus.

10. FINANSOWANIE



Projekt „*Kwadrupleksy RNA zbudowane z powtórzeń trinukleotydowych AGG, CGG i UGG*” - N N301 707040



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



SAMORZĄD WOJEWÓDZTWA
WIELKOPOLSKIEGO
WOJEWÓDZKI URZĄD PRACY
W POZNANIU

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



Projekt „*Wsparcie stypendialne dla doktorantów na kierunkach uznanych za strategiczne z punktu widzenia rozwoju Wielkopolski*” realizowany dzięki wsparciu Unii Europejskiej, Europejskiego Funduszu Społecznego, w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki.



Projekt „*Stoichiometry and kinetics of RNA G-quadruplexes composed of AGG, CGG and UGG trinucleotide repeats*” - COST-STSM-MP0802-11227



**INNOWACYJNA
GOSPODARKA**
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



INSTYTUT CHEMII BIOORGANICZNEJ
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
POZNAŃ

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO



Projekt: „*Zwiększenie potencjału badawczego Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w zakresie analizy strukturalnej biomolekuł metodami NMR i krystalografii*”; Nr umowy: UDA-POIG.02.01.00-30-182/09

ZAŁĄCZNIKI