

Łukasz Popena

**ANALIZA STRUKTURALNA
WYBRZUSZONYCH DUPEKSÓW RNA METODAMI
BIOMOLEKULARNEJ SPEKTROSKOPII NMR**

**Pracę wykonano w Instytucie Chemii Bioorganicznej
Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu**

Promotor pracy: dr hab. Zofia Gdaniec

**Pracę przedstawiono
Radzie Naukowej
Instytutu Chemii Bioorganicznej
Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu
celem uzyskania stopnia
doktora nauk chemicznych**

Poznań, 2008

Mojemu Tacie...

Pani Doc. dr hab. Zofii Gdaniec serdecznie dziękuję za wskazanie niezwykle interesującego tematu pracy, życzliwość okazaną w trakcie jej realizacji i nieocenioną pomoc.

Panu Prof. dr hab. Ryszardowi W. Adamiakowi jestem wdzięczny za poświęcenie swojego czasu, cenne rady i motywowanie mnie do pracy.

Dr Mariuszowi Popenzie dziękuję za okazaną pomoc i rady udzielone na każdym etapie pracy.

Dziękuję również Pani mgr Grażynie Dominiak za syntezę związków, które były przedmiotem moich badań, oraz wszystkim członkom Pracowni za owocną współpracę i pomoc podczas wykonywania niniejszej pracy.

Specjalne podziękowania pragnę złożyć mojej Żonie za daną mi pomoc, wsparcie, za to, że nadaje wartość mojemu życiu i mojej pracy.

SPIS TREŚCI

I. WPROWADZENIE	7
II. CEL PRACY	9
III. CZĘŚĆ LITERATUROWA	11
1. Budowa kwasu rybonukleinowego (RNA)	11
2. Wybrane drugo- i trzeciorzędowe motywy strukturalne RNA	14
2.1. Podwójna helisa (ang. <i>double helix</i>)	15
2.2. Wybrzuszenia (ang. <i>bulges</i>)	18
2.3. Pętle wewnętrzne (ang. <i>internal loops</i>).....	19
2.4. Struktura spinki do włosów (ang. <i>hairpin</i>)	19
2.5. Platformy adenozykowe (ang. <i>adenosine platforms</i>).....	21
2.6. Oddziaływanie trzech zasad (ang. <i>base triples</i>).....	22
2.7. Trój- i czteroczłonowe styki (ang. <i>junctions</i>)	23
2.8. Pseudowęzły (ang. <i>pseudoknots</i>).....	24
3. Spektroskopia NMR w badaniach strukturalnych kwasów nukleinowych.....	25
4. Metody obliczeniowe spektroskopii NMR w zastosowaniu do badań struktury kwasów nukleinowych	27
4.1. Więzy strukturalne	27
4.1.1. Jądrowy efekt Overhausera. Więzy na odległości międzyprotonowe	28
4.1.2. Sprzężenia skalarne. Więzy na kąty torsyjne	29
4.1.3. Resztkowe sprzężenia dipolowe. Więzy orientacyjne dalekiego zasięgu	32
4.1.4. Inne typy więzów. Dodatkowe źródła informacji strukturalnych	33
4.2. Algorytmy obliczeniowe	34
4.2.1. Metoda DG	35
4.2.2. Metody restryktywnej dynamiki molekularnej.....	36
4.2.2.1. Restryktywna dynamika molekularna w przestrzeni kartezjańskiej.....	36
4.2.2.2. Restryktywna dynamika molekularna w przestrzeni kątów torsyjnych	39
4.2.2.3. Metoda symulowanego wyżarzania (SA, ang. <i>simulated annealing</i>).....	40
4.3. Kryteria oceny otrzymanych struktur - precyzja i dokładność	41
5. Parametry helikalne.....	44
IV. OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ WŁASNYCH	48
1. Część eksperymentalna	48

1.1. Przygotowanie próbek.....	48
1.2. Opis stosowanych w badaniach technik spektroskopii NMR.....	49
2. Badanie wpływu niesparowanych reszt adenozynowych na strukturę dupleksów RNA.....	54
2.1. Ustalenie struktury referencyjnego dupleksu RNA	54
2.1.1. Analiza widm NMR dupleksu referencyjnego (I)	54
2.1.1.1. Analiza widm ^1H NMR w D_2O	54
2.1.1.2. Analiza widm ^1H NMR w $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$	65
2.1.1.3. Analiza widm ^{13}C NMR	68
2.1.1.4. Analiza widm ^{31}P NMR.....	70
2.1.2. Analiza konformacyjna. Wyznaczenie więzów strukturalnych (I).....	72
2.1.2.1. Pomiar wielkości efektów NOE	72
2.1.2.2. Analiza konformacji pierścieni cukrowych	73
2.1.2.3. Analiza kątów torsyjnych wokół wiązań N-glikozydowych	75
2.1.2.4. Analiza kątów torsyjnych w łańcuchach fosforocukrowych	76
2.1.3. Restryktywna dynamika molekularna (I)	78
2.1.4. Analiza przestrzeni konformacyjnej rodziny struktur (I)	81
2.2. Badania strukturalne dupleksu II	83
2.2.1. Analiza strukturalna w oparciu o widma NMR (II)	83
2.2.2. Analiza konformacyjna. Wyznaczenie więzów strukturalnych (II)	91
2.2.3. Restryktywna dynamika molekularna (II)	93
2.2.4. Analiza przestrzeni konformacyjnej rodziny struktur (II)	94
2.3. Badania strukturalne dupleksu III	98
2.3.1. Analiza strukturalna w oparciu o widma NMR (III)	98
2.3.2. Analiza konformacyjna. Wyznaczenie więzów strukturalnych (III).....	103
2.3.3. Restryktywna dynamika molekularna (III).....	105
2.3.4. Analiza przestrzeni konformacyjnej otrzymanej rodziny struktur (III).....	108
2.4. Badania strukturalne dupleksu IV	111
2.4.1. Analiza strukturalna w oparciu o widma NMR (IV).....	111
2.5. Podsumowanie. Analiza kątów torsyjnych, parametrów pofałdowania pierścieni cukrowych oraz parametrów helikalnych struktur I, II i III.....	115
3. Badania duplesów RNA zawierających jeden nukleotydowe wybrzuszenia (A lub U)	122
3.1. Badania strukturalne dupleksu V	122

3.1.1. Analiza strukturalna w oparciu o widma NMR (V)	122
3.1.2. Analiza konformacyjna. Wyznaczenie więzów strukturalnych (V).....	130
3.1.3. Restryktywna dynamika molekularna (V).....	132
3.1.4. Analiza przestrzeni konformacyjnej rodziny struktur (V).....	135
3.2. Badania strukturalne dupleksu VI.....	137
3.2.1. Analiza strukturalna w oparciu o widma NMR (VI).....	137
3.2.2. Analiza konformacyjna. Wyznaczenie więzów strukturalnych (VI).....	142
3.2.3. Restryktywna dynamika molekularna (VI)	143
3.2.4. Analiza przestrzeni konformacyjnej rodziny struktur (VI)	145
3.3. Podsumowanie. Analiza kątów torsyjnych, parametrów pofałdowania pierścieni cukrowych oraz parametrów helikalnych struktur V i VI.....	147
V. DYSKUSJA UZYSKANYCH WYNIKÓW	154
VI. PODSUMOWANIE I WNIOSKI.....	162
VI. LITERATURA	165
ANEKS 1. Oznaczenie wybranych, stosowanych w pracy skrótów	179
ANEKS 2. Laboratorium Wirtualne Spektroskopii Magnetycznego Rezonansu Jądrowego.....	180
ANEKS 3. Wykaz publikacji i komunikatów konferencyjnych	182
ANEKS 4. Więzy NOE wykorzystane podczas obliczeń strukturalnych	186
ANEKS 5. Pliki protokołu obliczeniowego	202

I. WPROWADZENIE

Liczba struktur kwasów nukleinowych (zarówno DNA jak i RNA) otrzymanych na podstawie danych krystalograficznych i NMR (~1800) zdeponowanych w bazie PDB¹ (*Protein Data Bank*; <http://www.rcsb.org/>) jest wciąż zdecydowanie mniejsza od ilości zdeponowanych w niej białek (~44000). Jest jednak wystarczająco duża, aby móc stwierdzić, że złożoność struktur RNA jest porównywalna do tej, jaka występuje dla białek. Cząsteczki RNA mogą tworzyć skomplikowane struktury drugo- i trzeciorzędowe, które są nierozdzielnie związane z ich funkcją *in vivo*². Fragmenty dwuniciowe składające się z ciągów par zasad Watsona-Cricka stanowią jedynie około 50% wszystkich reszt występujących w cząsteczkach RNA³. Trzeciorzędowe struktury RNA tworzą się drogą wewnątrzcząsteczkowych oddziaływań między charakterystycznymi domenami struktury drugorzędowej. Małe, powtarzalne i naturalnie występujące elementy strukturalne nazywamy „motywami RNA”. Wiele motywów strukturalnych cząsteczek RNA stanowią fragmenty, które są konformacyjnie labilne, a co za tym idzie, bardzo podatne na zmiany warunków środowiska.

Z uwagi na brak jednoznacznych reguł dotyczących oceny jakościowej struktur biomolekuł otrzymanych metodami spektroskopii NMR, są one nadal postrzegane jako mniej dokładne niż struktury krystalograficzne. Należy jednak podkreślić, że struktura badanej cząsteczki otrzymana w roztworze nie musi być identyczna z jej strukturą w kryształach. W szczególnych przypadkach struktura krystaliczna może być zdeterminowana obecnością sił upakowania. W nieobecności wspomnianych sił, cząsteczka białka czy kwasu nukleinowego może wykazywać znaczną dynamikę. Konsekwencją tego mogą być zmiany konformacyjne całej cząsteczki lub jej fragmentów, co oznacza, że przedstawienie jej za pomocą jednej tylko struktury przestrzennej może być często niewystarczające. Biomolekularna spektroskopia NMR jest jedyną metodą eksperymentalną pozwalającą na ustalenie współrzędnych atomowych makrocząsteczek w roztworze. Ma to duże znaczenie podczas rozwiązywania realnych zagadnień biochemicznych np. prób powiązania struktury cząsteczek z ich funkcją w komórce. Zaletą ustalania struktury kwasów nukleinowych metodami NMR jest możliwość rejestrowania funkcjonalnie istotnych zmian konformacyjnych cząsteczki, opis ich dynamiki, a także analiza procesów wiązania ligandów.

Już w 1985 roku zauważono, że w 16S rRNA z *Escherichia coli* aż 62% wszystkich reszt adeniny stanowią reszty niesparowane, podczas gdy jedynie około 30% reszt guanozyny, cytydyny i urydyny nie uczestniczy w tworzeniu par zasad Watsona-Cricka⁴. Przeprowadzona

w 2000 roku analiza porównawcza dla dużej liczby modeli bakteryjnych 16S i 23S rRNA potwierdziła tę niezwykłą skłonność reszt adeniny⁵. Stwierdzono, że reszty te uczestniczą w tworzeniu takich motywów strukturalnych jak np. platformy adenozynowe, zwroty U (ang. *U-turn*), stabilne pętle czteronukleotydowe, pętle wewnętrzne, wybrzuszenia (ang. *bulges*) czy też zakończenia trzonów helikalnych tandemowymi parami zasad G-A. Wybrzuszenia są najprostszymi, a jednocześnie jednymi z najczęściej występujących elementów strukturalnych, funkcjonalnie istotnych dla wielu cząsteczek RNA⁶. Obecnie wiadomo, że wiele wybruszeń uczestniczy nie tylko w procesie zwijania RNA, ale jest zaangażowanych w oddziaływanie RNA-RNA, RNA-białko⁷⁻⁹ oraz w rozpoznawaniu niskocząsteczkowych ligandów^{5,10-12}.

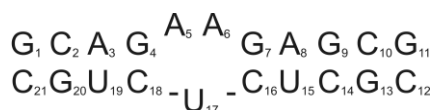
Znajomość konformacyjnych preferencji wybruszeń jest istotna dla zrozumienia procesu zwijania się RNA. Zauważono, że w strukturach krystalograficznych dupleksów RNA oraz dupleksów hybrydowych DNA-RNA, wybruszone reszty adeniny wystają na zewnątrz helisy biorąc udział w oddziaływaniach międzycząsteczkowych¹³⁻¹⁷. Sugeruje to, że jest to uprzywilejowana konformacja wybruszonej adenozyiny w ciele stałym. Taką samą orientację przyjmuje reszta adeniny w kryształach kompleksu RNA-białko, chociaż samo RNA w badaniach w roztworze wykazuje odmienną, bo schowaną do wnętrza helisy, konformację wybruszonej reszty¹⁸.

W literaturze toczy się dyskusja dotycząca zagadnienia, czy konformacja, w której wybruszone reszta wystaje na zewnątrz helisy stanowi jedynie efekt sił upakowania w kryształach, czy też jest to konformacja istniejąca również w roztworze, a w szczególności *in vivo*. Chociaż wiadomo, że ekspozycja aromatycznej zasady do roztworu jest energetycznie niekorzystna, to często uważa się, że konformacja ta nie jest jedynie wynikiem procesu krystalizacji. Dodatkowym argumentem używanym na potwierdzenie tej tezy jest wiele przykładów wystających na zewnątrz helisy niesparowanych zasad, najczęściej reszt adenozynowych, które zostały uznane za specyficzne miejsca oddziaływania z białkiem^{8,9,17,19,20}. Nie wiadomo jednak, w jaki sposób następuje rozpoznanie RNA-białko. Nadal pozostaje bez odpowiedzi pytanie, czy białko rozpoznaje wpierw miejsce, w którym reszta adeniny interkaluje pomiędzy sąsiednie pary zasad, a następnie oddziaływanie RNA-białko wymusza zmianę jej orientacji, czy to właśnie wystająca na zewnątrz helisy reszta stanowi miejsce rozpoznania. Dopiero dokładna analiza struktur cząsteczek RNA w stanie wolnym i w kompleksie z białkiem może dostarczyć tej odpowiedzi.

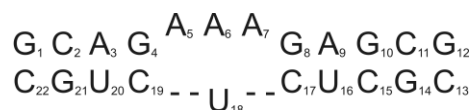
II. CEL PRACY

Celem mojej pracy było ustalenie metodami wysokorozdzielczej spektroskopii NMR konformacji wybruszonych reszt nukleotydowych oraz określenie wpływu jaki ich obecność wywiera na strukturę krótkich fragmentów RNA.

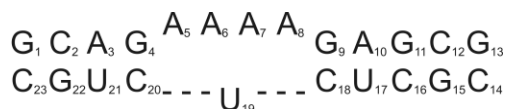
Obiektem moich badań były trzy dupleksy RNA zawierające odpowiednio dwie, trzy i cztery kolejne reszty adenozyne umieszczone naprzeciw jednej, komplementarnej do nich reszty urydyny. Zadaniem moim było także ustalenie, z którą z kolejnych reszt adenozyne asocjować będzie w tych dupleksach reszta urydyny:



II



III



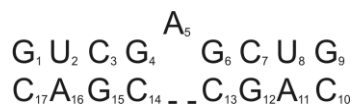
IV

Dla ilościowego określenia zmian strukturalnych wywołanych obecnością niesparowanych reszt adenozyne należało również ustalić strukturę przestrzenną dupleksu referencyjnego, w którym wszystkie pary zasad były typu Watsona-Cricka:

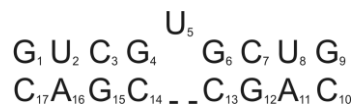


I

Dodatkowo w trakcie realizacji pracy doktorskiej zająłem się ustaleniem struktur przestrzennych dupleksów o strukturach drugorzędowych V i VI, które zawierały jednonukleotydowe wybrzuszenie adenozynowe i urydynowe ograniczone przez dwie pary zasad G:C.



V



VI

Bardzo ważnym elementem mojej pracy było również opracowanie protokołu komputerowego modelowania molekularnego z uwzględnieniem więzów NMR służącego do obliczeń strukturalnych.

Pracę wykonałem w Zespole Biomolekularnego NMR Pracowni Chemii Strukturalnej Kwasów Nukleinowych pod kierunkiem dr hab. Zofii Gdaniec. Badania prowadziłem w ramach następujących projektów badawczych:

- *Analiza strukturalna wybrzuszonych dupleksów RNA metodami biomolekularnej spektroskopii NMR*
projekt promotorski MNiSZW nr 2 P04A 033 30,
- *Budowa uniwersalnej architektury dla Laboratorium Wirtualnego*
projekt KBN nr 4 T11F 010 24.

W ramach drugiego z projektów finansowane były zarówno prowadzone przeze mnie badania dotyczące projektu Laboratorium Wirtualnego (Aneks 2), jak również trzy lata moich studiów doktoranckich.

Znaczna część wyników ujętych w rozprawie doktorskiej zawarta została w dwóch pracach:

- Popena, Ł.; Adamiak, R.W.; Gdaniec, Z.
Bulged adenosine influence on the RNA duplex conformation in solution.
Biochemistry, **2008**, 47 (18), 5059-5067.
- Popena, Ł.; Bielecki, Ł.; Gdaniec, Z.; Adamiak, R.W.
Structure and dynamics of adenosine bulged RNA duplex reveals formation of the dinucleotide platform in the C:G-A triple.
Arkivoc, **2008** – praca przyjęta do druku.

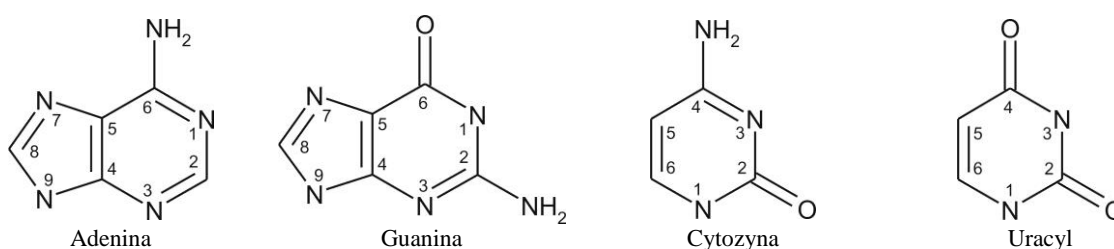
Pełny spis komunikatów oraz publikacji, których jestem współautorem zamieszczony jest na końcu pracy (Aneks 3).

III. CZĘŚĆ LITERATUROWA

1. Budowa kwasu rybonukleinowego (RNA)

Cząsteczka kwasu rybonukleinowego (RNA) jest biopolimerem zbudowanym z jednostek monomerycznych zwanych nukleotydami. W cząsteczkach RNA nukleotydy powiązane są ze sobą wiązaniami 5' - 3' fosfodiestrowymi między resztami cukrowymi tworząc polimeryczną strukturę szkieletu nukleotydowego. Utworzony w ten sposób łańcuch RNA wykazuje polarność – pierwszy nukleotyd z końca 5' posiada wolną grupę 5'-OH, natomiast ostatni (z końca 3') odznacza się wolną grupą 2',3'-cis diolową. Stąd przyjęto konwencję, że sekwencja reszt nukleotydowych, czyli struktura pierwszorzędowa cząsteczki, zapisywana jest zawsze w kierunku 5' => 3'.

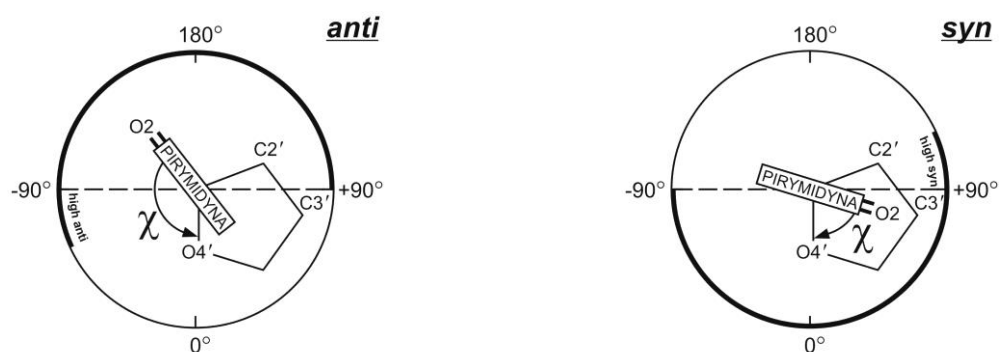
Każdy nukleotyd składa się z azotowej zasady heterocyklicznej (pochodnej puryny lub pirymidyny), cyklicznej formy cukru (β -D-rybofuranozy) oraz grupy fosforanowej (reszty kwasu ortofosforowego). W cząsteczkach RNA, reszta cukrowa związana jest w pozycji C1' z zasadą azotową wiązaniem N-glikozydowym, natomiast miejscem wiązania grupy fosforanowej jest atom tlenu O5' rybozy. Zasadami azotowymi występującymi w RNA są adenina, guanina, cytozyna oraz uracyl (Rys. 1). W przypadku pochodnych puryny, w wiązaniu glikozydowym uczestniczy atom azotu N9, natomiast pochodne pirymidyny łączą się z pierścieniem cukrowym przez atom azotu N1.



Rys. 1. Wzory strukturalne i sposób numeracji adeniny, guaniny, cytozyny i uracylu.

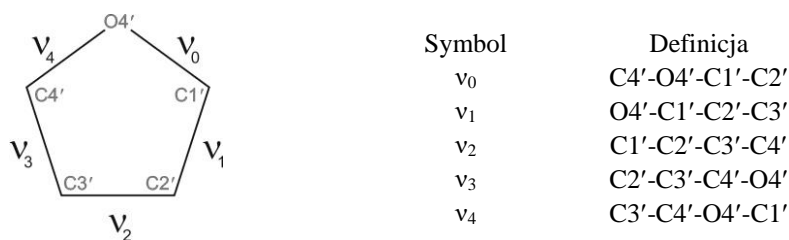
Położenie zasady heterocyklicznej względem pierścienia rybozy opisane jest za pomocą kąta torsyjnego χ . Kąt ten w nukleotydach purynowych zdefiniowany jest przez atomy O4'-C1'-N9-C4, natomiast w nukleotydach pirymidynowych określony jest przez atomy O4'-C1'-N1-C2. Rotacja wokół wiązania glikozydowego prowadzi do przejść konformacyjnych pomiędzy dwoma charakterystycznymi konformerami (Rys. 2). Konformację nukleotydu określa się jako *anti*, jeżeli nad pierścieniem cukrowym leży atom

C6 zasady pirymidynowej lub atom C8 zasady purynowej. W przeciwnym wypadku, tzn. gdy nad pierścieniem cukru znajduje się grupa karbonylowa przy atomie C2 zasady pirymidynowej, lub atom N3 układu purynowego, mówimy o konformacji *syn*. W większości poznanych struktur cząsteczek DNA i RNA dominującą formą jest konformacja *anti*. Konformacja *syn* spotykana jest na przykład w regionach jednoniciowych struktur typu pętli, w niekanonicznych parach zasad oraz w cząsteczkach Z-RNA²¹.



Rys. 2. Zakres kątów χ dla konformacji *anti* oraz *syn* na przykładzie nukleozydu pirymidynowego²².

Pięciocłonowy pierścień cukrowy w naturze nie występuje w formie planarnej, ponieważ konformacja taka jest sterycznie oraz energetycznie bardzo niekorzystna²³. Może on być pofałdowany w ten sposób, że cztery atomy pierścienia leżą w jednej płaszczyźnie a piąty znajduje się poza nią. Mówimy wówczas, że cukier przyjmuje konformację koperty (ang. *envelope*). Znacznie częściej spotykana jest sytuacja, gdy dwa atomy pierścienia wychylone są poza płaszczyznę wyznaczoną przez trzy pozostałe. W tym przypadku cukier znajduje się w konformacji półkrzesła (forma skręcona, ang. *twist*). Jeśli wychylony z płaszczyzny pierścienia atom leży po tej samej stronie co atom C5', to znajduje się on w pozycji *endo*, natomiast jeśli jest po stronie przeciwnej, to oznaczamy, że jest w pozycji *egzo*. Geometrię pierścienia cukrowego można opisać za pomocą pięciu endocyklicznych kątów torsyjnych v_i , których definicje podane zostały na rysunku 3.



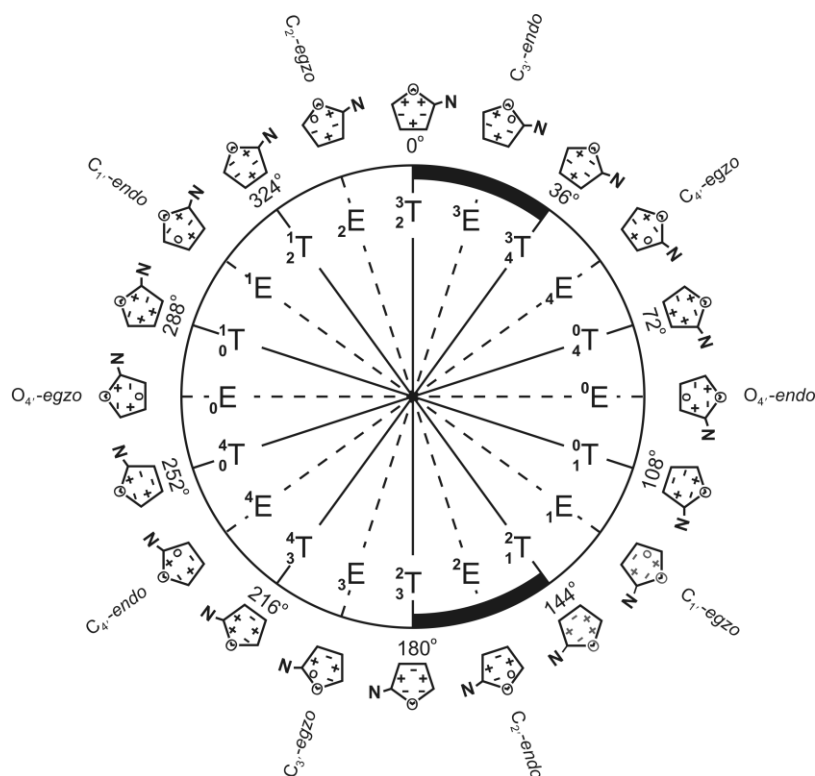
Rys. 3. Definicja kątów endocyklicznych pierścienia rybozy.

Ponieważ reszta cukrowa tworzy zamknięty układ pierścieniowy, dlatego kąty torsyjne ν_i są od siebie zależne. Stąd też konformację pierścienia rybozy można z dobrym przybliżeniem opisać za pomocą dwóch parametrów - kąta fazowego pseudorotacji (P), oraz amplitudy pofałdowania (ν_{max})^{24,25}. Kąt fazowy określa konformację pierścienia cukrowego, natomiast amplituda wyraża stopień pofałdowania tego pierścienia. Parametry P i ν_{max} zdefiniowane są odpowiednio przez równania (1) i (2).

$$\tan P = \frac{\nu_4 + \nu_1 - \nu_3 - \nu_0}{2\nu_2[\sin(\pi/5) + \sin(2\pi/5)]}, \quad (1)$$

$$\nu_{max} = \frac{\nu_0}{\cos(P)}. \quad (2)$$

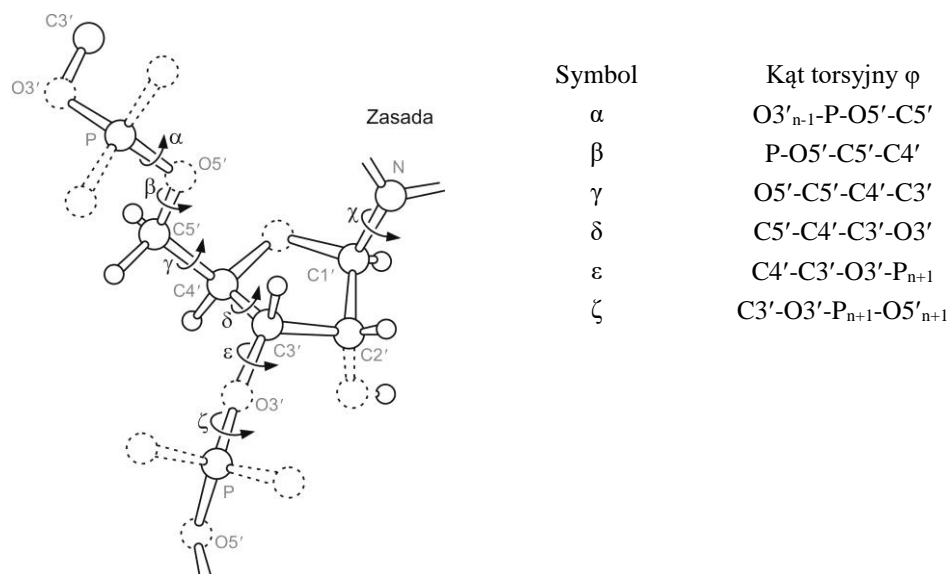
Reszta rybozy charakteryzuje się znaczną swobodą konformacyjną wynikającą z pewnej możliwości rotacji wokół pojedynczych wiązań pierścienia²⁶. Przejścia konformacyjne, ograniczone obecnością podstawników na atomach pierścienia dają możliwość występowania 20 różnych rotamerów. Wszystkie te konformacje można uszeregować według wielkości kąta fazowego na tzw. kole pseudorotacji (Rys. 4).



Rys. 4. Koło pseudorotacji, na którym podane zostały różne notacje konformacji pierścieni cukrowych²².

Energetycznie uprzywilejowane dla kwasów nukleinowych konformacje *C3'-endo* (RNA) oraz *C2'-endo* (DNA) znajdują się po przeciwnych stronach koła, dlatego często określane są mianem konformacji N (ang. *North*) lub S (ang. *South*).

W cząsteczkach RNA, reszty rybozy powiązane wiązaniami fosfodiesterowymi tworzą szkielet fosforocukrowy. Konformację tego łańcucha opisuje sześć kątów torsyjnych, charakteryzujących rotacje wokół kolejnych wiązań. Zgodnie z systemem nazewnictwa IUPAC²⁷ kąty te przyjęto oznaczać kolejnymi literami alfabetu greckiego (Rys. 5).



Rys. 5. Egzocykliczne kąty torsyjne szkieletu fosforocukrowego²⁸.

2. Wybrane drugo- i trzeciorzędowe motywy strukturalne RNA

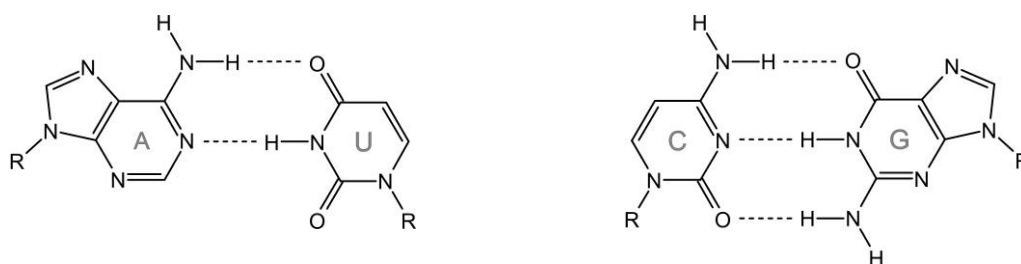
Kwasy nukleinowe są biopolimerami, które występują we wszystkich komórkach organizmów żywych i wirusach, pełniąc w nich szereg funkcji biologicznych, strukturalnych, regulatorowych oraz katalitycznych. Liczne badania dowiodły, iż funkcje biologiczne kwasów nukleinowych zależą bezpośrednio od ich struktury przestrzennej. Cząsteczki RNA, w przeciwieństwie do DNA, które preferują postać podwójnej helisy, występują zazwyczaj w postaci pojedynczej, silnie pofałdowanej nici polinukleotydowej (*ssRNA*), która lokalnie może tworzyć fragmenty dwuniciowe. Stąd w odróżnieniu od form kanonicznych DNA, różnorodność struktur przestrzennych RNA, powstałych w procesie zwijania pojedynczej nici oligorybonukleotydowej (ang. *RNA folding*), jest bardzo duża. W przyrodzie spotyka się

również postać dwuniciową (analogiczną do DNA), przeważnie jednak w postaci materiału genetycznego niektórych wirusów i wiroidów.

Omawiając strukturę kwasów nukleinowych często wyróżnia się trzy poziomy ich strukturalnego uporządkowania. Struktura pierwszorzędowa określa sekwencję nukleotydów w cząsteczce. Drugorzędowa struktura zdefiniowana jest układem wiązań wodorowych między resztami zasad heterocyklicznych w cząsteczce. Natomiast pojęcie struktury trzeciorzędowej odnosi się do przestrzennej aranżacji fragmentów jedno- i dwuniciowych. Rozróżnienie pomiędzy strukturą drugo- a trzeciorzędową często nie jest jednoznaczne i zależy od indywidualnego spojrzenia.

2.1. Podwójna helisa (ang. *double helix*)

Najpowszechniej występującym motywem strukturalnym kwasów nukleinowych jest podwójna helisa, zbudowana z dwóch antyrównoległych łańcuchów polinukleotydowych skracających się wokół wspólnej osi. W strukturze tej zasady heterocykliczne każdej z nici zwrócone są do wnętrza helisy oddziałując między sobą poprzez system wiązań wodorowych. Najczęściej spotykane są pary zasad typu Watsona-Cricka, w których adenina tworzy parę z uracylem, natomiast guanina z cytozyną (Rys. 6). Obok klasycznego sposobu parowania, postulowanego przez Watsona i Cricka, w układach helikalnych może dojść do parowania innego typu²².



Rys. 6. Układ wiązań wodorowych typu Watsona-Cricka w parach A:U i C:G.

W warunkach naturalnych cząsteczka DNA przyjmuje formę typu B, natomiast podwójna helisa RNA złożona z par zasad Watsona-Cricka ma formę typu A²² (Tabela 1). Struktura przestrzenna kwasów nukleinowych w dużym stopniu zależy od warunków środowiska i w zależności od stopnia hydratacji może przyjąć inną konformację. Na przykład cząsteczki RNA przyjmują postać prawoskrętnej helisy typu A, podobną do występującej przy

mniej stopniu uwodnienia formy DNA. Interesujące jest, iż forma A-DNA może współistnieć w cząsteczce z formą B²². Obserwowano również przejścia z formy B-DNA do A-DNA indukowane zmianami wilgotności względnej otoczenia, przy czym przejścia te mają charakter kooperatywny i co ciekawe, związane są ze zmianami konformacyjnymi pierścieni rybozy. Takich przemian nie obserwowano dotąd w dupleksach RNA, które występują w postaci A-RNA.

Forma lewoskrętna może wystąpić wówczas, gdy sekwencja fragmentu RNA bogata jest w pary zasad C:G, które wymuszają lewoskrętność helisy oraz powodują zróżnicowanie konformacyjne pierścieni cukrowych i kątów wokół wiązań glikozydowych. Warunkiem koniecznym do utworzenia formy lewoskrętniej Z-RNA²¹ jest również obecność odpowiednio dużego stężenia soli (6M NaClO₄), której zadaniem jest zminimalizowanie oddziaływania między grupami fosforanowymi łańcucha. Do tej pory nie stwierdzono istnienia struktury typu B-RNA, odpowiadającej najczęściej spotykanej konformacji DNA. Parametry opisujące struktury helikalne A-RNA, B-DNA i Z-RNA przedstawione zostały w tabeli 1.

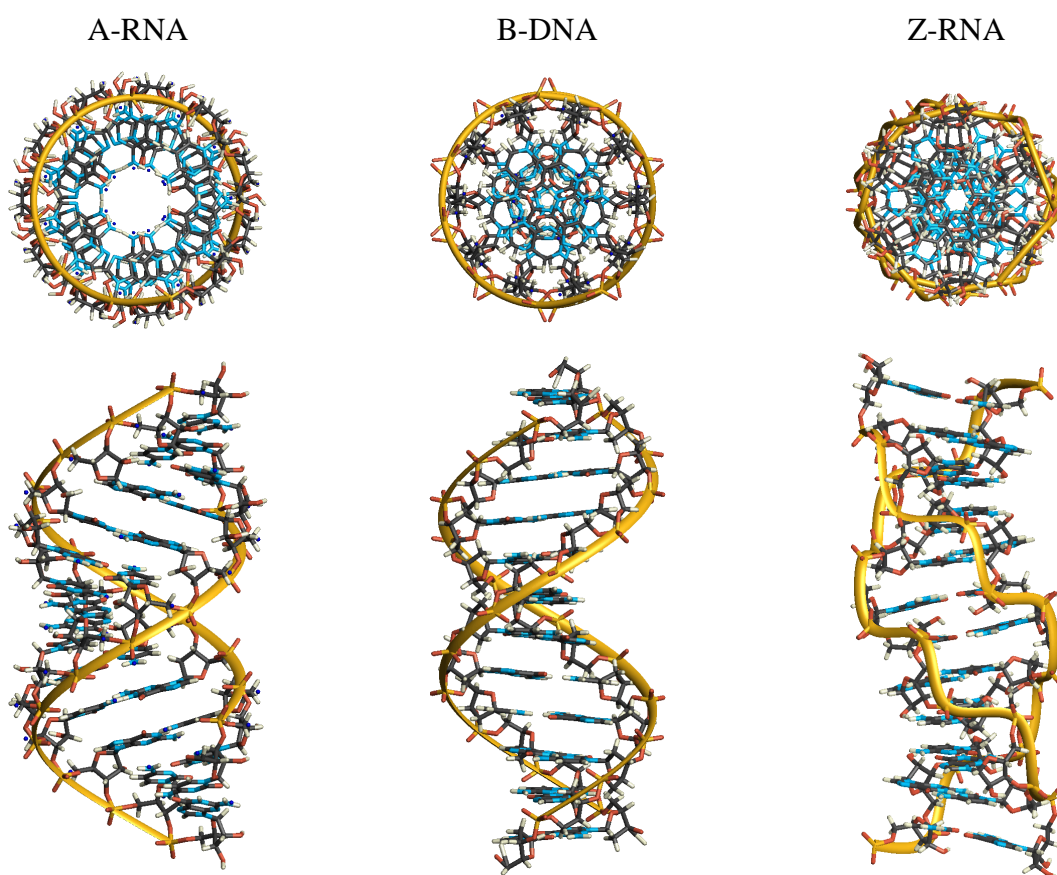
Tabela 1. Właściwości konformacyjne dwuniciowych struktur A-RNA, B-DNA i Z-RNA.

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

^{a)}na podstawie badań dyfrakcyjnych włókien RNA i DNA²², ^{b)}dla struktury poli(CG)²¹, ^{c)}obliczone dla struktury PDB: 2GXB²⁹ przy użyciu programu Curves^{30,31}.

Charakterystyczną cechą natywnych form helikalnych A-RNA i B-DNA jest konformacja reszt cukrowych²². W cząsteczkach A-RNA dominującą jest konformacja C3'-endo, natomiast w kanonicznych helisach B-DNA reszty cukrowe przyjmują konformację C2'-endo. Różnica w konformacji pierścieni cukrowych prowadzi w konsekwencji do różnych odległości pomiędzy sąsiadującymi grupami fosforanowymi. Odmienne jest również ułożenie zasad

heterocyklicznych względem osi helisy. W helisach typu A, pary zasad ulegają odchyleniu od płaszczyzny prostopadłej do osi helisy średnio o 20° , natomiast w przypadku formy B, ułożone są prawie prostopadle w stosunku do osi helisy. Różnica pomiędzy formą A i B uwidacznia się także w przesunięciu par zasad względem osi helisy, czego konsekwencją jest różna geometria dużej i małej bruzdy oraz obecność wewnętrznego kanału biegnącego wzdłuż osi dupletu A-RNA (Rys. 7). W helisie typu A mała bruzda jest bardzo szeroka i płytka, a przez to prawie niewidoczna. W strukturze B-DNA duża bruzda jest nieco płytsza i znacznie szersza niż w helisie A-RNA, natomiast mała bruzda jest zdecydowanie węższa i głębsza w porównaniu do formy A. Ponadto helisa A-RNA jest bardziej zwarta, a jej średnica większa w stosunku do B-DNA. Na jeden skręt cząsteczki A-RNA o wysokości 30.9 \AA przypada 11 par zasad, a w przypadku formy B skok helisy o długości 33.8 \AA zawiera 10 par zasad.

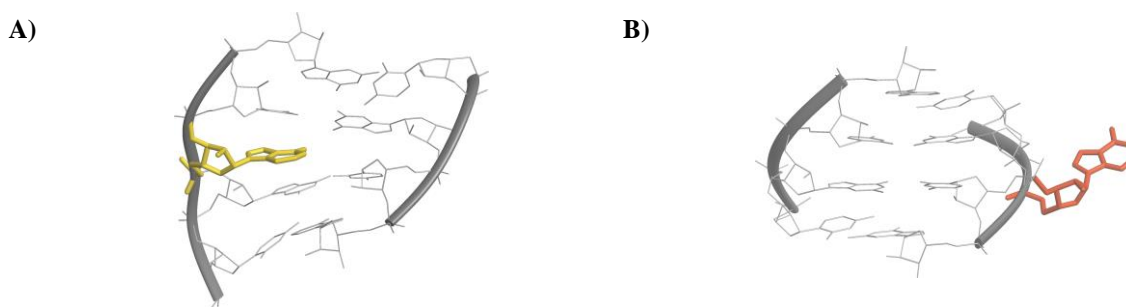


Rys. 7. Modele kanonicznych form A-RNA, B-DNA oraz Z-RNA w dwóch rzutach, wykonane za pomocą programu MOLMOL³² w oparciu o współrzędne wygenerowane programem Insight II (Accelrys) (A-RNA i B-DNA), oraz dane PDB: 1T4X²¹ (Z-RNA).

2.2. Wybrzuszenia (ang. *bulges*)

W helikalnych regionach RNA występują tzw. wybrzuszenia, motywy struktury drugorzędowej, w których w jednej nici podwójnej helisy pojawia się dodatkowo jedna lub więcej kolejnych reszt nukleotydowych, które nie posiadają odpowiadającej im reszty w nici naprzeciwległej. Wybrzuszenia są najprostszymi, a jednocześnie jednymi z najczęściej występujących motywów strukturalnych, funkcjonalnie istotnych dla wielu cząsteczek RNA³³. Obecnie wiadomo, że wiele wybrzuseń helikalnych regionów RNA uczestniczy nie tylko w procesie zwijania RNA, ale jest zaangażowanych w oddziaływania RNA-RNA, RNA-białko oraz w rozpoznanie niskocząsteczkowych ligandów^{7,9-12,17}.

W naturalnie występujących cząsteczkach RNA najczęściej spotykane są wybrzuszenia jednonukleotydowe. W strukturach tych możliwe są dwie orientacje niesparowanych reszt. Aglikony niesparowanych nukleotydów mogą być skierowane do wnętrza helisy, oddziałując warstwowo z sąsiadującymi parami zasad (struktura typu "*stack-in*"), lub wystawać na zewnątrz helisy (struktura typu "*loop-out*") (Rys. 8). Z dotychczasowych badań prowadzonych zarówno dla DNA jak i RNA wynika, że jednonukleotydowe wybrzuszenia purynowe na ogół chowają się do wnętrza helisy, natomiast jednonukleotydowe wybrzuszenia pirymidynowe, w zależności od temperatury i sekwencji par zasad sąsiadujących z wybrzuszeniem, mogą być schowane zarówno do wnętrza helisy, jak i być wyeksponowane do roztworu¹¹. Niesparowana reszta może układać się wzdłuż małej lub dużej bruzdy, tworzyć struktury o charakterze platformy (ang. *platform*) lub też może być wyrzucona na zewnątrz helisy nie zachowując kontaktu z sąsiadującymi resztami.



Rys. 8. Przykłady wybrzuseń skierowanych do wnętrza helisy w strukturze PDB: 1RHT¹⁸ (A) i na zewnątrz – w strukturze PDB: 1CSL³⁴ (B).

Spośród wybrzuseń jednonukleotydowych najliczniej reprezentowane są niesparowane reszty adenozy, które mogą stanowić obiekt dla niespecyficznego rozpoznawania RNA przez białka. Niektóre białka płaszczowe fagów (R17, GA i QB) rozpoznają pętle spinkowe

RNA oddzielone przez kilka par zasad od pojedynczej wybrzuszonej adenozy³⁵. Wybrzuszone adenozy³⁵ odgrywa również istotną rolę w intronach grupy II podlegających procesowi autokatalitycznego cięcia i dojrzewania jądrowego pre-mRNA.

2.3. Pętla wewnętrzna (ang. *internal loops*)

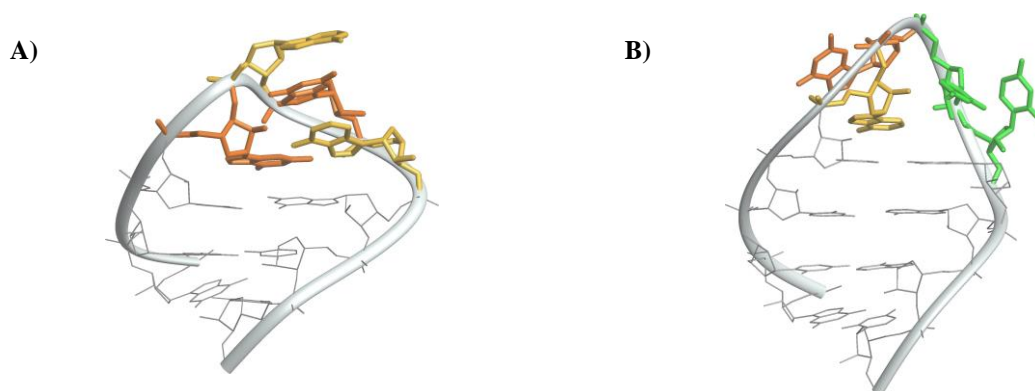
Pętla wewnętrzna jest strukturą, w której dwa fragmenty podwójnej helisy przedzielone są kilkoma niesparowanymi resztami zamkniętymi z obu stron (5' i 3') parami zasad typu Watsona-Cricka. Jeżeli liczba niesparowanych reszt jest równa w obu łańcuchach, wówczas mówimy o pętlach symetrycznych, w przeciwnym przypadku mamy do czynienia z pętlami niesymetrycznymi. Szczególnym przypadkiem pętli symetrycznych są tzw. niesparowania (ang. *mismatches*). Niesparowania powstają wówczas, gdy znajdujące się naprzeciw siebie zasady oddziałują w inny sposób aniżeli w modelu Watsona-Cricka. Wśród nich najczęściej spotykane są niekanoniczne pary G-U oraz G-A.

Pętla wewnętrzna rozpoznawana jest przez białka rybosomalne, regulatorowe oraz eukariotyczny czynnik transkrypcyjny TFIIIA. Znajdują się one w miejscach katalitycznych rybozomów^{36,37} i stanowią potencjalne miejsca oddziaływań trzeciorzędowych RNA-RNA dalekiego zasięgu, stabilizujących strukturę RNA³⁸. W dużych pętlach mogą tworzyć się różne nietypowe pary zasad. Przykładem może być pętla E w cząsteczce 5S rRNA, w obrębie której występują cztery niekanoniczne pary zasad³⁹. Analogiczne sekwencje i struktury przestrzenne pętli E są zachowawcze w różnych strukturach RNA, jak na przykład w wiroidzie PSTVd⁴⁰ i jednostce 23S rRNA, gdzie jednocześnie stanowią miejsce wiązania białkowych cytotoksyn α -sarcyny i rycyny⁴¹.

2.4. Struktura spinki do włosów (ang. *hairpin*)

Struktura typu spinki do włosów powstaje, gdy pojedynczy łańcuch polinukleotydowy zawija się, przyjmując postać helikalnego trzonu (ang. *stem*) i pozostawia przy tym niesparowane nukleotydy w tzw. pętli terminalnej (ang. *terminal loop*) (Rys. 9). Oddziałujące w trzonie pary zasad przyjmują postać podwójnej helisy, natomiast niesparowane nukleotydy w pętli posiadają większą swobodę konformacyjną, dzięki czemu mogą stanowić potencjalne miejsce rozpoznawania przez cząsteczki białka oraz inne fragmenty RNA. Motywy te bardzo

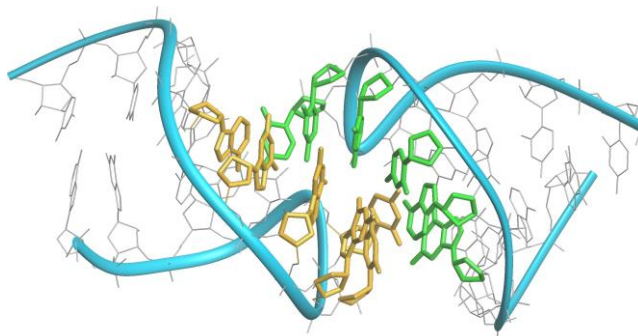
często spotykane są w naturalnie występujących cząsteczkach RNA^{42,43}. Na przykład, blisko 70 % całego RNA w podjednostce 16S rRNA *Escherichia coli* tworzy struktury typu spinki⁴⁴.



Rys. 9. Struktura czteronukleotydowej pętli terminalnej o sekwencji GAGA (PDB: 1ZIG)⁴⁵ (A) oraz pętli AGUU, z rodziny struktur czteronukleotydowych pętli, formująca miejsce rozpoznania dla *Saccharomyces cerevisiae* RNazy III (PDB: 1K4B)⁴⁶ (B).

Pętłe terminalne mogą składać się z różnej liczby reszt nukleotydowych. Wyniki eksperymentów NMR wskazują, iż kilkunukleotydołe pętłe charakteryzują się znacznie większym stopniem wewnętrznej organizacji aniżeli pętłe zbudowane z większej liczby reszt. Szczególnie stabilne są pętłe czteronukleotydołe (ang. *tetraloop motif*) o sekwencjach UNCG, GNRA oraz CUUG, w których N oznacza dowolną resztę nukleotydową, natomiast R – resztę purynową⁴⁷. Badania krystalograficzne oraz analiza struktur drugorzędowych metodami filogenetycznymi wykazały, że spinki zawierające czteronukleotydołe pętłe stanowią 55% wszystkich struktur spinkowych występujących w rRNA⁴⁸. Drugą, często spotykaną rodziną stanowiącą 13% populacji są struktury zawierające pięć nukleotydów w pętli. Natomiast stosunkowo rzadko w strukturach RNA spotykane są duże pętłe terminalne, złożone z sześciu i większej liczby reszt. W tych dużych strukturach często występują nietypowe oddziaływania pomiędzy zasadami w obrębie pętli lub też zachodzą interakcje z innymi fragmentami RNA tworząc struktury typu pseudowęzła lub motyw oddziałujących pętli (ang. *kissing loop*) (Rys. 10). Obecność siedmio- i ośmionukleotydowych pętli stwierdzona została między innymi w cząsteczkach tRNA. Dużą, siedmionukleotydową pętlę w strukturze typu spinki reprezentuje pętla antykodonowa w tRNA⁴⁹. W pętli tej zachowana jest ciągłość oddziaływań warstwowych pomiędzy resztami zasad począwszy od strony 3' trzonu do momentu silnego skrętu, zwanego zwrotem U (ang. *U-turn*), który odwraca o 180° kierunek przebiegu łańcucha oligorybonukleotydowego.

Znane są również małe pętle terminalne składające się z dwóch lub trzech niesparowanych nukleotydów^{50,51}.



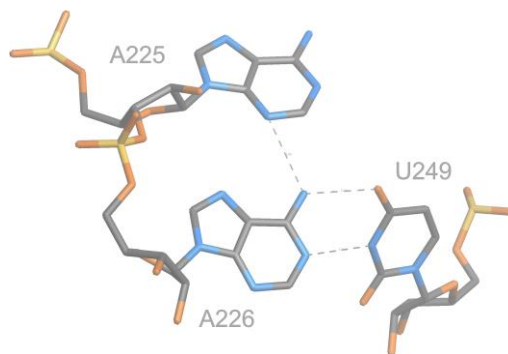
Rys. 10. Motyw oddziałujących pętli (PDB: 1KIS)⁵². Kolorem zielonym oraz złotym zaznaczono reszty nukleotydowe dwóch różnych nici RNA, które związane zostały wiązaniami wodorowymi.

2.5. Platformy adenozyne (ang. *adenosine platforms*)

Analiza struktury krystalicznej domeny P4-P6 intronu grupy I z *Tetrahymena thermophila* ujawniła obecność nieobserwowanego dotąd motywu, który nazwano platformą adenozynową³. Motyw ten utworzony jest przez dwie kolejne reszty adenozyne w nici, które układają się koplanarnie i oddziałują ze sobą za pośrednictwem wiązań wodorowych (Rys. 11). Cechą charakterystyczną tego motywu jest powstanie sąsiadującej z platformą po stronie 3' niekanonicznej pary zasad G:U lub pary A:U typu Hoogsteena, której obecność wpływa na stabilizację motywu⁵³. Jak wykazano, region ten jest miejscem specyficznego wiązania jonów Mg^{2+} lub K^+ , których obecność dodatkowo przyczynia się do jego stabilizacji⁵⁴. Ponadto reszta adenozyne tworząca platformę od strony 3' końca może być zaangażowana w oddziaływania warstwowe z resztami heterocyklicznymi innej cząsteczki (jak ma to miejsce w domenie P4-P6 intronu z *Tetrahymena thermophila*)⁵⁵. W miejscu adenozyne od strony 3' platformy może też akomodować cytydyna tak, jak to zaobserwowano w strukturze aptameru RNA wiążącego teofilinę⁵⁶ oraz podczas selekcji *in vitro* wariantów oddziaływania pomiędzy receptorem pętli a czteronukleotydową pętlą⁵⁷.

Wraz z poznawaniem struktur przestrzennych coraz większej liczby cząsteczek RNA zaobserwowano, że motyw platformy nie jest ograniczony jedynie do reszt adenozynowych. Obecność tak zwanych platform dinukleotydowych stwierdzono również w innych cząsteczkach jak na przykład w rybosomalnych RNA i rybozymach⁵⁸⁻⁶⁰. Zauważono również,

iż platformy dinukleotydydowe zaangażowane są często w tworzenie trzech oddziaływających koplanarnie zasad^{61,62}.



Rys. 11. Motyw platformy adenosynowej występujący w strukturze domeny P4-P6 intronu grupy I z *Tetrahymena thermophila* (PDB: 1GID)⁵⁵. Przerywane linie symbolizują wiązania wodorowe stabilizujące motyw.

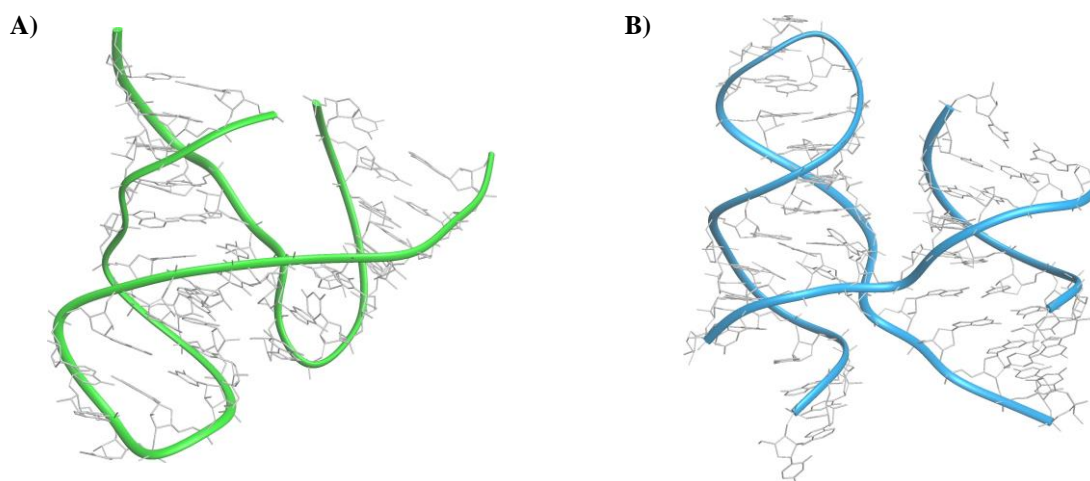
2.6. Oddziaływanie trzech zasad (ang. *base triples*)

Początkowe badania biofizyczne heterodupleksów poli(A)-poli(U) wykazały, że w środowisku o dużym stężeniu soli, nici polinukleotydydowe wykazują tendencje do przechodzenia w potrójne helisy poli(U)-poli(A)-poli(U) i pojedynczy łańcuch poli(A)^{63,64}. W powstałej strukturze łańcuchy poli(A) i poli(U) tworzą klasyczne pary Watsona-Cricka, natomiast dodatkowy łańcuch poli(U) oddziałuje po stronie małej bruzdy tworząc pary typu Hoogsteena z łańcuchem poli(A). Znane są również struktury trypleksów typu C:G-C⁺, w których dodatkowa nić polipirymidynowa zawiera protonowane reszty cytydyny, tworząc wiązania wodorowe typu Hoogsteena z resztą guanozyny⁶⁵. Jak wykazały badania NMR, ten dodatkowy łańcuch asocjuje w obrębie dużej bruzdy RNA nie indukując znaczących zmian w strukturze helikalnej typu A⁶⁶. Jednak pomimo stabilizacyjnej funkcji dodatkowego łańcucha w trypleksach, motyw ten nie został zaobserwowany w naturalnie występujących cząsteczkach RNA⁵³. Wiele cząsteczek RNA zawiera motyw trzech oddziaływających zasad, jednak jest on zazwyczaj izolowany i ograniczony do pojedynczych trójek zasad (ang. *base triples*). Takie motywy znaleziono między innymi w cząsteczkach tRNA, w których ramię DHU tworzy dwie kolejne trójki zasad⁶⁷⁻⁶⁹. W odróżnieniu od modelu trypleksu, w tym przypadku dodatkową zasadą jest reszta puryny, która umiejscawia się po stronie dużej bruzdy. Natomiast obecność dodatkowej zasady oddziałującej po stronie małej bruzdy zaobserwowano w oddziaływających ze sobą pętlach terminalnych typu GAAA w intronie

z *Tetrahymena thermophila*⁵⁵. Trójki oddziałujących zasad odgrywają istotną rolę w oddziaływaniach z małowcząsteczkowymi ligandami oraz oddziaływaniach typu RNA-białko⁷⁰. Motywy te wpływają na architekturę przestrzenną cząsteczek RNA i powodują zagięcie fragmentów helikalnych w dużych cząsteczkach RNA.

2.7. Trój- i czteroczłonowe styki (ang. *junctions*)

W miejscu „skrzyżowania” trzech lub większej liczby helis powstają tak zwane styki. W motywie tym często występują niesparowane nukleotydy, których zadaniem jest połączenie fragmentów dwuniciowych. Na przykład styki trójczłonowe tworzą się wówczas, gdy trzy helikalne fragmenty RNA łączą się ze sobą w ten sposób, że powstaje rozgałęziona pętla wewnętrzna (z niesparowanymi resztami), od której wychodzą trzy ramiona złożone z fragmentów podwójnej helisy. Wprawdzie struktury te nie były do tej pory tak szczegółowo badane jak na przykład struktury typu spinki lub pętla wewnętrzne, to można ustalić pewne wspólne cechy charakterystyczne dla styków trójczłonowych⁷¹⁻⁷³. W zależności od wzajemnego ułożenia ramion struktury te dzielą się na trzy rodziny: A, B i C. W rodzinach tych dwa ramiona ułożone są współosiowo zachowując ciągłość oddziaływań warstwowych (ang. *coaxial stacking*), natomiast trzecie ramię może być zorientowane prostopadle lub równoległe do jednego z dwóch pozostałych (Rys. 12).



Rys. 12. Struktury rybozomu *hammerhead* (PDB: 1MME)⁷⁴ (A) oraz struktury RNA krytycznej dla inicjacji translacji zależnej od elementu IRES wirusa HCV (PDB: 1KH6)⁷⁵ (B).

Trój- i czteroczłonowe styki występują we wszystkich rybosomalnych RNA, takich jak 5S, 16S i 23S rRNA, cząsteczkach tRNA, jak również w rybozymach typu *hammerhead*, czy w rdzeniu katalitycznym intronów grupy I^{43,73}. W badaniach hydrodynamicznych (ang. *transient electric birefringence*), metodami FRET (ang. *Fluorescence Resonance Energy Transfer*), oraz elektroforezy na żelu natywnym zaobserwowano, że struktura przestrzenna tego motywu w znacznym stopniu stabilizowana jest przez oddziaływania RNA z jonami metali, oraz że obecność jonów ma decydujący wpływ na przestrzenną architekturę, a także funkcję tych cząsteczek RNA⁷⁶⁻⁷⁹.

2.8. Pseudowęzły (ang. *pseudoknots*)

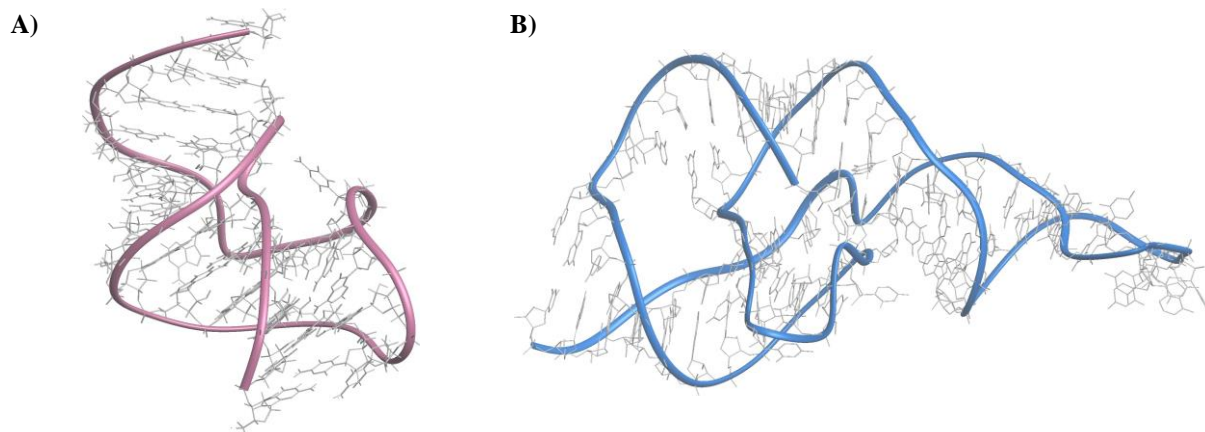
Pseudowęzeł jest motywem struktury trzeciorzędowej, który powstaje, gdy reszty nukleotydowe jednoniciowego regionu pętli w strukturze o charakterze spinki, asocjują według modelu Watsona-Cricka z komplementarnym fragmentem znajdującym się na zewnątrz tej pętli. W utworzonej w ten sposób strukturze możemy zawsze wyróżnić dwa odcinki helikalne połączone fragmentami jednoniciowymi o charakterze pętli (Rys. 13). Strukturalnie pseudowęzły stanowią bardzo zróżnicowaną grupę. Zależnie od elementu struktury drugorzędowej tworzącej ten motyw, można dokonać klasyfikacji pseudowęzłów na trzy główne typy: I-typ (ang. *interior loop*), B-typ (ang. *bulge loop*) oraz H-typ (ang. *hairpin loop*)³³.

Pseudowęzły stanowią istotny element architektury RNA i odgrywają ważną rolę w wielu procesach biologicznych. Pseudowęzły RNA zostały zidentyfikowane w prawie każdym organizmie, występują w rdzeniach katalitycznych różnych rybozymów^{80,81}, stanowią funkcjonalne domeny autokatalitycznych intronów⁸², telomeraz⁸³, kompleksów rybonukleoproteinowych^{84,85}, genomów wirusowych⁸⁶, a także wielu innych systemów biologicznych⁸⁷. Dodatkowo pseudowęzły odgrywają decydującą rolę w regulacji ekspresji genów poprzez wymuszenie przesunięcia rybosomów w alternatywne ramki odczytu (ang. *frameshifting*) na RNA licznych wirusów⁸⁸⁻⁹¹.

Naturalnie występujące pseudowęzły są zdolne do przeprowadzania reakcji hydrolizy oraz transestryfikacji⁹², ale i wyselekcjonowane *in vitro* mogą katalizować także wiele innych reakcji enzymatycznych⁹³.

Topologia pseudowęzłów prowadzi do powstania wielu różnych, złożonych struktur, w związku z czym pseudowęzły stanowią istotny element architektury RNA, ponieważ

umożliwiają pojedynczej nici RNA zwinięcie się tak, aby utworzyć strukturę globularną zdolną do pełnienia ważnych funkcji biologicznych.



Rys. 13. Struktura przestrzenna pseudowęzła z SRV-1 RNA zaangażowanego w rybosomalne przesunięcie ramki odczytu (PDB: 1E95)⁹⁰ (A), oraz pseudowęzła w strukturze rybozomu HDV (PDB: 1CX0)⁹⁴ (B).

3. Spektroskopia NMR w badaniach strukturalnych kwasów nukleinowych

Istnieje wiele technik mających na celu poznanie struktury biocząsteczek, jednakże jedynie dwie metody eksperymentalne umożliwiają pełne i precyzyjne poznanie struktury przestrzennej z rozdzielczością atomową. Są to badania krystalograficzne oraz spektroskopia jądrowego rezonansu magnetycznego. Biomolekularna spektroskopia NMR jest obecnie jedyną metodą eksperymentalną, która umożliwia prowadzenie badań strukturalnych w roztworze. Badania cząsteczek prowadzone w różnym środowisku mają szczególne znaczenie, gdyż dają możliwość określenia pełnionych przezeń funkcji, na przykład w komórce. Postęp jaki dokonuje się w dziedzinie spektroskopii NMR, zarówno w konstrukcji spektrometrów NMR, opracowaniu nowych technik impulsowych czy też metod syntezy enzymatycznej i chemicznej pozwala na otrzymywanie coraz to większych struktur z wciąż poprawiającą się precyzją i dokładnością tak, iż mogą one konkurować z najnowszymi osiągnięciami metod krystalograficznych⁹⁵. Liczba zdeponowanych w bazie PDB współrzędnych atomów cząsteczek DNA i RNA otrzymanych metodami NMR jest zdecydowanie mniejsza niż analogicznych danych dotyczących struktur białek. Warto w tym miejscu zaznaczyć, że analiza strukturalna cząsteczek RNA, jak i DNA jest procesem zdecydowanie trudniejszym niż badania struktury białek. Wynika to między innymi z małej

heterogenności jednostek nukleotydowych, w porównaniu ze zróżnicowaniem reszt aminokwasowych w białkach i wynikającym z tego nakładaniem się sygnałów rezonansowych, jakie obserwuje się w widmach NMR kwasów nukleinowych. Przyjmuje się, że w przypadku cząsteczek RNA o naturalnym składzie izotopowym możliwe jest ustalenie struktury fragmentów nie większych, niż zbudowanych z około 20 reszt nukleotydowych. W przypadku większych fragmentów, z uwagi na silne nakładanie się sygnałów rezonansowych, niezbędne jest zastosowanie preparatów znakowanych izotopami ^{13}C i ^{15}N . Dzięki takiemu postępowaniu udało się otrzymać strukturę przestrzenną fragmentu RNA wirusa MLV złożonego ze 101 reszt nukleotydowych⁹⁶.

Wyznaczenie struktury przestrzennej biocząsteczek z wykorzystaniem metod spektroskopii NMR jest procesem bardzo złożonym. W ogólnej, stosowanej zazwyczaj procedurze, można wyróżnić kilka charakterystycznych etapów (Rys. 14), z których wymienić należy: przygotowanie próbki; zebranie danych eksperymentalnych; przypisanie możliwie dużej liczby sygnałów rezonansowych ^1H , a także ^{13}C , ^{15}N i ^{31}P ; wyznaczenie więzów strukturalnych; przeprowadzenie obliczeń metodami restryktywnej dynamiki molekularnej (rMD, ang. *restrained Molecular Dynamics*) w celu otrzymania struktur przestrzennych, zgodnych z danymi NMR oraz dokonanie analizy uzyskanych struktur końcowych.



Rys. 14. Ogólny tok postępowania podczas wyznaczania struktury przestrzennej metodami NMR.

Poszczególne etapy wyznaczania struktury przestrzennej cząsteczek RNA metodami NMR omówione zostaną w kolejnych rozdziałach. Procesy związane z przygotowaniem próbki, wykonaniem i analizą widm NMR opisane zostaną na przykładzie badanych przeze mnie cząsteczek w części eksperymentalnej niniejszej rozprawy. W rozdziale III.4 bliżej

przedstawię zagadnienia dotyczące rodzaju więzów strukturalnych i metod ich otrzymywania, oraz metod obliczeniowych stosowanych w celu ustalenia struktur przestrzennych cząsteczek RNA metodami NMR. Opisane również zostaną pewne aspekty związane z oceną oraz analizą przestrzenną otrzymanych struktur końcowych.

4. Metody obliczeniowe spektroskopii NMR w zastosowaniu do badań struktury kwasów nukleinowych

4.1. Więzy strukturalne

Dane eksperymentalne wraz z wiedzą o sieci wiązań kowalencyjnych stanowią główne źródło informacji służących do otrzymania przestrzennych struktur biomolekuł metodami spektroskopii NMR. Stąd też w głównej mierze od rodzaju, liczby i dokładności wprowadzonych więzów zależy precyzja oraz dokładność otrzymanych w wyniku obliczeń struktur (Rozdział III.4.3). W celu uzyskania odpowiedniego zbioru dobrej jakości więzów wykorzystuje się kilka istotnych, znanych reguł. Waga, którą przypisuje się danej grupie więzów powinna być wprost proporcjonalna do stopnia wiarygodności danych, z których więzy te zostały otrzymane. Powszechna jest zasada, iż duża liczba więzów o szerokim zakresie tolerancji w rezultacie da większą liczbę poprawnych struktur, aniżeli mała ilość więzów o wąskim zakresie.

Więzy, wykorzystywane w badaniach strukturalnych metodami NMR mogą zostać podzielone na więzy eksperymentalne i więzy wynikające z modelu. Więzy otrzymane w drodze eksperymentu to więzy odległościowe, więzy na kąty torsyjne, więzy orientacyjne dalekiego zasięgu, oraz stereochemiczne, wynikające z istniejącej sieci wiązań chemicznych w cząsteczce (ang. *covalently imposed constraints*). Natomiast do drugiej grupy więzów zalicza się m.in. więzy na wiązania wodorowe, czy też planarność par zasad⁹⁷. Niekiedy, gdy dane eksperymentalne wykazują typowe cechy struktury A-RNA, zakłada się *a priori* dla danego fragmentu istnienie formy A, narzucając na strukturę więzy charakterystyczne dla formy A-RNA (ang. *A-form restraints*). Różnica pomiędzy więzami wynikającymi z modelu a więzami eksperymentalnymi nie zawsze jest wyraźna, ponieważ niektóre więzy, choć są zgodne z danymi spektralnymi, to wynikają raczej z przesłanek, a nie bezpośrednio z eksperymentu.

4.1.1. Jądrowy efekt Overhausera. Więzy na odległości międzyprotonowe

Głównym źródłem informacji strukturalnych wykorzystywanych w badaniach kwasów nukleinowych metodami spektroskopii NMR są odległości międzyprotonowe, otrzymane z pomiaru jądrowego efektu Overhausera (NOE, ang. *Nuclear Overhauser Effect*). Jądrowym efektem Overhausera nazywamy zjawisko zmiany natężenia sygnału NMR pochodzącego od spinów jądrowych I w wyniku wyprowadzenia ze stanu równowagi termodynamicznej oddziałujących z nimi dipolowo spinów J ^{98,99}. Wielkość tej zmiany możemy wyrazić poprzez tzw. współczynnik wzmocnienia NOE (η), który zdefiniowany jest za pomocą wyrażenia:

$$\eta_{i(j)} = \frac{\langle\langle I_{iz} \rangle\rangle - \langle I_{iz}^0 \rangle}{\langle I_{iz}^0 \rangle}, \quad (3)$$

gdzie $\langle I_{iz}^0 \rangle$ oznacza intensywność sygnału NMR jądra o spinie I w stanie równowagowym, natomiast $\langle I_{iz} \rangle$ jest intensywnością tego sygnału w układzie zaburzonym.

Wielkość efektu NOE (V) jest odwrotnie proporcjonalna do szóstej potęgi odległości (d_{ij}) między dwoma oddziałującymi dipolowo spinami ^1H , a sam efekt obserwowany jest dla jąder oddalonych od siebie nie więcej niż o 6 Å. Transfer magnetyzacji zależy zarówno od odległości d_{ij} , jak i od ruchów molekularnych, określonych w funkcji czasu korelacji $f(\tau_c)$ (równanie 4).

$$V = \langle d_{ij}^{-6} \rangle f(\tau_c) \quad (4)$$

Obecnie stosowanych jest kilka metod wyznaczania więzów na odległości między protonami, z których każda opiera się na analizie objętości sygnałów w widmach 2D NOESY (D_2O). Najprostszą, a zarazem najczęściej stosowaną metodą, polega na szacunkowym porównywaniu wielkości wzmocnienia NOE między protonami do wzmocnienia, obserwowanego dla odpowiednich sygnałów wzorcowych, pochodzących od oddziaływań pomiędzy protonami o znanej odległości, niezależnej od konformacji cząsteczki, w oparciu o widma NOESY wykonane z różnymi czasami mieszania (ang. *mixing time*). Tym samym dokonuje się klasyfikacji sygnałów jako silne (ang. *strong*), średnie (ang. *medium*) oraz słabe (ang. *weak*) i przypisuje każdej kategorii górną granicę więzów⁹⁷. I tak, intensywnym sygnałom, porównywalnym do korelacji H5-H6 reszt pirymidynowych przypisuje się górną granicę 2.5 – 3.0 Å, sygnałom o średniej intensywności – granicę 3.5 – 4.0 Å, natomiast

słabym: 5 – 6 Å. Często wprowadza się dodatkową klasę (~7 Å) dla sygnałów widocznych tylko w widmach wykonanych z długim czasem mieszania (~300 – 400 ms). Dolną granicę więzów w tym podejściu wyznacza suma promieni van der Waalsa oddziałujących protonów, choć często można spotkać prace, w których i te granice są zróżnicowane.

Zdecydowanie dokładniejsza jest metoda ISPA¹⁰⁰ (ang. *Isolated Spin Pair Approximation*) oparta na możliwie dokładnym określeniu wielkości wzmocnienia NOE i przyrównaniu otrzymanej wartości do objętości sygnału wzorca. Do wyznaczonych tą metodą odległości międzyprotonowych dodaje się procentowy błąd w celu określenia górnej i dolnej granicy więzów. Pewną niedoskonałością tej metody może być nieuwzględnienie podczas obliczeń wpływu zjawiska dyfuzji spinów i reorientacji wewnątrzcząsteczkowych na wielkość efektów NOE, dlatego stosowalność tej metody jest ograniczona. Dyfuzja spinów jest procesem, w wyniku którego w czasie mieszania dochodzi do pośredniego transferu magnetyzacji. Wówczas relacja między intensywnością sygnałów korelacyjnych a czasem mieszania przestaje być liniowa. W takim przypadku możliwa jest obserwacja sygnałów korelacyjnych w widmach typu NOESY pomiędzy protonami bardziej odległymi od siebie niż 6 Å, pomiędzy którymi znajduje się jeden lub więcej protonów. Dla badanych przeze mnie cząsteczek o masie rzędu 6 kD wpływ efektu dyfuzji spinów może być zanedbany jedynie w widmach wykonanych z krótkim czasem mieszania około 100 ms. Aby całkowicie zniwelować wpływ wspomnianych oddziaływań, zaproponowanych zostało kilka innych metod^{101,102}, które jednak z uwagi na ich dużą czasochłonność są rzadko stosowane.

Dodatkowe więzy na odległości międzyprotonowe można otrzymać na podstawie analizy widm 2D NOESY wykonanych w H₂O. Sygnały korelacyjne pochodzące od protonów wymiennalnych należy jednak traktować z większą ostrożnością, gdyż w wyniku procesów wymiany objętości tych sygnałów mogą być zakłamane. Dlatego dla tych więzów można jedynie stosować górną granicę więzów z przedziału 5 – 6 Å.

4.1.2. Sprzężenia skalarne. Więzy na kąty torsyjne

Więzy na kąty torsyjne stanowią drugą, równie istotną grupę danych wykorzystywanych podczas obliczeń, które można otrzymać z eksperymentów NMR. Wartości kątów torsyjnych można ustalić na podstawie analizy wicynalnych stałych sprzężenia spinowo-spinowego (³J). Istotą wykorzystania sprzężeń skalarnych w badaniach strukturalnych jest fakt, iż wielkość oddziaływania między spinami jądrowymi, którego miarą jest wartość stałej sprzężenia, silnie

zależy od czynników stereochemicznych (konformacji, typu oddziałujących jąder oraz jąder pośredniczących i związanych z nimi podstawników). Zależność ta wyznaczona została drogą obliczeń kwantowo-mechanicznych przez Martina Karplusa¹⁰³. Dla kwasów nukleinowych dokonano empirycznej parametryzacji równania dla układów H-C-C-H, C-C-C-H, C-C-O-P oraz H-C-O-P. Relację między stałą sprzężenia 3J pomiędzy dwoma protonami reszty cukrowej a kątami torsyjnymi w rybozie opisuje wzór¹⁰⁴:

$$^3J_{\text{HH}} = 13.7 \cos^2 \varphi - 0.73 \cos \varphi + \sum_i \Delta\chi_i [0.56 - 2.47 \cos^2(z_i \varphi + 16.9 |\Delta\chi_i|)]. \quad (5)$$

W wyrażeniu tym φ określa dany kąt torsyjny, natomiast zmienne $\Delta\chi_i$ oraz z_i zależą odpowiednio od elektroujemności i orientacji podstawników przy atomach węgla i przyjmują wartości: $\Delta\chi = 0.4$ (C), 0.85 (N), 1.3 (O) oraz -0.05 (P), a $z_i = \pm 1$. W przypadku heterojądrowych sprzężeń $^3J_{\text{CH}}$ w układzie C-C-C-H, wartość kąta torsyjnego wyznaczyć można za pomocą równania¹⁰⁴:

$$^3J_{\text{CH}} = 5.7 \cos^2 \varphi - 0.6 \cos \varphi + 0.5. \quad (6)$$

Natomiast zależności stałych sprzężeń $^3J_{\text{PH}}$ i $^3J_{\text{CP}}$ od wartości kąta torsyjnego opisują równania Karplusa w postaci¹⁰⁴:

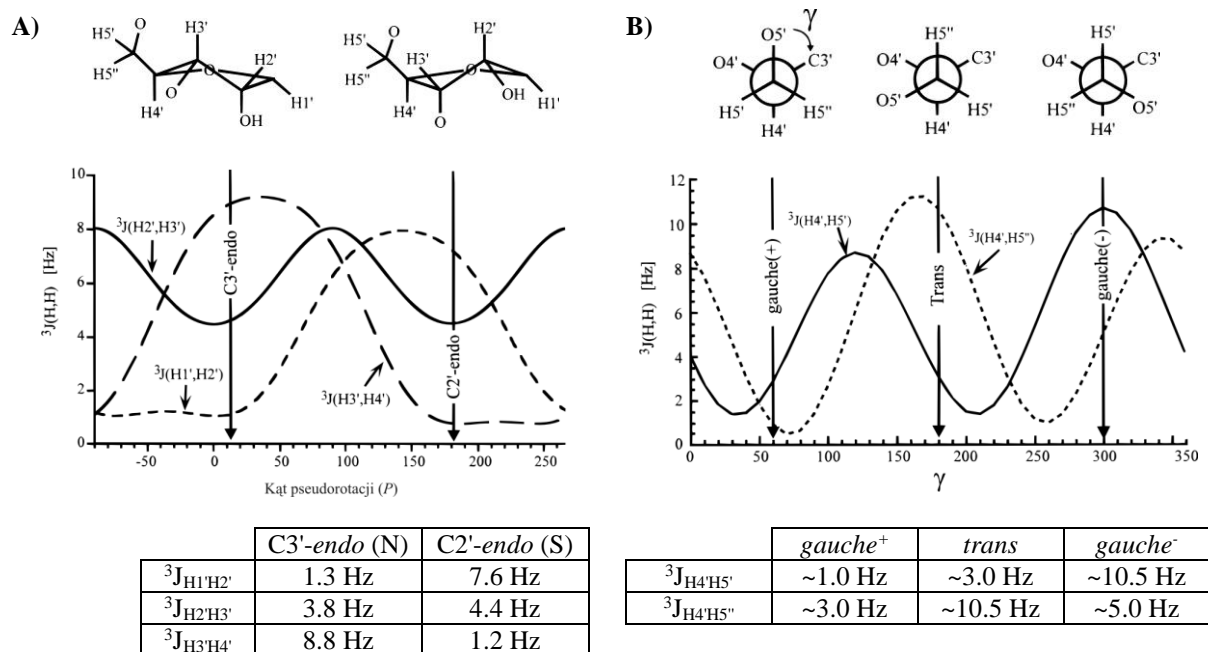
$$^3J_{\text{PH}} = 15.3 \cos^2 \varphi - 6.1 \cos \varphi + 1.6, \quad (7)$$

$$^3J_{\text{CP}} = 6.9 \cos^2 \varphi - 3.4 \cos \varphi + 0.7. \quad (8)$$

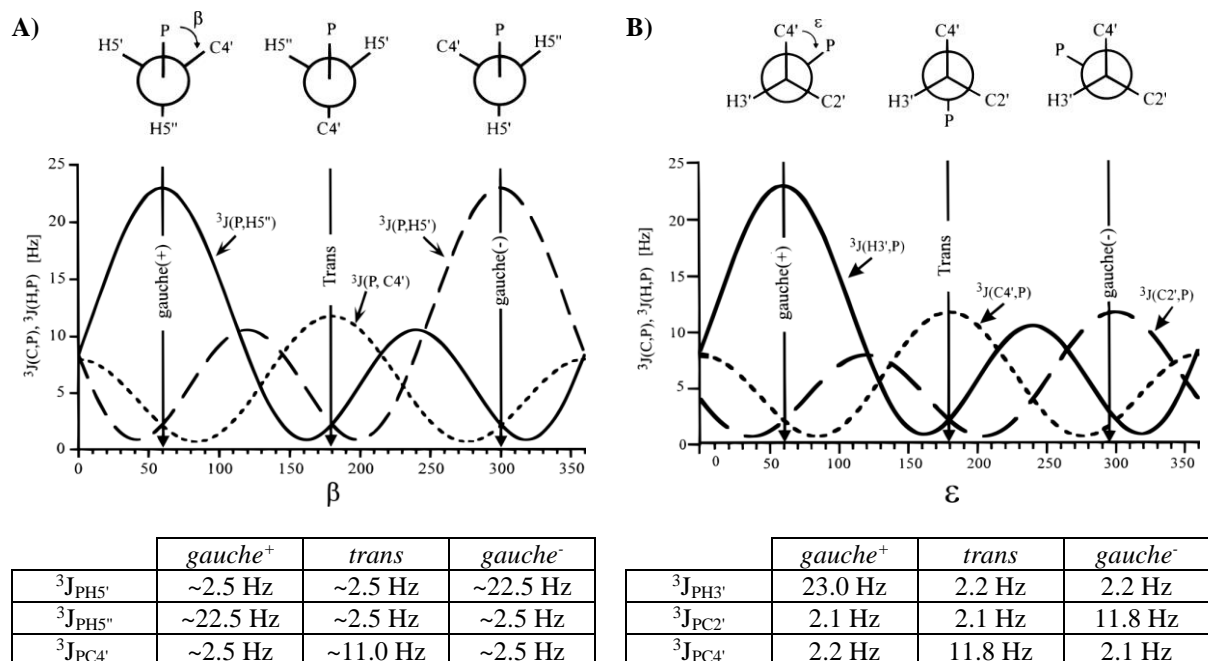
Pomimo znanych zależności, dokładność z jaką zostały one sparametryzowane dla sprzężeń heterojądrowych jest niska, a wyznaczone na ich podstawie wartości kątów torsyjnych są obarczone dużym błędem. Mimo tego rozwiniętych zostało wiele technik NMR umożliwiających pomiar zarówno homo- jak i heterojądrowych wartości sprzężeń 2J oraz 3J , pozwalających określić konformację szkieletu fosforocukrowego. Wykresy wybranych zależności przedstawione zostały na rysunku 15 oraz 16.

Podobnie jak więzy NOE, więzy na kąty torsyjne wyznaczone są często jakościowo, stąd wprowadzone restrykcje ograniczają przyjmowane wartości dla danego kąta do jednej z trzech możliwych konformacji rotameru. Mimo tego, wykorzystanie tych danych podczas obliczeń wpływa na poprawę zarówno dokładności jak i precyzji otrzymanych struktur.

Potencjalne źródło informacji odnośnie przyjmowanych przez niektóre kąty torsyjne wartości stanowiąc może również pomiar efektu NOE, bądź analiza przesunięć chemicznych jąder ^{31}P ^{28,105,106}.



Rys. 15. Krzywe Karplusa opisujące zależności wicynalnych stałych sprzężeń spinowo-spinowych $^3J_{\text{HH}}$ od kąta fazowego pseudorotacji P (A) oraz kąta torsyjnego γ (B)¹⁰⁴.



Rys. 16. Krzywe Karplusa opisujące zależności wicynalnych stałych sprzężeń spinowo-spinowych $^3J_{\text{PH}}$ oraz $^3J_{\text{CP}}$ od kąta torsyjnego β (A) i kąta torsyjnego ϵ (B)¹⁰⁴.

4.1.3. Resztkowe sprzężenia dipolowe. Więzy orientacyjne dalekiego zasięgu

Resztkowe sprzężenia dipolowe (RDC, ang. *Residual Dipolar Couplings*) stanowią stosunkowo nowe źródło informacji kierunkowych, zarówno lokalnych jak i dalekiego zasięgu, dlatego też są niezwykle pomocne podczas ustalania wzajemnej orientacji odległych od siebie regionów cząsteczki lub słabo zdefiniowanych (z uwagi na brak sygnałów NOE) fragmentów¹⁰⁶⁻¹⁰⁸. W roztworach sprzężenia dipolowe (np. między spinami ¹H i ¹³C) na skutek izotropowej reorientacji cząsteczek uśredniają się do zera. Jedynym symptomem ich obecności jest występowanie jądrowego efektu Overhausera. Wprowadzenie różnych mediów orientujących¹⁰⁹⁻¹¹⁶ powoduje częściowe uporządkowanie molekuł i pojawienie się na ogół niewielkiego rozszczepienia linii NMR. Wkład resztkowego sprzężenia dipolowego D_{IJ} do rozszczepienia wywołanego pośrednim oddziaływaniem spinowym dany jest wzorem^{117,118}:

$$D_{IJ}(\theta, \phi) = D_a \left[(3 \cos^2 \theta - 1) + \frac{3}{2} R \sin^2 \theta \cos 2\phi \right], \quad (9)$$

w którym D_a oznacza stałą sprzężenia dipolowego, $R = A_a/A_r$ określa stosunek składowych asymetrii i anizotropii tensora uporządkowania A , natomiast kąty θ i ϕ są współrzędnymi cylindrycznymi opisującymi orientację wektora łączącego oddziałujące spiny I - J w układzie współrzędnych cząsteczki. W układzie tym składowe diagonalne tensora A odzwierciedlają prawdopodobieństwo, że osie układu będą równoległe do kierunku pola B_0 . Ponieważ obserwowane sprzężenia dipolowe w cząsteczce określone są względem tego samego układu współrzędnych, stąd odległości między poszczególnymi wektorami I - J nie wpływają na dokładność wyznaczenia ich wzajemnej orientacji, a wiedza o wielkości sprzężeń stanowi informację strukturalną o zasięgu globalnym. Zazwyczaj w badaniach strukturalnych wykorzystuje się eksperymenty dające możliwość analizy heterojądrowych sprzężeń resztkowych ¹D_{CH} lub ¹D_{NH}. Jednakże znakowanie izotopowe ¹⁵N dostarcza jedynie ograniczonej liczby sprzężeń dipolowych z uwagi na szybką wymianę protonów iminowych z wodą, dla których sprzężenie można by zaobserwować. Dlatego też, w celu uzyskania większej liczby więzów kierunkowych dokonuje się pomiaru wartości D_{CH} dla próbek wzbogaconych lub o naturalnej zawartości izotopu ¹³C. W tym przypadku najczęściej dokonuje się pomiaru wartości ¹D_{C2H2} w resztach adeniny, ¹D_{C8H8} w resztach puryny, ¹D_{C5H5} i ¹D_{C6H6} – w pirymidynach oraz ¹D_{C1'H1'} dla pierścieni cukrowych. Ponieważ związane wiązaniami wodorowymi pary zasad odznaczają się stosunkowo małą swobodą

konformacyjną stąd relatywne orientacje zasad heterocyklicznych mogą stanowić cenne źródło informacji strukturalnych RNA. Okazuje się, iż tylko trzy liniowo niezależne wartości RDC są potrzebne, aby przewidzieć pozostałe sprzężenia RDC w resztach zasad i tym samym określić orientację danej reszty. Pomiar dodatkowych wartości RDC poprawia jednak zarówno dokładność jak i zbieżność wyznaczonych struktur RNA. W celu otrzymania dodatkowych sprzężeń resztkowych w zasadach heterocyklicznych rozwinięto wiele metod NMR¹⁰⁶. Metody te opierają się o dwu i trójwymiarowe eksperymenty pozwalające wyznaczyć wartości stałych sprzężeń również pomiędzy sprzężonymi dipolowo ciężkimi jądrami. Zaproponowanych zostało także wiele innych technik pozwalających otrzymać dodatkowe więzy kierunkowe dla pierścieni cukrowych a także, co ciekawe, wyznaczyć wartości resztkowych sprzężeń dipolowych ^1H - ^1H dalekiego zasięgu, zawierających zarówno informacje o orientacji, jak i odległości pomiędzy konkretną parą oddziałujących jąder. Chociaż otrzymanie więzów kierunkowych nie jest zadaniem prostym, to w badaniach strukturalnych NMR są one coraz szerzej stosowane. Nawet niewielka liczba więzów kierunkowych prowadzi do uzyskania cennych informacji strukturalnych, a przy dostatecznie dużej ich liczbie możliwe jest ustalenie detali porównywalnych z tymi, jakie otrzymać można na podstawie badań krystalograficznych¹¹⁹.

4.1.4. Inne typy więzów. Dodatkowe źródła informacji strukturalnych

Podstawowych informacji o typie parowania zasad dostarcza analiza sygnałów korelacyjnych protonów wymienialnych zaangażowanych w tworzenie wiązań wodorowych. W zależności od stosowanej metody więzy na wiązania wodorowe wprowadzane są z dużą wagą od początku obliczeń, albo uwzględnione zostają jedynie podczas etapu udokładnienia. Ich natura podobna jest do więzów NOE, jednak zadawane są ze znacznie mniejszym zakresem błędu (± 0.1 ; ± 0.2 Å), zazwyczaj pomiędzy donorem i akceptorem oraz donorem i atomem związanym kowalencyjnie z akceptorem, choć stosowane są również inne restrykcje. Coraz częściej w badaniach strukturalnych kwasów nukleinowych wykorzystuje się eksperymenty, w których obserwuje się sprzężenia skalarnie poprzez wiązania wodorowe^{106,120,120,121}. Chociaż zastosowanie tych metod wymaga znakowania izotopowego ^{15}N a często także ^{13}C , to jednak w przypadku występowania niekanonicznych par zasad metody te dostarczają niezwykle cennych informacji. Pozwalają one na jednoznaczną

identyfikację wiązań wodorowych stanowiąc tym samym źródło istotnych dla ustalenia struktury wiązań.

Dla par zasad wprowadzane są również więzy na planarność, które w powszechnie rozumianej definicji mają zorientować oddziałujące pary możliwie koplanarnie, tak jak w strukturach krystalograficznych. Jednakże takie podejście nie ma żadnych podstaw eksperymentalnych i mimo wyraźnej poprawy precyzji otrzymanych struktur, powinno się go raczej unikać. Zrozumiałym wykorzystaniem wiązań na planarność jest takie wyskalowanie stałych siłowych, które pozwoli uzyskać energetycznie uprzywilejowane konformery, lub zdefiniowanie ich w taki sposób, aby ograniczały dostępną przestrzeń konformacyjną tylko do tych obserwowanych w kwasach nukleinowych¹²². Takie podejście poprawia zbieżność struktur lecz nie prowadzi do niepoprawnych wyników.

Struktura podwójnej helisy A-RNA została bardzo dobrze scharakteryzowana na podstawie badań rentgenograficznych, dlatego też dla regionów złożonych z par Watsona-Cricka, podczas etapu udokładnienia struktury, zakresy kątów torsyjnych szkieletu ogranicza się często do prawie idealnych wartości. Takie podejście może być usprawiedliwione przez fakt, iż bardziej interesujące fragmenty RNA (np. pętle terminalne, pętle wewnętrzne, wybrzuszenia) znajdują się poza regionami helikalnymi.

Innym źródłem informacji strukturalnych, które potencjalnie może być wykorzystane podczas obliczeń lub na etapie selekcji końcowych współrzędnych, jest na przykład wiedza o obecności i geometrii centrów wiążących jony metali. Ponadto, w niedalekiej przyszłości całkiem nowego rodzaju wiązań dostarczy zapewne postęp w zrozumieniu źródeł przesunięć chemicznych w kwasach nukleinowych¹²³, która to wiedza w przypadku badań strukturalnych białek jest już standardowo wykorzystywana¹²⁴.

4.2. Algorytmy obliczeniowe

Określenie struktury przestrzennej kwasów nukleinowych na podstawie danych NMR sprowadza się do znalezienia takiej konformacji, dla której energia cząsteczki byłaby najniższa a sama struktura spełniała określone (m.in. w eksperymencie NMR) kryteria. Spośród wielu metod w spektroskopii NMR dotychczas najczęściej stosowane były metody badań strukturalnych biomolekuł oparte na algorytmie DG (ang. *Distance Geometry*) oraz metodach restryktywnej dynamiki molekularnej.

4.2.1. Metoda DG

Metoda DG^{125,126} (ang. *Distance Geometry*) jest pierwszą a zarazem najbardziej ogólną metodą optymalizacyjną wykorzystywaną do określenia struktury całej cząsteczki bądź jej fragmentu, w oparciu o dane NMR. Podejście to stosowane zarówno dla kwasów nukleinowych jak i białek, opiera się na możliwości przedstawienia międzyprotonowych kontaktów NOE oraz większości danych stereochemicznych w postaci macierzy metrycznej¹²⁴. Macierz ta powinna zawierać wartości odległości między wszystkimi atomami cząsteczki. Z teorii wiadomo¹²⁶⁻¹²⁸, że jeśli znane są dokładne wartości wszystkich możliwych odległości między elementami zbioru punktów w trójwymiarowej przestrzeni euklidesowej, to istnieje możliwość ich transformacji na współrzędne kartezjańskie. Główny problem wykorzystania metody DG w badaniach strukturalnych wynika stąd, że nigdy nie posiadamy kompletnego zbioru informacji o odległościach międzyatomowych w cząsteczce, a niewielka liczba danych, którymi dysponujemy obarczona jest pewną granicą błędu. Dlatego w pierwszym etapie następuje określenie metodami triangulacyjnymi granic błędu dla odległości międzyatomowych, o których nie mamy żadnych danych (ang. *bounds smoothing*). Następnie losowo wygenerowany zostaje kompletny zbiór odległości, które zawierają się w określonych wcześniej przedziałach błędu (ang. *metric matrix*). W ten sposób otrzymujemy pełną macierz odległości, która jest następnie transponowana na współrzędne kartezjańskie atomów (ang. *embedding*). Ostatnim etapem protokołu jest optymalizacja długości wiązań i kątów, na przykład metodą gradientów sprzężonych¹²⁹.

Otrzymane tą drogą struktury charakteryzują się zazwyczaj wysoką energią z powodu dużej liczby naprężeń sterycznych oraz oddziaływań niewiązących. Dlatego też stosowane obecnie w badaniach strukturalnych biomolekuł programy ograniczają zastosowanie algorytmu DG do otrzymania współrzędnych startowych będących punktem wyjścia dla innych algorytmów obliczeniowych.

4.2.2. Metody restryktywnej dynamiki molekularnej

4.2.2.1. Restryktywna dynamika molekularna w przestrzeni kartezjańskiej

Metody dynamiki molekularnej, które uwzględniają więzy eksperymentalne, jako dodatkowe warunki (potencjały) ograniczające dowolność zmian współrzędnych atomowych cząsteczki są podstawowymi metodami obliczeniowymi i zebrane są pod wspólną nazwą restryktywnej dynamiki molekularnej (rMD, ang. *restrained Molecular Dynamics*).

Cechą charakterystyczną dynamiki molekularnej w porównaniu do metod opartych tylko na minimalizacji energii jest wprowadzenie energii kinetycznej, której obecność umożliwia pokonywanie barier energii potencjalnej i tym samym znacznie redukuje prawdopodobieństwo uwięzienia cząsteczki w lokalnym minimum potencjału. Dynamika molekularna oparta jest na numerycznym rozwiązywaniu równań ruchu dla układu molekularnego znajdującego się w określonej temperaturze, w celu zarejestrowania ewolucji tego układu. W klasycznej dynamice każde jądro atomowe badanej cząsteczki traktowane jest jako punkt materialny obdarzony ładunkiem elektrostatycznym, a cała cząsteczka jest zbiorem punktów znajdujących się w przestrzeni kartezjańskiej w zadanym polu potencjalnym. Ponieważ każdy taki punkt obdarzony jest trzema stopniami swobody, stąd cała cząsteczka składająca się z N atomów dysponuje liczbą $3N$ stopni swobody. W układzie tym ruch każdego punktu zdefiniowany jest klasycznym równaniem Newtona:

$$m_i \frac{d^2 \vec{r}_i}{dt^2} = \vec{F}_i, \text{ gdzie } \vec{F}_i = -\vec{\nabla} V \quad (10)$$

Całkowanie układu równań ruchu wykonywane jest numerycznie przy zadanych warunkach początkowych, tj. przy znanych położeniach i prędkościach wszystkich jąder atomowych. Współrzędne początkowe mogą być wyznaczone na przykład za pomocą metody DG, lub wygenerowane losowo, natomiast prędkości początkowe jąder atomowych zadawane są stochastycznie zgodnie z rozkładem Maxwella dla określonej (symulowanej) wartości temperatury. Każde jądro atomowe poddawane jest działaniu sił, które wymuszają ruch, a jego energia kinetyczna i potencjalna zmieniają się w czasie zgodnie z prawem ruchu Newtona. Całkowanie równań ruchu odbywa się metodą różnic skończonych co założony okres czasu Δt , najczęściej z wykorzystaniem algorytmu „żabich skoków”¹³⁰ (ang. *leap-frog scheme*), metody Verlet¹³¹ lub metody Beemana¹³². Ważne jest aby wartość przedziału czasowego całkowania była stosunkowo krótka, gdyż zależy ona od najwyższych

częstotliwości oscylacji jąder atomowych cząsteczki. W celu optymalizacji protokołu powszechnie stosuje się praktykę nakładania więzów na istniejące w modelu wiązania chemiczne. Metoda ta zwana SHAKE¹³³ nie powoduje zakłóceń konformacyjnych, lecz pozwala dzięki wydłużeniu czasu całkowania na ograniczenie iteracji niezbędnych do wykonania przez komputer, a tym samym znacznie przyspiesza obliczenia. Po każdym interwale czasowym położenia jąder atomowych ulegają zmianie i mogą być rejestrowane w trakcie obliczeń. Zbiór położzeń atomów zarejestrowany w czasie symulacji tworzy trajektorię układu. Trajektorja ta zależy od parametrów początkowych oraz pola siłowego, zdefiniowanego poprzez energię potencjalną V , wyrażoną wzorem (11):

$$V = \underbrace{V_{bond} + V_{angle} + V_{dih} + V_{impr}}_{V_{cov}} + \underbrace{V_{vdW} + V_{elec}}_{V_{nonb}} + \underbrace{V_{NOE} + V_{cdih} + V_{rdc} + V_{plan} + \dots}_{V_{exp}}, \quad (11)$$

w którym dwa pierwsze człony opisują energie potencjalne związane ze strukturą wiązań kowalencyjnych cząsteczki (V_{cov}), oraz oddziaływaniami niewiążącymi (V_{nonb}). Składnik związany z oddziaływaniami kowalencyjnymi zawiera wielkości równowagowe dla długości wiązań i kątów między wiązaniami oraz stałe siłowe, które określają energię związaną z odchyleniem od struktury zdeterminowanej przez wartości równowagowe, natomiast składnik energii potencjalnej odpowiadający oddziaływaniom niewiążącym zawiera wartości promieni van der Waalsa, ładunki elektrostatyczne i parametry określające oddziaływania Lenarda-Jonesa. W restrykcyjnej dynamice molekularnej obecny jest dodatkowy człon energii potencjalnej związany z energią potencjalną wynikającą z nałożonych na cząsteczkę więzów strukturalnych (V_{exp}), które wyprowadzone zostały z danych eksperymentalnych. Ten potencjał zawiera zarówno wartości przedziałów dla różnych typów więzów eksperymentalnych jak i stałe siłowe, które określają dodatkową energię, przy założeniu, że więzy w strukturze zostaną naruszone. W różnych, stosowanych polach siłowych, powyższy opis może być modyfikowany lub uzupełniany o inne składniki, w celu poprawy reprezentacji różnych rodzajów oddziaływań obecnych w badanym układzie. Takie założenie, w którym całkowita energia układu rozłożona jest na szereg składników pochodzących od poszczególnych typów oddziaływań jest podstawą koncepcji pola siłowego, przy czym warto nadmienić, że składniki te opisywane są równaniami nawiązującymi do znanych z mechaniki klasycznej (poczynając od funkcji kwadratowych, Morse'a, szeregów Fouriera, potencjałów Lenarda-Jonesa itp.).

W powszechnie stosowanym do obliczeń strukturalnych biomolekuł programie X-PLOR, energia potencjalna cząsteczki opisana jest wyrażeniem¹³⁴:

$$V = \sum_{b \in \text{bonds}} k_b (r - r_0)^2 + \sum_{\theta \in \text{angles}} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\phi \in \text{dihedrals}} k_\phi (1 + \cos(n\phi + \delta)) + \sum_{\phi \in \text{impropers}} k_\phi (\phi - \delta)^2 + \sum_{ij} 4\varepsilon_{ij} [(\sigma_{ij}/R_{ij})^{12} - (\sigma_{ij}/R_{ij})^6] + \sum_{ij} q_i q_j C / \varepsilon_0 R_{ij} + \sum_{\text{distance restraints}} k_d \Delta_d^2 + \sum_{\text{angle restraints}} k_a \Delta_a^2 + \dots \quad (12)$$

Parametry k_b , k_θ , k_ϕ , k_a oraz k_d określają stałe siłowe funkcji danego typu oddziaływań, natomiast r_0 , θ_0 , i ϕ – oznaczają odpowiednio długości wiązań chemicznych, kąty pomiędzy tymi wiązaniami oraz kąty torsyjne struktury idealnej znajdującej się w warunkach równowagowych. W potencjale na oddziaływania niewiążące parametr R_{ij} oznacza odległość pomiędzy parą oddziałujących atomów, σ_{ij} – jest wartością proporcjonalną do sumy promieni van der Waalsa, ε oznacza stałą dielektryczną, zaś q_i i q_j – ładunki jąder atomowych. Wszystkie te wartości wyprowadzane są doświadczalnie lub obliczane metodami mechaniki kwantowej i definiowane są dla danego pola siłowego z podziałem na atomy poszczególnych typów potencjału. Spośród powszechniej znanych i stosowanych w przypadku badań kwasów nukleinowych pól siłowych warto wymienić pole AMBER¹³⁵⁻¹³⁷, CHARMM¹³⁸, CVFF¹³⁹, GROMOS¹⁴⁰ i OPLS¹⁴¹.

W porównaniu do klasycznych metod dynamiki molekularnej, których celem jest symulacja zachowania się badanego układu do rzeczywistego systemu fizycznego jak najdokładniej, istotą restryktywnej dynamiki molekularnej jest znalezienie w dostępnej przestrzeni konformacyjnej stabilnej struktury o minimalnej energii potencjalnej, która dodatkowo zgodna byłaby z danymi eksperymentalnymi. Dlatego też podczas dynamiki molekularnej cała przestrzeń konformacyjna powinna być wielokrotnie przeszukana w celu znalezienia najbardziej stabilnej struktury z zachowanymi warunkami eksperymentalnymi. Uzyskane tą metodą wyniki powinny być niezależne od punktu wyjścia, który obierany jest arbitralnie. W stosowanych powszechnie podejściach najczęściej wychodzi się z różnych punktów startowych i sprawdza zbieżność ostatnich klatek zarejestrowanych trajektorii, które w przypadku badań NMR stanowią poszukiwane rozwiązanie struktury. Jeżeli uzyskana zbieżność jest duża oznacza to, że liczba więzów jest wystarczająca, a struktura dobrze określona.

4.2.2.2. Restryktywna dynamika molekularna w przestrzeni kątów torsyjnych

Dynamika molekularna w przestrzeni kątów torsyjnych (TAMD, ang. *Torsion Angle Molecular Dynamics*) stanowi obecnie najbardziej efektywną metodę stosowaną w badaniach strukturalnych biomolekuł metodami NMR¹²⁴. Metoda TAMD pozwala na zmniejszenie liczby stopni swobody badanego układu poprzez zastąpienie współrzędnych kartezjańskich odpowiednimi wartościami kątów torsyjnych. Dodatkowo zmiana ta pociąga za sobą konieczność zastąpienia równań ruchu Newtona równaniami Lagrange'a, stąd w klasycznej dynamice w przestrzeni kątów torsyjnych równanie ruchu przedstawia się następująco¹⁴²:

$$\frac{d}{dt} \left(\frac{\partial L}{\partial \dot{\theta}_k} \right) - \frac{\partial L}{\partial \theta_k} = 0 \quad (k = 1, \dots, n), \quad (13)$$

gdzie L jest funkcją Lagrange'a będącą sumą energii kinetycznej i potencjalnej badanego układu, natomiast θ określa wartość danego kąta torsyjnego w cząsteczce. Ponieważ podejście takie w przypadku dużych cząsteczek (kwasów nukleinowych, białek) jest czasowo zbyt kosztowne, stąd opracowane zostały różne algorytmy w celu optymalizacji obliczeń, z których najważniejsze to zaimplementowany w programie X-PLOR algorytm Bae¹⁴³ oraz stosowany w aplikacji Cyana¹⁴⁴ algorytm Jaina¹⁴⁵.

W dynamice molekularnej w przestrzeni kątów torsyjnych cząsteczka jest postrzegana jako rozgałęziony łańcuch kinematyczny w postaci dendrytu. W modelu tym wyróżnić można szereg ogniów, połączonych pojedynczymi wiązaniami, wokół których ogniwa te mogą się obracać. W przypadku dynamiki kwasów nukleinowych wiązania umożliwiające rotacje poszczególnych ogniów to wiązania glikozydowe oraz wiązania w szkielecie fosforocukrowym. Obroty wokół tych wiązań są zdefiniowane przez odpowiednie kąty torsyjne (Rozdział III.1), a zbiór tych kątów dokładnie określa konformacje cząsteczki. Warto wspomnieć, iż w przeciwieństwie do metod dynamiki klasycznej, w metodzie TAMD odległości między atomami związanymi kowalencyjnie, a także kąty płaskie między nimi zawsze są zachowane. W zastosowaniu do badań strukturalnych metody dynamiki w przestrzeni kątów torsyjnych, podobnie jak metody dynamiki w przestrzeni kartezjańskiej zazwyczaj wspomagane są metodą symulowanego wyżarzania.

4.2.2.3. Metoda symulowanego wyżarzania (SA, ang. *simulated annealing*)

Opracowany przez Kirkpatricka¹⁴⁶ i zmodyfikowany przez Nilgеса¹⁴⁷ algorytm optymalizacji zwany symulowanym wyżarzaniem jest obecnie najbardziej popularną metodą wykorzystywaną do obliczeń strukturalnych zarówno kwasów nukleinowych jak i białek. Można powiedzieć, że metoda SA jest zaadaptowanym na potrzeby obliczeń strukturalnych rozwinięciem dynamiki molekularnej, w którym dla zmniejszenia prawdopodobieństwa uwięzienia w jednym z lokalnych minimów powierzchni energii potencjalnej cząsteczki i tym samym sprawniejszej penetracji przestrzeni konformacyjnej układu, stosowany potencjał podlega ciągłym zmianom w czasie¹⁴⁸. Pokonanie barier energetycznych, a tym samym modyfikacja trajektorii układu, odbywa się poprzez zmianę parametrów takich, jak temperatura i stałe siłowe określające potencjał. Stąd też metoda ta jest bardziej skuteczna i wydajna aniżeli klasyczne podejście stosowane w rMD. Różne grupy badawcze używają różnych protokołów dynamiki SA, a ich cechą wspólną jest między innymi zredukowanie pola siłowego, czyli nie uwzględnianie oddziaływań elektrostatycznych, dalekiego zasięgu oraz wpływu rozpuszczalnika. Każdy protokół dynamiki SA obejmuje wysokotemperaturową fazę przeszukiwania przestrzeni konformacyjnej (etap próbkowania), po której następuje powolne schładzanie układu (zwijanie, porządkowanie). Punktem wyjścia jest stan, w którym początkowa temperatura układu jest bardzo wysoka, a atomy osiągają bardzo wysoką średnią energię kinetyczną, która umożliwia pokonanie przez układ wysokich barier energii potencjalnej. Często w fazie tej potencjały na więzy eksperymentalne i oddziaływania van der Waalsa zostają częściowo zredukowane i pozostają zamrożone do końca etapu bądź też, w zależności od protokołu, wzrastają liniowo w kolejnych iteracjach. W następnym etapie temperatura jest powoli obniżana, a całkowita energia układu maleje. Współczynniki określające energie naruszonych więzów przyjmują w tej fazie maksymalne wartości, co prowadzi do zwinięcia struktury, gdyż cały układ dąży do zachowania tych więzów. Ważne jest, aby zarówno czas poszczególnych etapów był odpowiednio dobrany jak i temperatura. Zbyt szybkie schładzanie uniemożliwi wystarczające zbadanie przestrzeni konformacyjnej, natomiast nieodpowiednio zadane temperatury spowodują, że cząsteczka nie będzie potrafiła pokonać mniejszych barier potencjału albo „ucieknie” z globalnego minimum. Ostatnim etapem protokołu metody SA jest minimalizacja energii. Stosowane są tutaj różne podejścia, z których warto wyróżnić najczęściej stosowaną metodę najostrejszego spadku (ang. *steepest descent algorithm*), która umożliwia szybszą eliminację lokalnych nieregularności konformacyjnych oraz metodę gradientów sprzężonych¹²⁹ (ang. *conjugate gradients*

algorithm) pozwalającą na efektywniejsze znalezienie najbliższego minimum energii bardziej złożonej cząsteczki.

Metoda SA pozwala zbadać zdecydowanie większy obszar przestrzeni konformacyjnej, daje również lepszą zbieżność z danymi eksperymentalnymi, niezależnie od przyjętych struktur początkowych. W różnych wariantach znajduje zastosowanie zarówno do badań strukturalnych kwasów nukleinowych^{83,96,149}, białek¹⁵⁰ i analizy procesów zwijania większych cząsteczek RNA¹⁵¹. Przeprowadzone dodatkowo testy wykazały, że w połączeniu z dynamiką TAMD, metoda symulowanego wyżarzania odznacza się zdecydowanie większą wydajnością niż metoda DG, czy konwencjonalne algorytmy SA w przestrzeni kartezyjskiej^{152,153}.

4.3. Kryteria oceny otrzymanych struktur - precyzja i dokładność

Istotnym etapem badań strukturalnych metodami NMR jest analiza otrzymanych w trakcie obliczeń struktur, zawartych w dostępnej dla badanego obiektu przestrzeni konformacyjnej. Z zagadnieniem tym związane są takie pojęcia jak precyzja (ang. *precision*) oraz dokładność (ang. *accuracy, quality*) z jaką struktury zostały otrzymane^{28,100}. Precyzja jest miarą podobieństwa pomiędzy otrzymanymi strukturami, podczas gdy dokładność stanowi miarę podobieństwa otrzymanych struktur do poprawnej struktury, o ile taka struktura jest znana. Dlatego też dokładność może zostać oceniona jedynie w przypadku, gdy współrzędne struktury, do której dążymy są znane. Jednakże stosowane są pewne metody, które w sposób pośredni pozwalają na ocenę dokładności otrzymanych współrzędnych. Stąd w pierwszym kroku analizy dokonuje się selekcji struktur, które najlepiej zgadzają się z danymi eksperymentalnymi oraz odpowiadają określonym warunkom stereochemicznym. Podstawową formą wyboru końcowych struktur ze zbioru wszystkich otrzymanych konformerów jest analiza statystyczna naruszonych (dla tych struktur) więzów (ang. *violations*). Przyjmuje się, że jeśli dla danej struktury istnieje znaczna liczba naruszonych więzów, o wartościach przekraczających o 0.5 Å dopuszczalne granice, to taką strukturę należy odrzucić. Podobne kryterium zakłada się w przypadku więzów kątowych, dla których dopuszczalna tolerancja niezgodności z zadaniem przedziałem wynosi 5°.

Pomimo, że obecnie nie są one szeroko stosowane, istnieje kilka innych metod mających na celu określenie stopnia zgodności wyznaczonych struktur z danymi NMR^{123,154,155}. Spośród nich warte przytoczenia są metody definiujące tzw. czynnik R , J_{RMS} lub Q . Wzorowany na analogicznym parametrze stosowanym w badaniach krystalograficznych,

czynnik R określa różnice pomiędzy otrzymanymi z eksperymentu a oczekiwanymi teoretycznie (wyznaczonymi na przykład metodą RMA¹⁵⁶) wartościami NOE. Wśród kilku zaproponowanych^{154,157,158}, jednym z częściej używanych jest czynnik R wyrażony wzorem:

$$R = \frac{\sqrt{\sum_{i,j} ((A_{ij}^{\text{exp.}})^{1/6} - (A_{ij}^{\text{teor.}})^{1/6})^2}}{\sum_{i,j} (A_{ij}^{\text{exp.}})^{1/6}}, \quad (14)$$

gdzie $A_{ij}^{\text{exp.}}$ i $A_{ij}^{\text{teor.}}$ oznaczają odpowiednio eksperymentalną i teoretyczną objętość sygnału pomiędzy każdą parą atomów i oraz j , dla których efekt NOE został zmierzony.

Drugi parametr J_{RMS} , określa odchylenie standardowe liczone pomiędzy obserwowanymi w widmach ($J_{ij}^{\text{exp.}}$) a wyznaczonymi z końcowych struktur ($J_{ij}^{\text{teor.}}$) wartościami wicynalnych sprzężeń skalarnych i opisany jest wzorem¹⁵⁹:

$$J_{RMS} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i,j} (J_{ij}^{\text{exp.}} - J_{ij}^{\text{teor.}})^2}, \quad (15)$$

gdzie sumowanie przebiega po wszystkich kątach torsyjnych, dla których wartości sprzężeń skalarnych zostały wyznaczone z eksperymentów NMR.

Natomiast zgodność (lub rozbieżność) między otrzymanymi eksperymentalnie ($D^{\text{exp.}}$) wartościami resztkowych sprzężeń skalarnych a wyznaczonymi z modelu ($D^{\text{teor.}}$) określa ostatni - czynnik Q , zdefiniowany równaniem¹⁶⁰:

$$Q = \frac{\text{rms}(D^{\text{exp.}} - D^{\text{teor.}})}{\text{rms}(D^{\text{exp.}})}. \quad (16)$$

Istotnym kryterium wyboru, często decydującym o doborze finalnych struktur, jest również selekcja konformerów pod kątem ich energii całkowitych. Spośród struktur spełniających powyższe kryteria dokonuje się selekcji tych, które charakteryzują się najniższą energią.

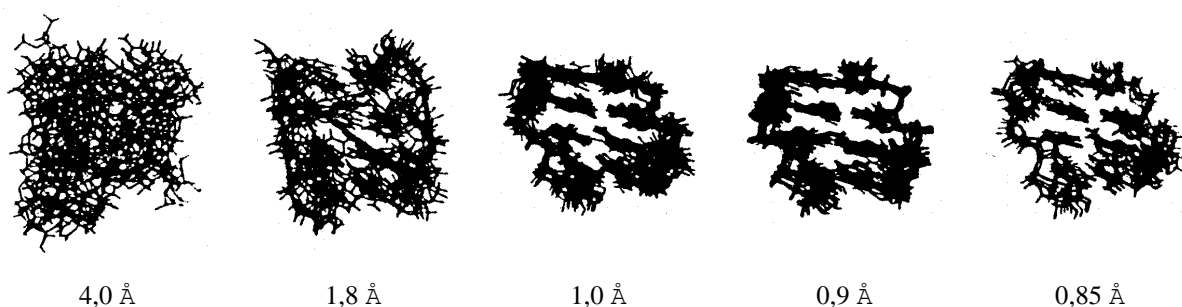
Powszechnie stosowanym parametrem służącym do określenia podobieństwa zbioru struktur jest średnie odchylenie standardowe, $RMSD$ ^{28,100} (ang. *Root Mean Square Deviation*). Wartość parametru $RMSD$ pomiędzy współrzędnymi dwóch nałożonych na siebie struktur

wyznaczana jest za pomocą wyrażenia:

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N [(x_i - x_i')^2 + (y_i - y_i')^2 + (z_i - z_i')^2]}, \quad (17)$$

gdzie x_i , y_i , z_i są współrzędnymi i -tego atomu jednej struktury, natomiast x_i' , y_i' , z_i' współrzędnymi odpowiedniego atomu drugiej struktury.

Istnieje kilka metod określania zbieżności rodziny struktur, przy czym każda z nich prowadzi do nieco innego wyniku¹⁰⁰. Najczęściej stosowanym podejściem jest wyznaczenie średniej ze wszystkich $N(N-1)/2$ wartości RMSD liczonych dla każdej możliwej pary w zbiorze. Alternatywną drogą określenia zróżnicowania konformacyjnego struktur jest odniesienie pozycji poszczególnych atomów nie do struktury wyjściowej, ale do uśrednionej struktury. Przykłady różnej zbieżności struktur RNA, otrzymane z obliczeń przy wykorzystaniu odmiennej liczby więzów NOE przedstawione zostały na rysunku 17.



Rys. 17. Superpozycja struktur pętli 20-meru RNA otrzymanych drogą obliczeń z wykorzystaniem różnej liczby więzów strukturalnych²⁸. Poniżej struktur podana została średnia wartość RMSD.

Warto zaznaczyć, że jeśli zbiór struktur charakteryzuje się dużą zbieżnością, ale otrzymane struktury mają złą geometrię lub powodują wiele naruszeń więzów, to nie mogą one być spójne z danymi NMR. Z drugiej strony, jeśli w strukturach jest mało naruszonych więzów i parametrów geometrii, ale precyzja jest zła, to ilość informacji eksperymentalnych nie wystarcza do dokładnego określenia struktury.

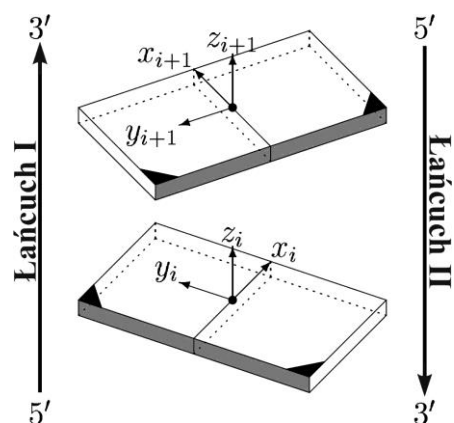
5. Parametry helikalne

Najpełniejszy a zarazem najbardziej szczegółowy opis konformacji fragmentu kwasu nukleinowego wymaga podania $3N$ współrzędnych kartezjańskich dla N atomów cząsteczki. Możliwe jest jednak znaczne zredukowanie tej ilości danych¹⁶¹. Uwzględniając długości wiązań kowalencyjnych oraz kąty płaskie między tymi wiązaniami, można w oparciu o wartości kątów torsyjnych opisać pełną strukturę, która nie zależy od układu współrzędnych. W takim opisie pofałdowanie pierścienia cukrowego przyjęło się określać poprzez podanie dwóch parametrów: kąta fazowego pseudorotacji oraz amplitudy pofałdowania. Stąd każdy nukleotyd można opisać podając wartości dziewięciu zmiennych: sześciu kątów torsyjnych szkieletu fosforocukrowego, $\alpha - \zeta$ (Rys. 5), kąta glikozydowego χ (Rys. 2) oraz kąta fazowego pseudorotacji P i amplitudy pofałdowania cukru v_{max} (Rys. 3 i 4). Te parametry nie są jednakże zbyt informatywne podczas opisu kształtu całej molekuly. Ponieważ cząsteczki kwasów nukleinowych często tworzą struktury helikalne, do opisu ich geometrii stosuje się tak zwane parametry helikalne, które wprowadzone zostały po raz pierwszy w latach pięćdziesiątych podczas analizy dyfrakcyjnych włókien DNA¹⁶¹.

Obecnie do opisu struktur helikalnych kwasów nukleinowych stosowane są parametry, które przyjęte zostały w 1988 roku, zatwierdzoną przez IUPAC konwencją^{162,163} (*Cambridge convention*). Pozwoliła ona ujednoczyć opis geometrii podwójnej helisy i wyeliminować inne, często niespójne ze sobą metody opisu. Zdefiniowane w *Cambridge convention* parametry helikalne otrzymywane są z przestrzennej lokalizacji zasad heterocyklicznych i tworzą zbiór parametrów rotacyjnych i translacyjnych. Ustalono również, iż znak parametrów translacyjnych wyznaczony jest przez kierunki odpowiednich osi układu, natomiast parametrów rotacyjnych przez regułę prawej dłoni. Parametry obliczane są względem lokalnych układów odniesienia wyznaczonych dla każdej pary nukleotydów lub względem osi helikalnej wyznaczonej przez punkty początkowe układów lokalnych (Rys. 18).

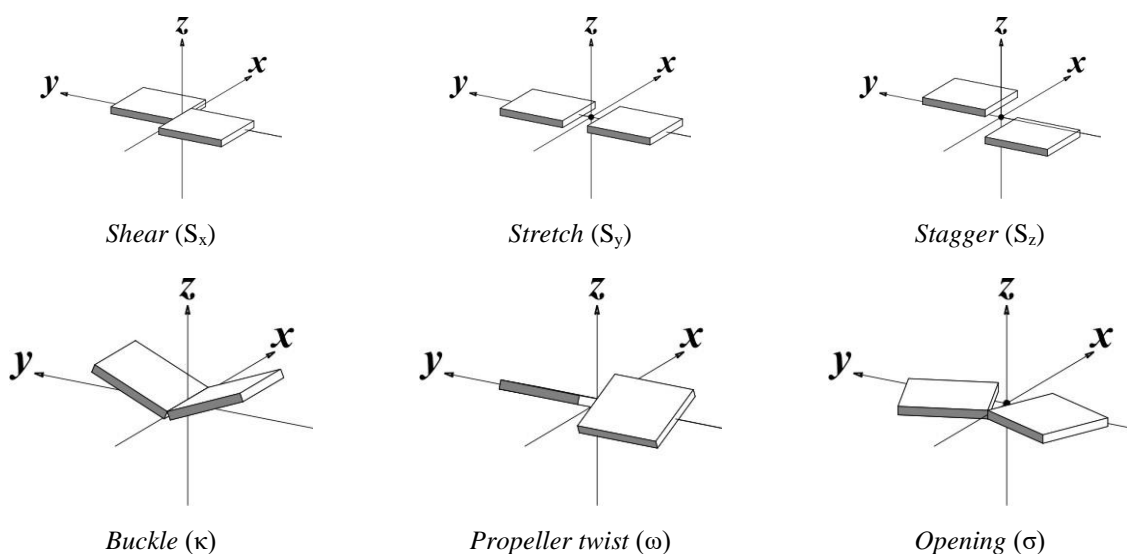
Wszystkie parametry helikalne można podzielić na trzy podstawowe grupy:

- lokalne parametry między zasadami (ang. *Intra-base pair parameters*)
- lokalne parametry między parami zasad (ang. *Inter-base pair parameters*)
- globalne parametry pary zasad względem osi głównej helisy (ang. *Global base pair-axis parameters*)



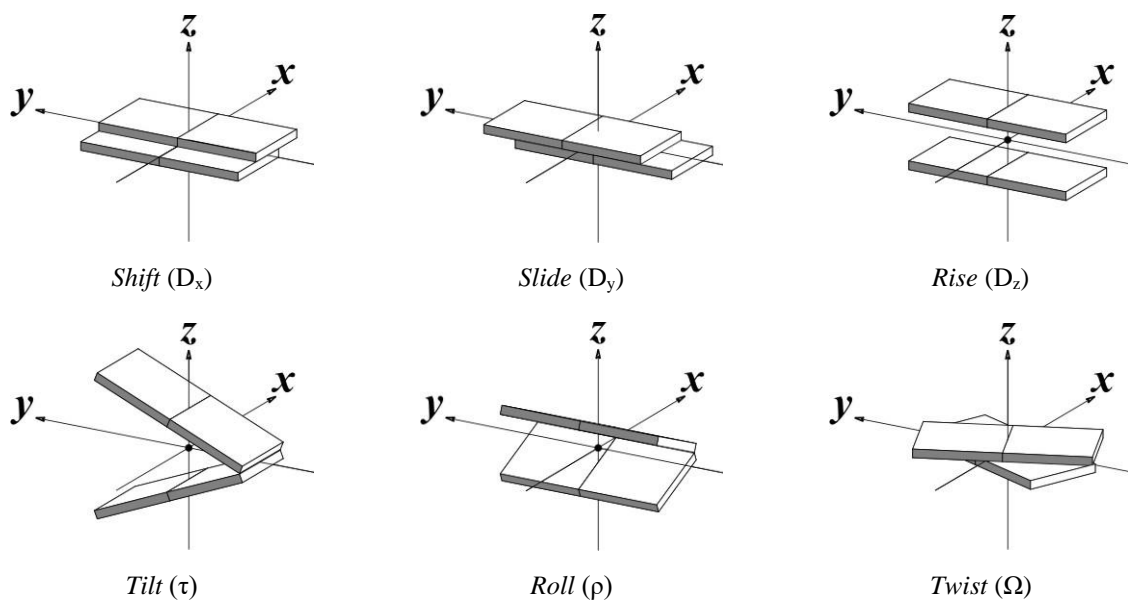
Rys. 18. Schemat układów lokalnych dla dwóch sąsiednich par zasad dupleksu.

Lokalne parametry między zasadami określają położenie oraz wzajemną orientację parujących się zasad. Grupa ta obejmuje trzy niezależne parametry translacji w kierunkach osi x , y i z lokalnego układu współrzędnych, oraz trzy parametry rotacji zasad heterocyklicznych wokół osi układu odniesienia. Nazwy wraz z symbolami oraz schematy parametrów przedstawione zostały na rysunku 19.



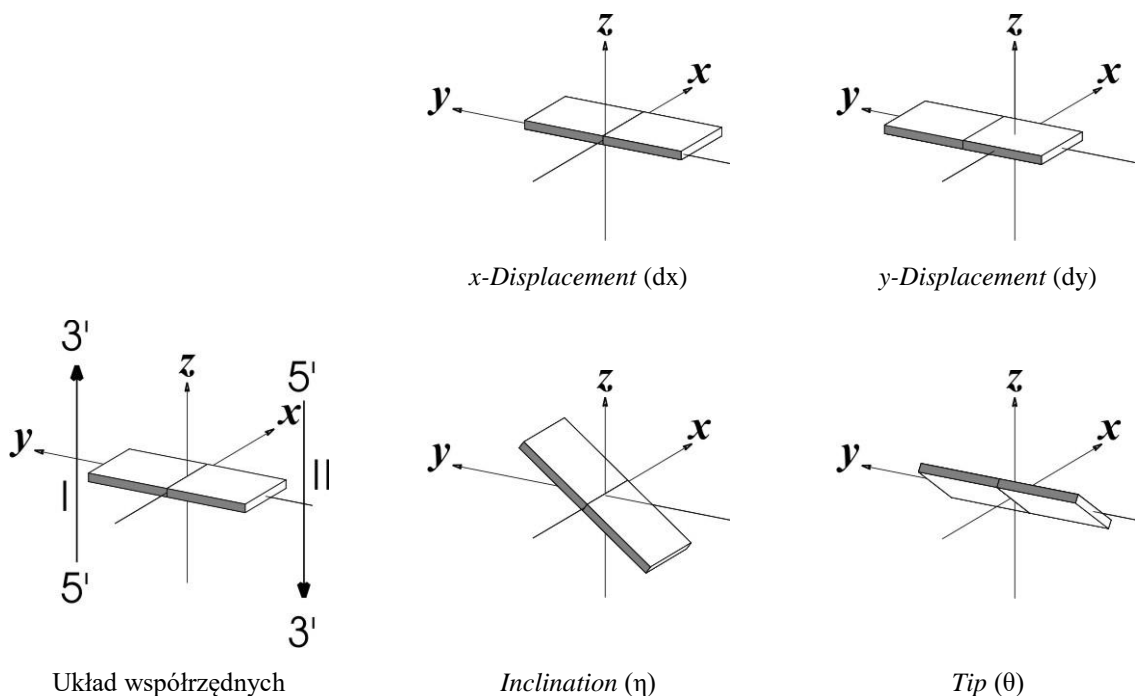
Rys. 19. Lokalne parametry helikalne określające wzajemne położenie dwóch sąsiadujących zasad.

Lokalne parametry między parami zasad opisują wzajemną relację dwóch sąsiadujących ze sobą par. Zbiór ten składa się z sześciu niezależnych parametrów helikalnych – trzech parametrów translacyjnych oraz trzech rotacyjnych. Ich nazwy, symbole i schematy przedstawia rysunek 20.



Rys. 20. Lokalne parametry helikalne określające położenie sąsiadujących ze sobą par zasad.

Globalne parametry helikalne opisują geometrię kanonicznej pary zasad względem wyznaczonej głównej osi dupleksu. Do grupy tej należą dwa parametry związane z położeniem pary zasad względem osi głównej dupleksu oraz dwa, określające nachylenie danej pary w stosunku do tej osi (Rys. 21).



Rys. 21. Globalne parametry helikalne dla pary zasad względem osi głównej cząsteczki.

Pomimo zdefiniowania parametrów helikalnych (ustalenia ich nazw i zbioru wartości) nadal istnieje potrzeba ścisłego określenia sposobu, w jaki parametry te mają być obliczane. Konwencja nie podaje bowiem algorytmu ich wyznaczania. W związku z powyższym obecne programy^{30,31,164-170} wykorzystywane do obliczeń parametrów helikalnych dają wyniki, które mogą się nieznacznie między sobą różnić. W konwencji Cambridge nie zdefiniowano także układu odniesienia dla niekanonicznych par zasad, jednoniciowych fragmentów, trypleksów i kwadrupleksów. Ponadto niektóre programy obliczają dodatkowe parametry, takie jak: zakrzywienie osi helisy, wielkość dużej i małej bruzdy, średnicę dupleksu itp., które jak dotąd również nie zostały znormalizowane.

Jedną z aplikacji powstałych z myślą o otrzymaniu pełnego opisu konformacji kwasów nukleinowych, uwzględniającego rekomendacje *Cambridge convention*, jest program Curves^{30,31}, którego kolejne wersje są powszechnie stosowane w wielu laboratoriach już od kilkunastu lat. Jego rozwój kierowany był chęcią poszerzenia podejścia stosowanego dla regularnych struktur helikalnych, również do opisu geometrii układów nieregularnych³¹. Dzięki możliwości definiowania lokalnych układów współrzędnych dla każdej reszty heterocyklicznej, program ten pozwala obliczyć parametry helikalne dla pojedynczych nici i dla struktur wieloniciowych (dupleksów, trypleksów i kwadrupleksów), przy czym w tym drugim przypadku parametry helikalne mogą zostać obliczone także względem wyznaczonej osi helikalnej. Algorytm sprawdza się dobrze również w przypadku modyfikowanych jednostek nukleotydowych, fragmentów łańcucha fosforocukrowego pozbawionych zasad azotowych (ang. *abasic sites*), dupleksów z wybrzuszeniami, lub niesparowaniami. Ponadto program daje możliwość obliczenia parametrów konformacyjnych łańcucha fosforocukrowego, pofałdowania pierścieni cukrowych, kątów wokół wiązań N-glikozydowych, wykonuje analizę geometrii dużej i małej bruzdy wyznaczając ich szerokość i głębokość oraz oblicza średnicę podwójnej helisy. Alternatywnymi aplikacjami dającymi możliwość wyznaczenia parametrów helikalnych kwasów nukleinowych są programy FreeHelix¹⁶⁹ oraz 3DNA¹⁷⁰.

IV. OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ WŁASNYCH

1. Część eksperymentalna

1.1. Przygotowanie próbek

Wszystkie badane przeze mnie oligorybonukleotydy (5'-GCAGAGAGCG-3', 5'-GCAGAAGAGCG-3', 5'-GCAGAAAGAGCG-3', 5'-GCAGAAAAGAGCG-3', 5'-CGCUCUCUGC-3', 5'-GUCGAGCUG-3', 5'-GUCGUGCUG-3' i 5'-CAGCCGAC-3') otrzymane zostały na drodze syntezy chemicznej (syntetyzer 392 RNA/DNA Applied Biosystems) metodą amidofosforynową na podłożu stałym¹⁷¹. Po syntezie każdy z oligorybonukleotydów wraz z podłożem przeniesiono z kolumnki do próbki, dodano 2 ml metyloaminy i pozostawiono na około 18 godzin w temperaturze pokojowej. Następnie podłoże odsączono i przepłukano czterokrotnie mieszaniną EtOH/CH₃CN/H₂O w stosunku objętościowym 3:1:1, a uzyskane roztwory odparowano do sucha. Osuszone próbki zalano 0.5 ml 98% trójfluorowodorkiem trójetyloaminy i pozostawiono na 21 godzin w temperaturze pokojowej, po czym przystąpiono do procesu odsalania oligorybonukleotydów. W tym celu użyto kolumn zawierających silanizowane podłoże C18 (Sep-Pak firmy Waters), które przed procedurą odsalania przemyte zostały 10 ml acetonitrylu oraz 10 ml 10 mM wodnego roztworu wodorowęglanu amonu. Dopiero na tak przygotowane kolumny naniesiono próbki rozcieńczone do objętości 10 ml 10 mM roztworem wodorowęglanu amonu. W każdym przypadku zebrane zostały po trzy frakcje: L – przesącz, otrzymany bezpośrednio po nałożeniu próbki na kolumnę, frakcję W – uzyskaną po przepłukaniu kolumny 10 ml 10 mM roztworem wodorowęglanu amonu, oraz frakcję właściwą – C, zebraną po wymyciu oligorybonukleotydu z kolumny 6 ml 30% wodnego roztworu acetonitrylu. Następnie frakcję C odparowano do sucha a pozostałe – L i W sprawdzono na obecność oligomerów.

Po odblokowaniu i odsoleniu, próbki z frakcji C rozpuszczono w 150 µl wody w celu wydzielenia poszczególnych oligorybonukleotydów na silikażelowych płytach TLC. Przy czym krótsze oligonukleotydy (do 10 nukleotydów) były oczyszczane na płycie silikażelowej przy użyciu mieszaniny nPrOH/NH₄OH/H₂O w stosunku objętościowym 55:35:10, natomiast dłuższe nici – mieszaniną w stosunku 52:38:10 v/v/v. Po zakończeniu rozdziału prążki zawierające badane oligorybonukleotydy wycięto z płytki silikażelowej i eluowano trzykrotnie 2 ml wody po czym odparowano do sucha. Dla każdego oligonukleotydu

dokonano pomiaru masy cząsteczkowej metodą MALDI w celu sprawdzenia poprawności oligonukleotydu.

W celu dodatkowego sprawdzenia czystości syntetyzowanych oligomerów do badań NMR, wykonane zostały widma ^1H NMR w D_2O . Ponieważ otrzymany materiał zawierał szcążkowe ilości ubocznych produktów procesu odblokowania, konieczne było poddanie próbek dodatkowemu etapowi oczyszczania na kolumnach Sep-Pak.

Końcowe stężenia otrzymanych oligomerów obliczone zostały na podstawie prowadzonych w temperaturze 80°C pomiarów absorbancji, używając znanych wartości współczynników ekstynkcji¹⁷². W celu otrzymania dupleksów I-VI odpowiednie nici RNA rozpuszczono w wodzie w stosunku molowym 1:1. Asocjacja nici w dupleksach oraz ich czystość sprawdzane były za pomocą widm ^1H NMR.

Przed każdą serią pomiarową próbki były trzykrotnie odparowywane (w strumieniu gazu obojętnego – azotu lub helu) z buforem (99.8% D_2O) zawierającym 50 mM NaCl, 10mM fosforanu sodu i 0.1 mM EDTA (pH 6.8), a następnie rozpuszczone w 99.96% D_2O i umieszczone w probówce Shigemi. Końcowe stężenie badanych próbek wynosiło około 1 mM. Po przeprowadzeniu wszystkich eksperymentów ^1H , ^{13}C oraz ^{31}P NMR w D_2O została przeprowadzona analiza sygnałów pochodzących od protonów wymienialnych. W tym celu próbki powtórnie odparowano i rozpuszczono w roztworze $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ w stosunku objętościowym 9:1. Przed każdą serią pomiarową, w celu otrzymania prawidłowej asocjacji dupleksów, próbki podgrzewane były do temperatury 80°C a następnie powoli schładzane do temperatury pokojowej.

1.2. Opis stosowanych w badaniach technik spektroskopii NMR

Widma NMR dupleksów RNA wykonane zostały na spektrometrze Bruker Avance 600 w Środowiskowym Laboratorium Unikalnej Aparatury Chemicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza. Spektrometr ten posiada trzy kanały częstotliwości i wyposażony jest w aktywnie ekranowany magnes nadprzewodzący UltraShield™, wytwarzający stałe pole magnetyczne o indukcji 14.095 T. Wszystkie pomiary NMR wykonywane były na sondzie z odwrotnym układem cewek i Z-gradientem (TBI - *inverse triple* $^1\text{H}/\{^{31}\text{P}\}/\text{BB}$, ^2H lock). Kontrolowane warunki pomiarowe uzyskiwano dzięki przystosowanemu do pomiarów dla biomolekuł układowi długoterminowej stabilizacji temperatury (BCU-5). Dodatkowo były wykonane widma na spektrometrze Bruker Avance II

400 w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN. Źródłem stabilnego, jednorodnego pola magnetycznego tego spektrometru jest ekranowany magnes nadprzewodzący (UltraShield Plus™) o indukcji pola magnetycznego 9.397 T. Do pomiarów NMR wykorzystano sondę z detekcją odwrotną (*Inverse Broadband Probehead H-BB-D*) wyposażoną w cewkę ^1H oraz szerokopasmową (o zakresie częstotliwości $^{31}\text{P} - ^{109}\text{Ag}$). System pozwalał na generowanie impulsów kształtowanych na obu kanałach częstości radiowej oraz posiadał generator gradientów w kierunku osi Z. Ponadto spektrometr wyposażony był w jednostkę kontroli temperatury oraz urządzenie BCU-5, umożliwiające prowadzenie długoterminowych pomiarów w zakresie od -5°C do temperatury pokojowej. Układ ten pozwalał na stabilizację temperatury pomiaru z dokładnością do 0.5°C . Otrzymane dane eksperymentalne przetwarzałem za pomocą programu Topspin 2.0 (Bruker), a następnie analizowałem w programie Felix 2002 (*Accelrys*).

Jednowymiarowe widma ^1H NMR (600 MHz, D_2O) wykonane zostały w temperaturach 20, 25 i 30°C . Szerokość spektralna widma (sw – ang. *spectral width*) wynosiła 5.4 kHz, czas akwizycji (at – ang. *acquisition time*) – 6 s, natomiast czas d1, potrzebny na relaksację układu (ang. *relaxation delay*) około 2 s. Resztkowy sygnał wody tłumiony był przyłożonym w tzw. czasie oczekiwania, pojedynczym impulsem o małej mocy (ang. *presaturation*). W celu poprawy stosunku sygnału do szumu, w każdym eksperymencie akumulowano średnio 64 przebiegi (ang. *scans, transitions*) składające się z 64K (1K = 1024) zespolonych punktów pomiarowych (ang. *complex points*). Podczas obróbki danych przeprowadziłem apodyzację sygnałów funkcją wykładniczą ze stałą poszerzenia linii (lb – ang. *line broadening*) równą 0.3 Hz.

W przypadku widm 1D ^1H NMR otrzymanych w D_2O przy częstotliwości rezonansowej 400 MHz, szerokość spektralna wynosiła sw = 4 kHz, czas akwizycji at = 8.2 s, a czas oczekiwania d1 = 1 s. Pomiary przeprowadzono w temperaturach 25 oraz 30°C , przy czym w każdym eksperymencie rejestrowano średnio 32 sygnały precesji swobodnej zawierające 64K zespolonych punktów pomiarowych.

Jednowymiarowe różnicowe widma ^1H NMR NOE (600 MHz, 90% $\text{H}_2\text{O}/10\%$ D_2O) zostały zarejestrowane przy selektywnym naświetlaniu pojedynczą częstotliwością rezonansową w temperaturach 2 i 10°C . Widma zebrane były przy szerokości spektralnej sw = 14 kHz, czasie akwizycji at = 0.5 s i czasie oczekiwania d1 = 2 s. Każdy sygnał swobodnej precesji (FID – ang. *Free Induction Decay*) był sumą 512 spójnych rejestracji i składał się z 16K zespolonych punktów pomiarowych. Przed transformacją Fouriera (FT,

ang. *Fourier transformation*) dokonałem apodyzacji sygnałów funkcją wykładniczą, dla której wartość parametru $lb = 3$ Hz.

Jednowymiarowe widma ^1H NMR (600 MHz, 90% $\text{H}_2\text{O}/10\%$ D_2O) wykonane zostały w temperaturze 10°C z zastosowaniem sekwencji 3-9-19 WATERGATE¹⁷³ do wytłumienia sygnału wody. Eksperymenty wykonane były przy szerokości spektralnej $sw = 13$ kHz z czasem akwizycji $at = 2.48$ s oraz czasem oczekiwania $d1$ wynoszącym 2 s. Za każdym razem w trakcie pomiaru dokonano akumulacji 64 przebiegów czasowych, które zawierały 64K zespolonych punktów pomiarowych. Podobnie, jak w przypadku widm wykonanych w D_2O , podczas obróbki danych przeprowadziłem apodyzację sygnałów precesji swobodnej funkcją wykładniczą.

Dwuwymiarowe, fazoczułe widma NOESY¹⁷⁴ (600 MHz, D_2O) wykonane były przy trzech różnych czasach mieszania $\tau_m = 50, 150$ i 400 ms. Czulość fazową w kierunku $t1$ otrzymano stosując metodę States-TPPI¹⁷⁵. W eksperymencie zebranych zostało 2K zespolonych punktów pomiarowych w kierunku $t2$ oraz 512 inkrementów w kierunku $t1$, przy czym każdy składał się przeważnie z 96 spójnych rejestracji sygnałów precesji swobodnej. Widma wykonane były przy szerokości spektralnej $sw = 5.4$ kHz, z interwałem czasowym $d1 = 1.5$ s. Czas akwizycji wynosił 2 s. Podobnie jak w przypadku widm jednowymiarowych, do wygaszenia resztkowego sygnału HOD zastosowano metodę nasyceniową^{176,177} (ang. *presaturation*). Aby ułatwić przypisanie sygnałów rezonansowych, oraz wyciągnięcie informacji strukturalnych, pomiary efektu NOE zostały przeprowadzone w trzech różnych temperaturach: $20, 25$ i 30°C . Podczas przetwarzania danych w obu kierunkach zastosowano sinusoidalną funkcję ważącą przesuniętą w fazie o 30° . W celu poprawy rozdzielczości widm dokonałem ekstrapolacji sygnału swobodnej precesji metodą liniowej predykcji¹⁷⁸ (LP, ang. *linear prediction*). Korektę linii bazowej przetransformowanej macierzy przeprowadzono w kierunku F2 za pomocą funkcji wielomianowej.

Wykonane zostały także eksperymenty 2D NOESY w D_2O przy częstotliwości 400 MHz. Widma zarejestrowane zostały z czasem mieszania 150 i 400 ms w temperaturze 25°C . Szerokość spektralna wynosiła 3.4 kHz a czas akwizycji $at = 0.4$ s. Pozostałe parametry akwizycyjne, a także stosowane metody cyfrowej obróbki były takie same, jak w przypadku widm wykonanych na spektrometrze Bruker AVANCE 600.

Dwuwymiarowe, fazoczułe widma NOESY^{173,179} (600 MHz, 90% $\text{H}_2\text{O}/10\%$ D_2O) wykonane zostały w temperaturze 10°C metodą TPPI¹⁸⁰ z czasem mieszania $\tau_m = 150$ ms. W celu wygaszenia silnego sygnału wody, podczas eksperymentu stosowano sekwencję

(3-9-19) gradientowych impulsów w metodzie WATERGATE. W eksperymencie rejestrowanych było 512 sygnałów FID, z których każdy był sumą 128 spójnych przebiegów i zawierał 2K punktów zespolonych. Szerokość spektralna w obu kierunkach wynosiła 13.8 kHz, czas akwizycji 0.07 s, natomiast czas oczekiwania $d1 = 2$ s. W czasie obróbki danych, w obu kierunkach, dokonano apodyzacji sygnałów funkcją sinusoidalną przesuniętą w fazie o 60° .

Dwuwymiarowe, fazoczułe widma DQF-COSY¹⁸¹ (600 MHz, D₂O) o wysokiej rozdzielczości wykonane były z szerokopasmowym odsprzęgnięciem sekwencją GARP¹⁸² od częstotliwości ³¹P w temperaturach 25 oraz 30°C. Czulość fazową w kierunku t₁ uzyskano stosując metodę TPPI. Resztkowy sygnał wody tłumiono metodą nasyceniową podczas interwału czasowego $d1 = 1.5$ s. Dużą rozdzielczość widma uzyskano poprzez zawężenie zakresu szerokości spektralnej do przedziału występowania sygnałów rezonansowych protonów H1'/H5 oraz H2'/H3'/H4'/H5'/H5'' (szerokość spektralna, $sw = 2.2$ kHz). Czas akwizycji wynosił 1 s. W eksperymencie rejestrowanych było 4K zespolonych punktów pomiarowych w kierunku t₂ dla 512 inkrementów w kierunku t₁. Każdy sygnał był zazwyczaj sumą 48 spójnych rejestracji. Podczas obróbki cyfrowej stosowano potęgowa, sinusoidalną funkcję ważącą w kierunku t₁ i t₂, natomiast ekstrapolacji sygnałów dokonano metodą LP. Po transformacji Fouriera przeprowadzono korekcję linii bazowej przez aproksymację funkcją wielomianową.

Analogiczne pomiary wykonane zostały na spektrometrze Bruker AVANCE II 400.

W przypadku dwuwymiarowych, fazoczułych widm TOCSY^{183,184} (600 MHz, D₂O) okres mieszania, podczas którego zastosowano sekwencję impulsów MLEV-17, trwał 60 ms. Widma zarejestrowane zostały przy szerokości spektralnej, która w obu kierunkach wynosiła około 6 kHz, z czasem akwizycji 0.2 s w kierunku t₁ i interwale czasowym między kolejnymi repetycjami $d1 = 2$ s. Akumulowane z 32 przebiegów sygnały FID zawierały 2K zespolonych punktów pomiarowych. W każdym eksperymencie zebranych zostało 512 sygnałów w kierunku t₁. W czasie obróbki danych w obu kierunkach t₁ i t₂ zastosowałem apodyzację funkcją sinusoidalną. Doświadczenia przeprowadzone zostały w temperaturze 25°C.

Dwuwymiarowe eksperymenty korelacyjne ¹H-¹³C HSQC¹⁸⁵⁻¹⁸⁷ (D₂O) przeprowadzone zostały na próbkach o naturalnej zawartości izotopu ¹³C w temperaturze 25 i 30°C metodą odwrotnej detekcji. Aby zniwelować wpływ sprzężeń proton-węgiel, podczas akwizycji danych na kanale ¹³C przykładano sekwencję impulsów GARP. Pomiary wykonane były przy częstotliwości rezonansowej, która wynosiła 600 MHz dla jąder ¹H i 150.9 MHz dla jąder

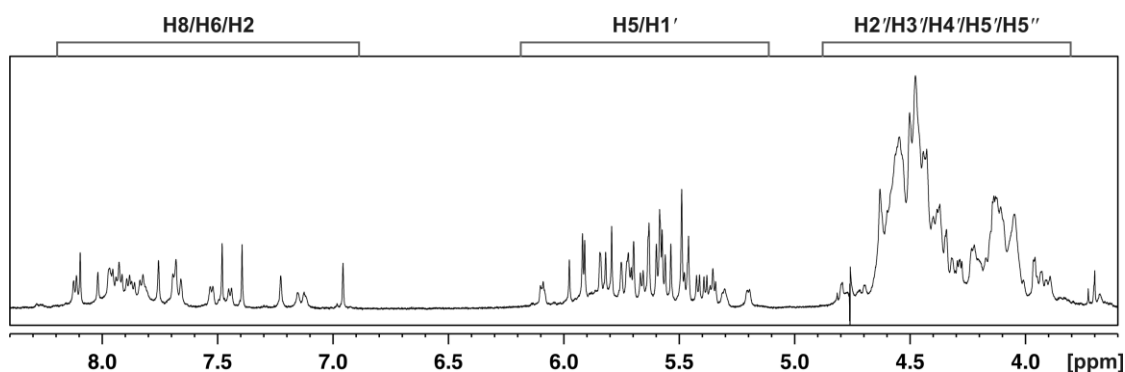
^{13}C . Doświadczenia wykonano dla dwóch zakresów przesunięć chemicznych. Widma dla pełnego zakresu zebrane zostały przy szerokości spektralnej $\text{sw} = 19.6 \text{ kHz}$ w kierunku t1 oraz przy $\text{sw} = 3.6 \text{ kHz}$ w kierunku t2. W drugim przypadku szerokość spektralna została zawężona ($\text{sw} = 8.5 \text{ kHz}$ w kierunku t1 i 3 kHz w kierunku t2) do zakresu występowania sygnałów korelacyjnych pomiędzy atomami węgla i związanymi kowalencyjnie protonami H1', H5 oraz H2', H3', H4', H5', H5". Widma przetwarzałem stosując metodę LP i ważenie funkcją sinusoidalną.

Zarejestrowane zostały również widma korelacyjne ^1H - ^{13}C HSQC (D_2O) dla zawężonego zakresu przesunięć chemicznych na spektrometrze Bruker AVANCE 400. Temperatura pomiaru wynosiła 25°C .

Jednowymiarowe widma ^{31}P (D_2O) zarejestrowane zostały przy częstotliwości rezonansowej 243 MHz na spektrometrze Bruker AVANCE 600. Badania przeprowadzono w zakresie temperatur od 10°C do 35°C , co 5°C .

Dwuwymiarowe, fazoczułe widma korelacyjne ^1H - ^{31}P HSQC^{188,189} (D_2O) zostały wykonane na spektrometrze Bruker AVANCE 600 dla szerokości spektralnej $\text{sw} = 2.4 \text{ kHz}$ w kierunku ^{31}P oraz 1.5 kHz w kierunku ^1H . Końcowe widma zawierały 256 sygnałów FID, akumulowanych na ogół z 96 przebiegów, przy czym każdy sygnał zawierał 2K punktów zespolonych. Przed transformacją Fouriera przeprowadzono apodyzację sinusoidalną funkcją kwadratową. Eksperymenty przeprowadzono w temperaturach: 20 , 25 i 30°C .

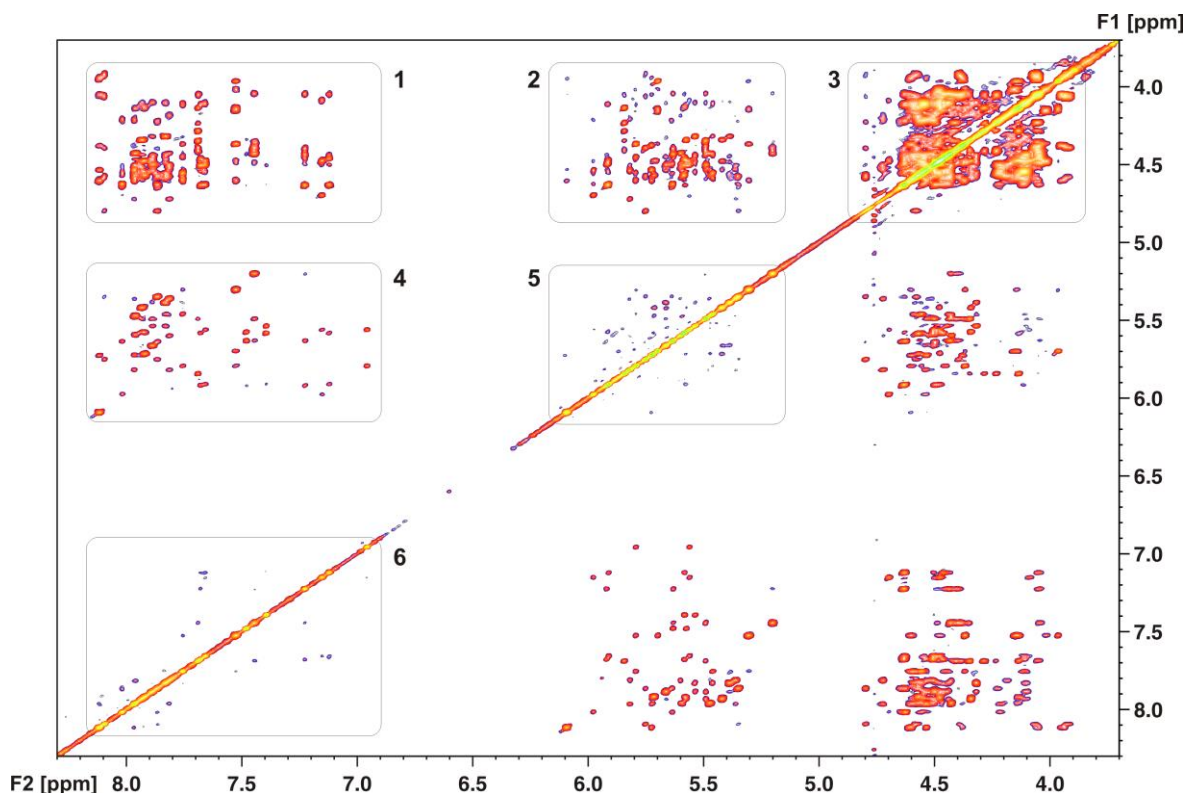
Kalibracja przesunięć chemicznych ^1H , ^{13}C NMR względem DSS oraz sygnałów ^{31}P NMR względem TMP wykonana została w oparciu o zależność przesunięcia chemicznego sygnału wody od temperatury pomiaru, stężenia soli i pH próbki metodą opisaną w pracy Wisharta¹⁹⁰.



Rys. 23. Widmo ^1H NMR dupleksu **I** wykonane w temperaturze 25°C w D_2O (600 MHz). Nad widmem zaznaczono charakterystyczne zakresy występowania sygnałów rezonansowych pochodzących od protonów H2, H6 i H8; protonów H5 i H1'; pozostałych protonów pierścieni rybozy.

Dobrze rozdzielone linie rezonansowe w dwóch pierwszych regionach są stosunkowo wąskie, co wskazuje, że struktura jest stabilna i jednorodna. W widmie można także rozróżnić charakterystyczne sygnały należące do protonów H5 i H6, dla których ujawnia się struktura subtelna linii widmowej w postaci dwóch składowych. Łatwo rozpoznawalne w widmie są również singlety pochodzące od protonów H2, które odznaczają się małą szerokością połówkową oraz dużą amplitudą. Wąskie linie rezonansowe od tych protonów są wynikiem ich dłuższych czasów relaksacji. Stosunkowo wąskie linie rezonansowe wskazują również na brak zanieczyszczeń jonami paramagnetycznymi, które mogłyby powodować ich poszerzenie. Pomimo tego, widmo jest bardzo złożone i dalsza analiza mogła zostać przeprowadzona w oparciu o serię dwuwymiarowych homo- i heterojądrowych eksperymentów.

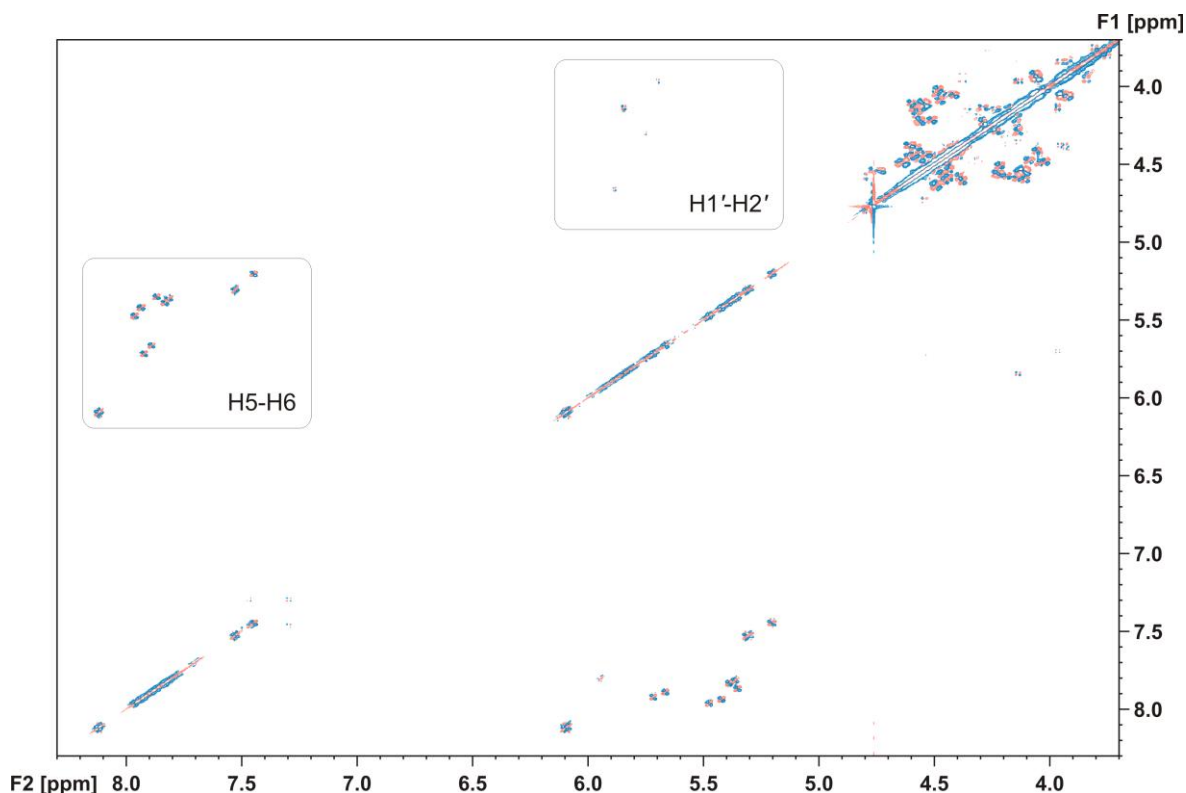
Przypisania linii rezonansowych ^1H NMR dokonałem głównie za pomocą dwuwymiarowych widm 2D NOESY (Rys. 24) oraz eksperymentów DQF-COSY. Heterojądrowe widma korelacyjne ^1H - ^{13}C oraz ^1H - ^{31}P HSQC, pomocne również podczas identyfikacji linii rezonansowych poszczególnych protonów, omówione zostaną w następnych rozdziałach.



Rys. 24. Widmo 2D NOESY dupleksu I w D₂O (600 MHz, 25°C). W widmie zaznaczono regiony występowania sygnałów korelacyjnych pochodzących od oddziaływań między protonami:

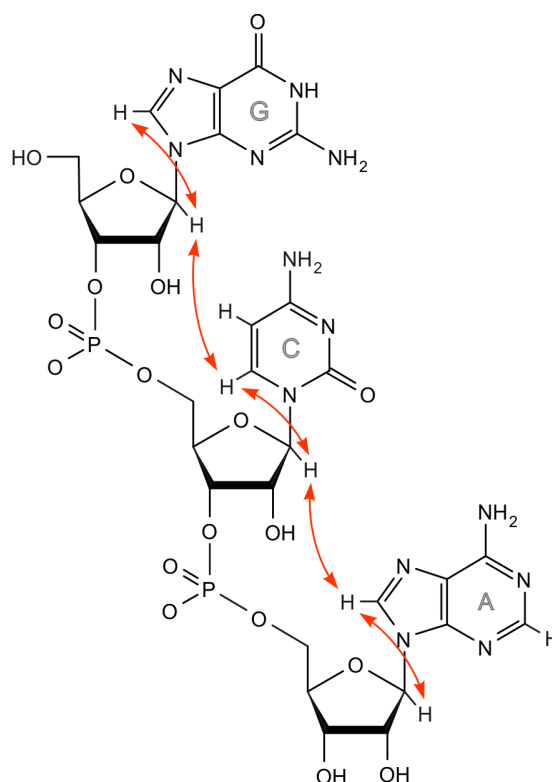
- | | |
|---|-------------------------|
| 1) H2/H6/H8 – H2'/H3'/H4'/H5'/H5''; | 4) H2/H6/H8 – H5/H1'; |
| 2) H5/H1' – H2'/H3'/H4'/H5'/H6''; | 5) H5/H1' – H5/H1'; |
| 3) H2'/H3'/H4'/H5'/H5'' – H2'/H3'/H4'/H5'/H5''; | 6) H2/H6/H8 – H2/H6/H8. |

Analizę widm rozpocząłem od tak zwanego regionu aromatyczno-anomerycznego, w którym występują sygnały korelacyjne pomiędzy protonami H2/H6/H8 a protonami H5/H1' (obszar 4 na Rys. 24). Na widmach DQF-COSY (Rys. 25) w tym regionie, ze względu na duże wartości sprzężeń skalarnych, obserwowałem dziesięć bardzo intensywnych sygnałów pochodzących od par protonów H5-H6 reszt pirymidynowych. W badaniach kwasów nukleinowych są to jedyne sygnały występujące na widmach typu COSY w tym regionie. Przy tych samych częstotliwościach rezonansowych, co w eksperymencie DQF-COSY, obserwowałem również, na skutek silnego efektu NOE między protonami H5 i H6, korelacje na widmach 2D NOESY. Pozwoliło mi to na wyodrębnienie tych sygnałów od pozostałych obecnych w analizowanym regionie. W rozróżnieniu sygnałów korelacyjnych H5-H6 reszt cytydyny od tych pochodzących od reszt urydyny pomocna była analiza heterojądrowych widm ¹H-¹³C HSQC, prezentowanych w rozdziale IV.2.1.1.3. Jednakże na podstawie widm DQF-COSY oraz ¹H-¹³C HSQC nie można otrzymać informacji, której reszcie nukleotydowej odpowiada dany sygnał.

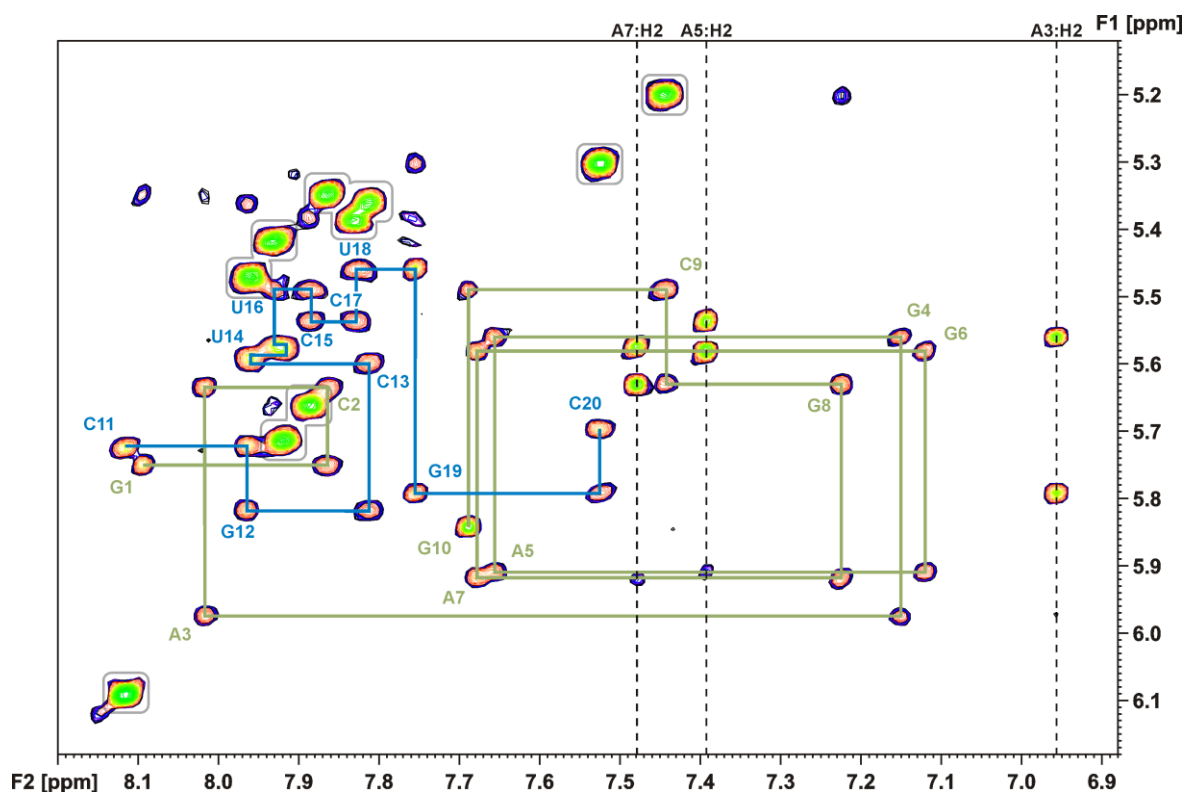


Rys. 25. Widmo DQF-COSY dupletu referencyjnego w D₂O (600 MHz, 25°C). W widmie zaznaczono regiony występowania sygnałów korelacyjnych pochodzących od sprzężeń skalarnych między protonami H5-H6 oraz H1'-H2'.

Na tym etapie przypisań kluczowymi okazały się pozostałe sygnały regionu aromatyczno-anomerycznego widm 2D NOESY. Sygnały te, o znacznie mniejszej intensywności, pochodzą od oddziaływań NOE pomiędzy protonami reszt heterocyklicznych (H6/H8) a protonami anomerycznymi (H1'). W oparciu o analizę tych oddziaływań oraz korzystając z właściwości prawoskrętnej struktury RNA, w której odległości H6/H8-H1' są mniejsze niż 5 Å, wyznaczyłem ścieżki przekazywania magnetyzacji pomiędzy protonami H6/H8_(i)-H1'_(i)-H6/H8_(i+1)^{28,192} (Rys. 26 i 27). Te, tak zwane sekwencyjne ścieżki NOE (ang. *NOE pathways*) łączą na przemian intra- i internukleotydowe sygnały korelacyjne, a ich wyznaczenie umożliwiło jednoznaczne określenie częstotliwości rezonansowych wszystkich zaangażowanych w tworzenie tych ścieżek protonów. Dla obu nici dupletu **I** zaobserwowałem nieprzerwane ścieżki NOE, co świadczy o dużej stabilności badanej struktury.

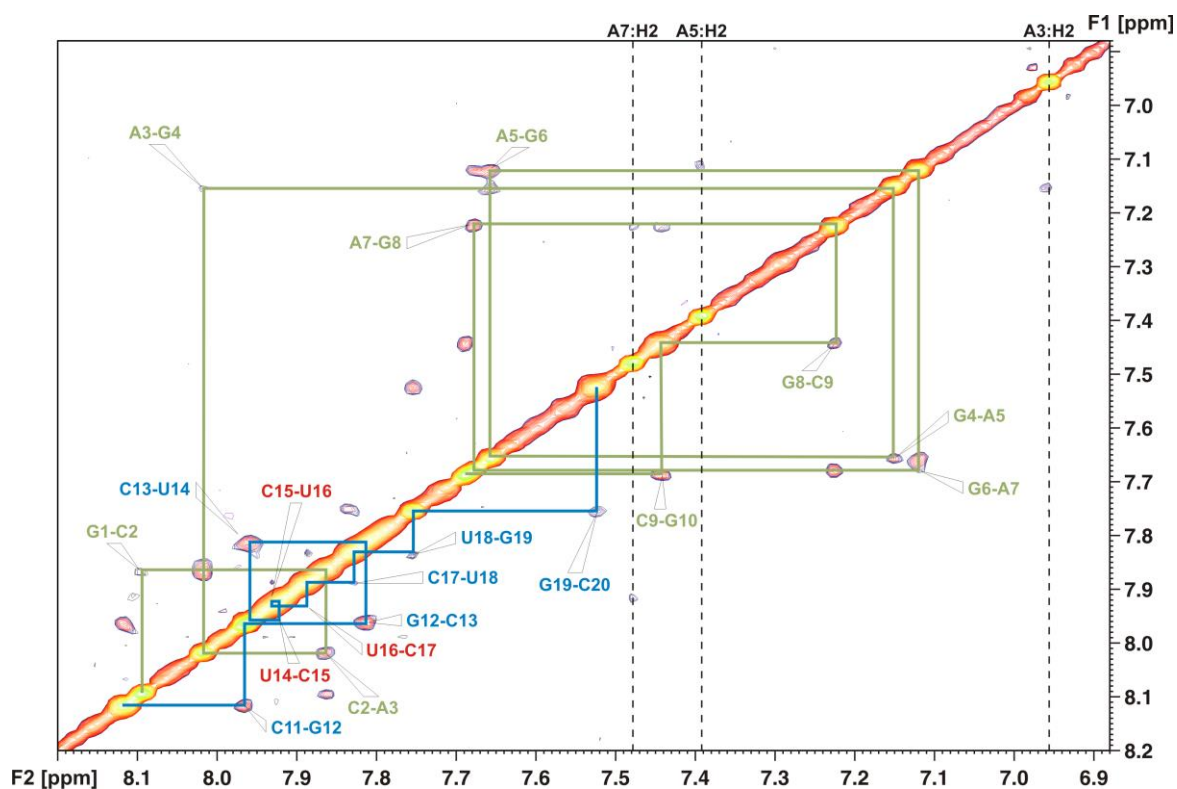


Rys. 26. Schemat wewnątrzcząsteczkowych oddziaływań dipolowych tworzących tzw. ścieżkę NOE w strukturach typu A-RNA na przykładzie łańcucha o sekwencji GCA.



Rys. 27. Region H2/H6/H8-H5/H1' w widmie 2D NOESY ($\tau_m = 400$ ms) dupletu **I** w D₂O (600 MHz, 25°C). W widmie zaznaczone zostały sekwencyjne ścieżki H6/H8_(i)-H1'_(i)-H6/H8_(i+1) – kolorem zielonym dla górnej nici, natomiast niebieskim – dla dolnej nici. Szarymi prostokątami wyróżnione zostały intranukleotydowe sygnały H5-H6, natomiast przerywane linie wskazują położenie sygnałów H2 reszt adenyzy.

W analizowanym fragmencie widma 2D NOESY zaobserwowałem również słabe internukleotydowe kontakty NOE pomiędzy protonami $H6_{(i)}-H5_{(i+1)}$ oraz $H8_{(i)}-H5_{(i+1)}$. Oddziaływania te, jak również sekwencyjne sygnały $H6/H8_{(i)}-H6/H8_{(i+1)}$ znajdujące się w pobliżu linii diagonalnej (Rys. 28) pomogły w prawidłowym wyznaczeniu ścieżki NOE i dodatkowo potwierdziły obecność silnych oddziaływań warstwowych między zasadami obu nici dupleksu.



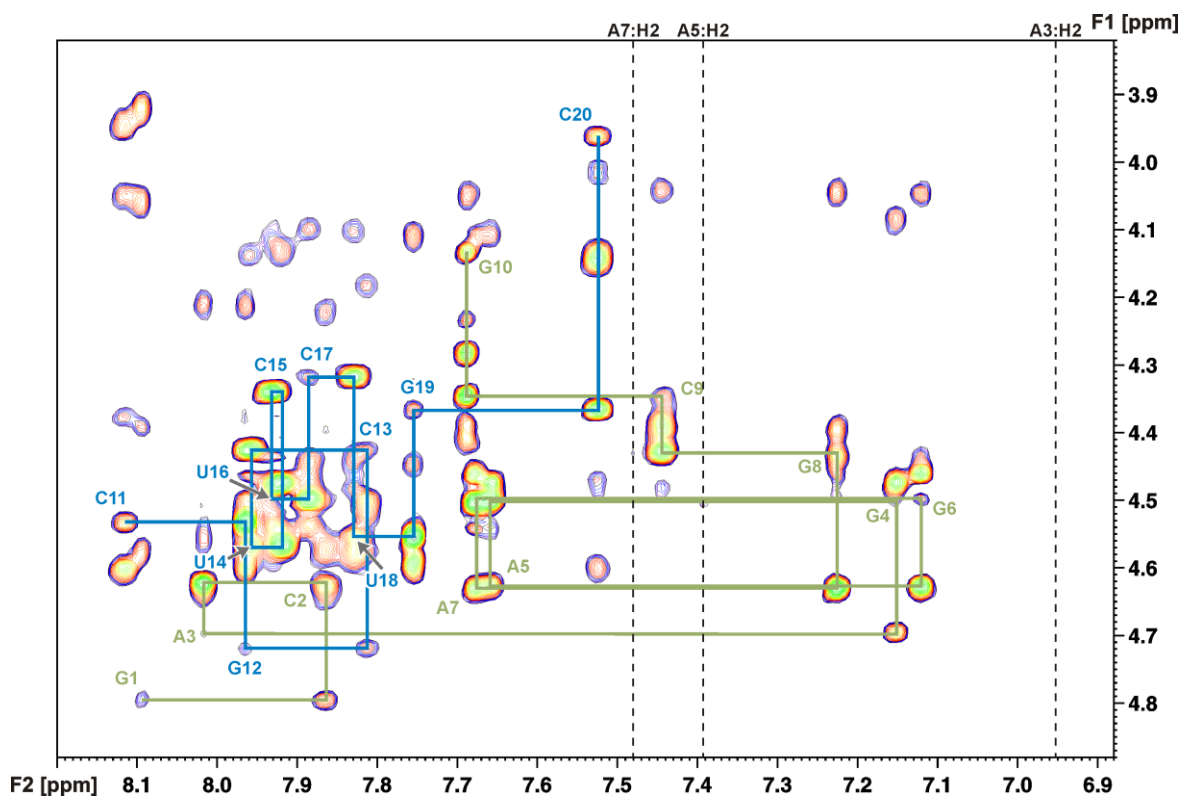
Rys. 28. Przydiagonalny region sygnałów korelacyjnych H2/H6/H8 w widmie 2D NOESY dupleksu I w D_2O (600 MHz, 25 °C). W widmie zaznaczone zostały sekwencyjne ścieżki $H6/H8_{(i)}-H6/H8_{(i+1)}$ kolorem zielonym dla górnej nici, niebieskim – dla dolnej nici. Kolorem czerwonym zaznaczone zostały przesłonięte przez sygnały diagonalne sygnały korelacyjne. Przerwane linie wskazują położenie sygnałów H2 reszt adenozyiny.

Wartości przesunięć chemicznych protonów H2 reszt adenozyiny wyznaczyłem w oparciu o widma jednowymiarowe 1H NMR oraz dwuwymiarowe widma $^1H-^{13}C$ HSQC, omówione w rozdziale IV.2.1.1.2. Korelacje tych protonów z protonami H1' tej samej reszty oraz z protonem anomerycznym reszty sąsiadującej od końca 3' obserwowane na widmie 2D NOESY, okazały się bardzo pomocne podczas przypisań pozostałych sygnałów w aromatyczno-anomerycznym regionie widma. Niezwykle istotnymi w badaniach strukturalnych były również korelacje występujące pomiędzy protonami H2 reszt adenozyiny a protonami H1' w nici komplementarnej, które znacznie ułatwiły ich identyfikację. Sygnały

te pochodzące od oddziaływań pomiędzy atomami wodoru z dwóch różnych nici są jedynym dowodem na zawiązywanie się struktury dupletu jaki mogą dostarczyć widma wykonane w D₂O.

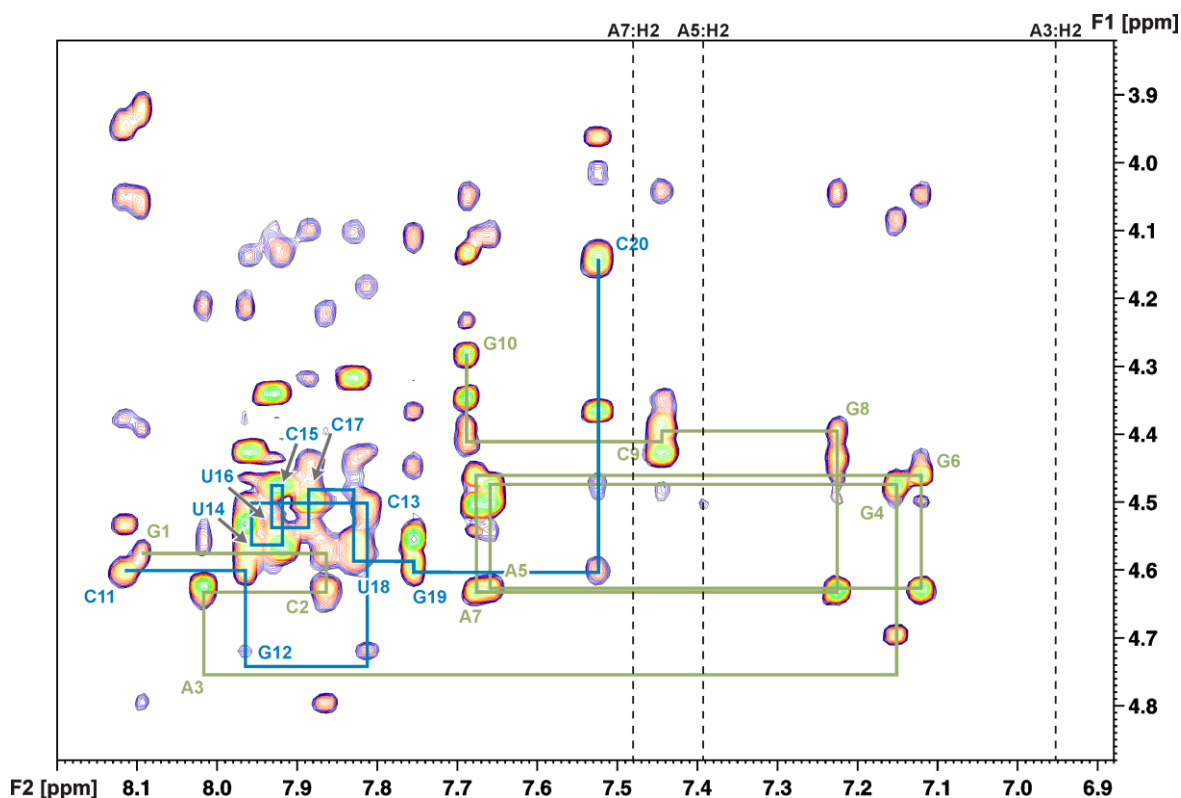
Najtrudniejszym zadaniem podczas przypisywania sygnałów rezonansowych cząsteczek RNA jest identyfikacja sygnałów pochodzących od protonów H2', H3', H4', H5' i H5'' reszt cukrowych. W widmach NMR sygnały te występują w wąskim zakresie (3.7 – 5 ppm), wskutek czego bardzo silnie nakładają się na siebie.

W celu przypisania sygnałów pochodzących od protonów H2' analizę widm rozpocząłem od zidentyfikowania sygnałów korelacyjnych H1'-H2'. W widmie DQF-COSY w interesującym obszarze H5/H1'-H2'/H3'/H4'/H5'/H5'' obserwowałem tylko 4 sygnały korelacyjne. Intensywniejsze sygnały pochodziły od protonów H1'-H2' terminalnych reszt z końca 3' (**G10**, **C20**), natomiast dwa słabsze należały do reszt **G1** i **C11** z końca 5'. Nie obserwowałem natomiast sygnałów korelacyjnych od pozostałych reszt nukleotydowych, z uwagi na małe wartości sprzężeń skalarnych H1'-H2'. Dlatego też możliwość wykorzystania widm DQF-COSY do określenia przesunięć chemicznych protonów H2' dupletu była w tym przypadku bardzo ograniczona. Znacznie więcej informacji uzyskałem z widm 2D NOESY wykonanych z czasem mieszania $\tau_m = 50$ ms. W tych widmach, sygnały H1'-H2' z uwagi na ich dużą intensywność łatwo mogłem zidentyfikować. Silne wzmocnienie NOE pomiędzy H1' i H2' wynika ze stosunkowo małej odległości ($\sim 2.8 - 3.0$ Å) między tymi protonami, która w niewielkim stopniu zmienia się w zależności od konformacji pierścienia cukrowego. Poprawność przypisań sygnałów H2' potwierdzona została przez obserwację silnych internukleotydowych oddziaływań NOE pomiędzy protonami H2'_(i)-H6/H8_(i+1). Występowanie takich sygnałów jest charakterystyczną cechą struktur typu A-RNA, w których odległość pomiędzy protonem H2' i H6 lub H8 następnej reszty jest rzędu 2 Å¹⁹³. W widmie 2D NOESY ($\tau_m = 400$ ms) obserwowałem również dodatkowe sygnały korelacyjne H5-H2' oraz intra- i internukleotydowe sygnały pomiędzy protonami H6/H8-H2', co pozwoliło mi wyznaczyć ścieżki NOE pomiędzy H6/H8_(i)-H2'_(i)-H6/H8_(i+1)^{28,192} (Rys. 29).



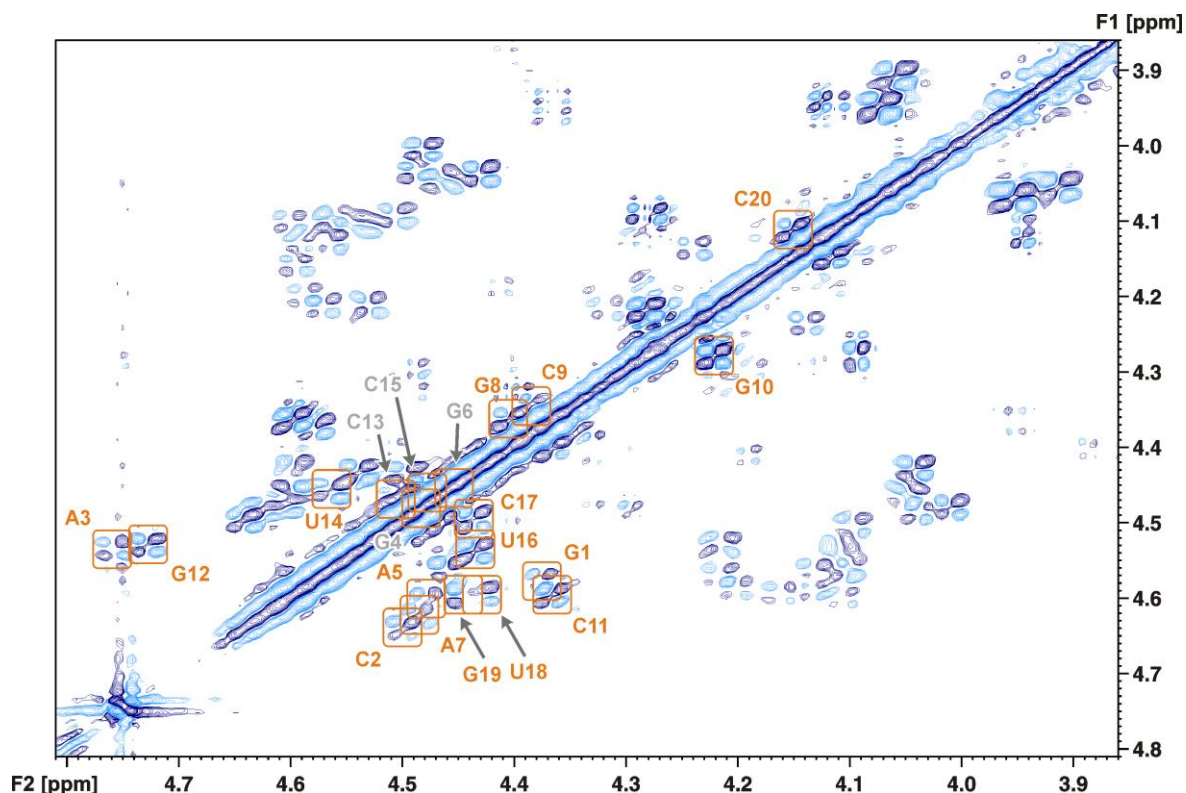
Rys. 29. Region sygnałów H2/H6/H8-H2'/H3'/H4'/H5'/H5'' w widmie 2D NOESY ($\tau_m = 400$ ms) dupleksu I w D₂O (600 MHz, 25°C). W widmie zaznaczone zostały sekwencyjne ścieżki H6/H8_(i)-H2'_(i)-H6/H8_(i+1) – kolorem zielonym dla górnej nici, natomiast niebieskim – dla dolnej nici. Przerwane linie wskazują położenie sygnałów H2 reszt adenyzy.

Przypisania sygnałów rezonansowych protonów H3' dokonałem na podstawie analizy sygnałów korelacyjnych H1'-H3' oraz H5-H3' w widmach 2D NOESY wykonanych z czasem mieszania 400 ms i potwierdziłem poprzez wyszukanie typowych dla struktur A-RNA ścieżek sekwencyjnych H6/H8_(i)-H3'_(i)-H6/H8_(i+1)^{28,192} (Rys. 30). Niezwykle pomocnymi podczas identyfikacji sygnałów H3' były także widma ¹H-³¹P HSQC, w których obserwowałem bardzo intensywne sygnały korelacyjne pochodzące od sprzężeń skalarnych pomiędzy protonem H3' a jądrem fosforu następnej reszty nukleotydowej.



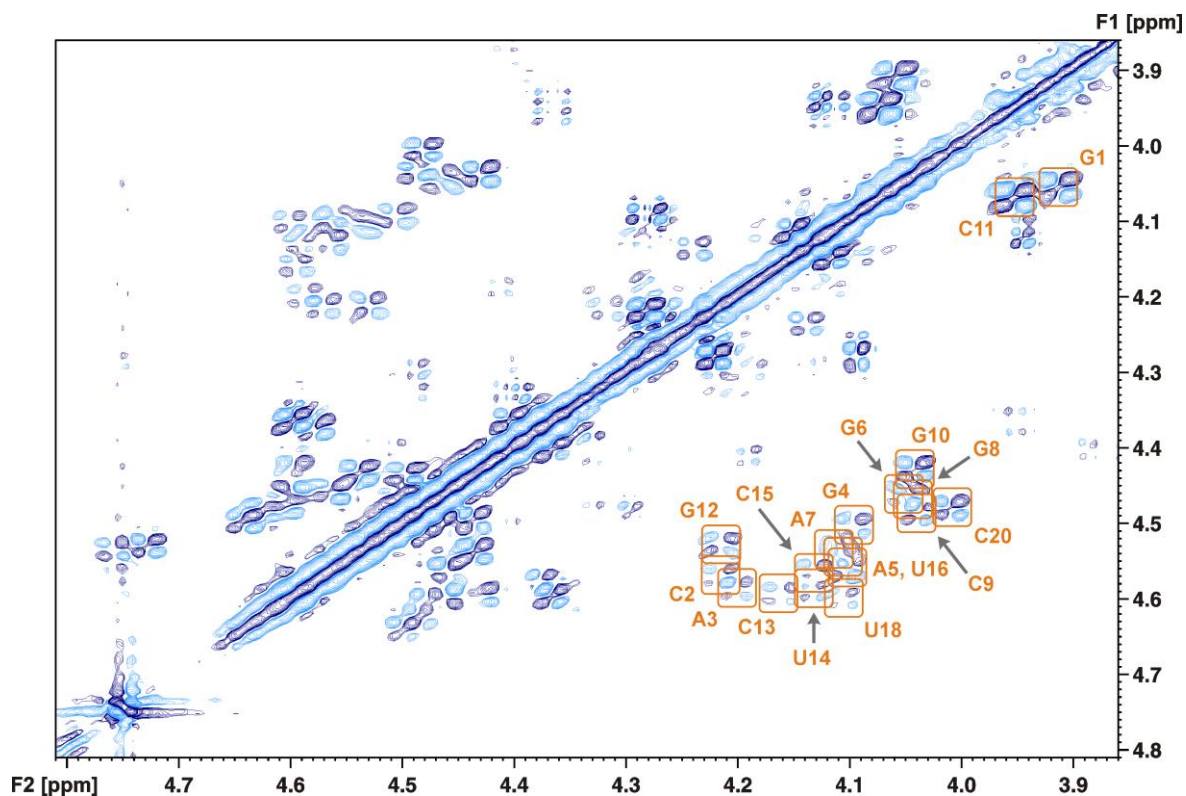
Rys. 30. Region sygnałów H2/H6/H8-H2'/H3'/H4'/H5'/H5'' w widmie 2D NOESY ($\tau_m = 400$ ms) dupletu **I** w D₂O (600 MHz, 25°C). W widmie zaznaczona została sekwencyjna ścieżka H6/H8_(i)-H3'_(i)-H6/H8_(i+1) – kolorem zielonym dla górnej nici, natomiast niebieskim – dla dolnej nici. Przerwane linie wskazują położenie sygnałów H2 reszt adenozyliny. Sygnały H3' reszt **A3** i **G12** zostały sflumione wraz z sygnałem wody.

Identyfikacji linii rezonansowych protonów H4' dokonałem w oparciu o szczegółową analizę kontaktów NOE oraz obserwowanych w widmach DQF-COSY sygnałów korelacyjnych pochodzących od sprzężeń H3'-H4'. W widmach 2D NOESY kontakty NOE pomiędzy protonami H1'-H4' obu energetycznie uprzywilejowanych konformacji C2'-endo oraz C3'-endo są podobnej intensywności i obok sygnałów korelacyjnych H1'-H2' są najsilniejszymi w regionie H5/H1'-H2'/H3'/H4'/H5'/H5''. Stąd sygnały H1'-H4' można było rozpoznać i tym samym przypisać protony H4' do odpowiednich reszt nukleotydowych. W widmach wykonanych z długim czasem mieszania ($\tau_m = 400$ ms) dodatkowo obserwowane były typowe dla formy A-RNA słabe oddziaływania pomiędzy protonami H4' a H6/H8 zasad heterocyklicznych. Istotne informacje podczas przypisywania sygnałów protonów H4' uzyskałem również z widm DQF-COSY. W diagonalnym obszarze sygnałów H2'/H3'/H4'/H5'/H5'' tego widma obserwowałem intensywne korelacje pomiędzy protonami H3' i H4' dla większości reszt cukrowych (Rys. 31). Obecność silnych sygnałów H3'-H4' na widmach DQF-COSY wynika z dużych wartości wicynalnych sprzężeń skalarnych między tymi jądrami, charakterystycznych dla konformacji C3'-endo¹⁹⁴.



Rys. 31. Przydiagonalny region sygnałów H2'/H3'/H4'/H5'/H5'' w widmie DQF-COSY dupletu **I** w D₂O (600 MHz, 25°C) z wyróżnionymi sygnałami korelacyjnymi pomiędzy protonami H3'-H4'. Szarym kolorem opisane są sygnały korelacyjne, które przesłonięte zostały przez sygnały diagonalne.

Pomimo dużej intensywności sygnałów korelacyjnych pomiędzy geminalnymi protonami H5' i H5'' przypisanie ich w widmie 2D NOESY było utrudnione ze względu na silne nakładanie się tych sygnałów, występujących w najbardziej zagęszczonym regionie diagonalnym. Jedynie sygnały terminalnych reszt odsunięte od pozostałych, mogłem łatwo zidentyfikować. Najwięcej informacji uzyskałem z analizy słabych oddziaływań NOE protonów H5'/H5'' z protonami H6/H8 oraz H1', obserwowanych w widmach 2D NOESY wykonanych z długim czasem mieszania ($\tau_m = 400$ ms). Korelując otrzymane z widm ¹H-¹³C HSQC zakresy przesunięć chemicznych sygnałów ¹H NMR reszt rybozy z danymi otrzymanymi z widm 2D NOESY przypisałem większość protonów H5'/H5''. Poprawność przypisań potwierdziły wyniki analizy widm DQF-COSY, w których najsilniejsze sygnały korelacyjne pochodziły właśnie od sprzężeń ²J_{HH} między protonami H5' i H5'' (Rys. 32).



Rys. 32. Przydiagonalny region sygnałów H2'/H3'/H4'/H5'/H5'' w widmie DQF-COSY dupleksu I w D₂O (600 MHz, 25°C) z wyróżnionymi sygnałami korelacyjnymi pomiędzy protonami H5'-H5''.

Wykonane dodatkowo widmo TOCSY potwierdziło istnienie większych niż 2 – 3 Hz sprzężeń skalarnych pomiędzy protonami H1'-H2' tylko dla terminalnych reszt dupleksu. Eksperyment potwierdził także poprawność przypisań dla tych reszt sygnałów H3' oraz H4'. Natomiast w przypadku pozostałych reszt, sygnały korelacyjne pomiędzy protonami anomerycznymi a protonami H2', H3' i H4' nie były obserwowane. Dla tych reszt, z uwagi na małe wartości sprzężeń skalarnych H1'-H2', transfer magnetyzacji z protonu H1' na pozostałe protony pierścieni rybozy nie był efektywny.

Wartości przesunięć chemicznych sygnałów rezonansowych ¹H NMR zmierzone w temperaturze 25°C zestawione zostały w tabeli 2.

Tabela 2. Wartości przesunięć chemicznych $\delta^1\text{H}$ (ppm) sygnałów dupleksu I [D_2O , 25°C].

Res.	H6/H8	H2/H5	H1'	H2'	H3'	H4'	H5'/H5''	amino	imino
G1	8.09	–	5.75	4.80	4.58	4.40	4.06/3.92	* / *	*
C2	7.86	5.35	5.64	4.63	4.64	4.50	4.56/4.22	6.87/8.52	–
A3	8.02	6.96	5.98	4.70	4.76	4.53	4.56/4.21	6.32/7.75	–
G4	7.15	–	5.56	4.51	4.48	4.48	4.47/4.09	6.07/8.01	12.47
A5	7.66	7.39	5.91	4.63	4.63	4.48	4.55/4.11	6.53/ *	–
G6	7.12	–	5.58	4.51	4.46	4.46	4.43/4.05	6.08/8.00	12.53
A7	7.68	7.48	5.92	4.63	4.64	4.50	4.54/4.11	6.64/ *	–
G8	7.22	–	5.63	4.43	4.40	4.43	4.48/4.04	* / *	13.54
C9	7.45	5.20	5.49	4.35	4.41	4.38	4.49/4.04	6.92/8.42	–
G10	7.69	–	5.84	4.14	4.29	4.24	4.41/4.05	* / *	*
C11	8.12	6.09	5.72	4.53	4.60	4.37	4.05/3.94	* /8.43	–
G12	7.97	–	5.82	4.72	4.74	4.54	4.51/4.21	* / *	13.10
C13	7.81	5.36	5.60	4.43	4.52	4.50	4.58/4.18	6.91/8.67	–
U14	7.96	5.47	5.59	4.57	4.56	4.47	4.58/4.14	–	14.16
C15	7.92	5.71	5.58	4.34	4.48	4.47	4.55/4.13	7.03/8.44	–
U16	7.93	5.42	5.49	4.50	4.53	4.43	4.55/4.11	–	14.07
C17	7.89	5.66	5.54	4.32	4.48	4.44	* /4.10	7.01/8.30	–
U18	7.83	5.39	5.46	4.56	4.58	4.44	4.59/4.10	–	13.46
G19	7.76	–	5.79	4.37	4.60	4.45	* /4.11	5.98/8.16	12.65
C20	7.52	5.30	5.70	3.96	4.14	4.16	4.48/4.02	7.15/8.37	–

* Sygnały, które nie zostały przypisane.

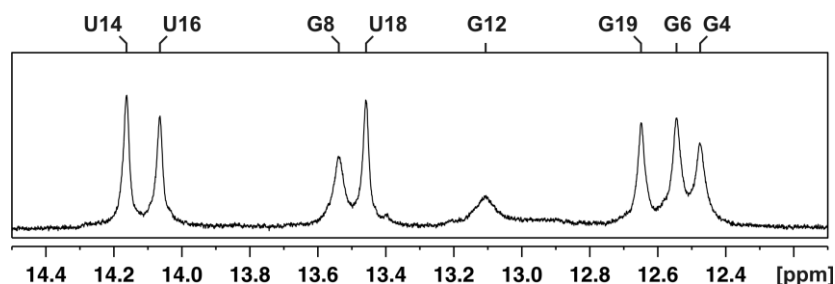
2.1.1.2. Analiza widm ^1H NMR w $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$

Charakterystyczny schemat wewnątrz- i międzycząsteczkowych oddziaływań NOE obserwowany dla protonów iminowych zaangażowanych w tworzenie par zasad typu Watsona-Cricka może być wykorzystany jako dowód na powstawanie struktury dwuniciowej cząsteczek RNA czy DNA^{97,191}. W widmach jednowymiarowych ^1H NMR oraz 2D NOESY wykonanych w wodzie (90% $\text{H}_2\text{O}/10\%$ D_2O) w temperaturze 10°C większość z oczekiwanych dla sekwencji I sygnałów pochodzących od protonów iminowych i aminowych zostało zidentyfikowanych, potwierdzając tym samym tworzenie się struktury dupleksu.

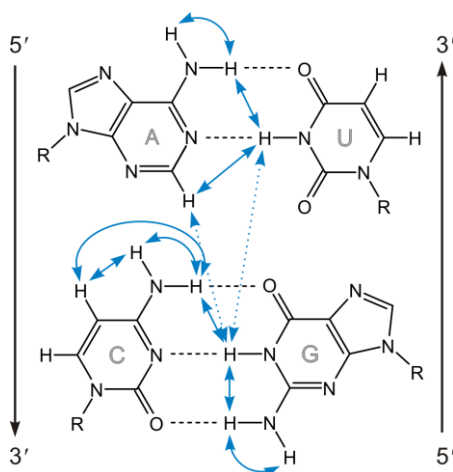
Przesunięcia chemiczne protonów iminowych zaangażowanych w tworzenie wiązań wodorowych są bardzo czułe na wszelkie zmiany w układzie parowania zasad²⁸. Stąd sygnały te dostarczają niezwykle cennych informacji o rodzaju wiązań wodorowych w cząsteczkach RNA.

Wszystkie linie rezonansowe ^1H NMR protonów iminowych dupleksu I są odsunięte od pozostałych sygnałów i występują w zakresie 12.4 – 14.2 ppm, typowym dla par Watsona-Cricka^{97,191} (Rys. 33). Sygnały protonów iminowych reszt urydyny przypisałem w oparciu o silne sygnały NOE do protonów H2 komplementarnych reszt adenozyne (Rys. 35),

natomiast identyfikacji protonów iminowych reszt guanozyny dokonałem w oparciu o korelacje z protonami aminowymi reszt cytydyny. Ponadto, w regionie oddziaływań protonów iminowych, widoczne były typowe dla regularnych struktur helikalnych korelacje pomiędzy protonami iminowymi sąsiednich par zasad, tworząc w widmie 2D NOESY charakterystyczną ścieżkę przenoszenia magnetyzacji¹⁹¹ (Rys. 34 i 35). Obecność tych sygnałów wskazywała dodatkowo na zachowywanie silnych oddziaływań warstwowych pomiędzy sąsiadującymi resztami obu nici.

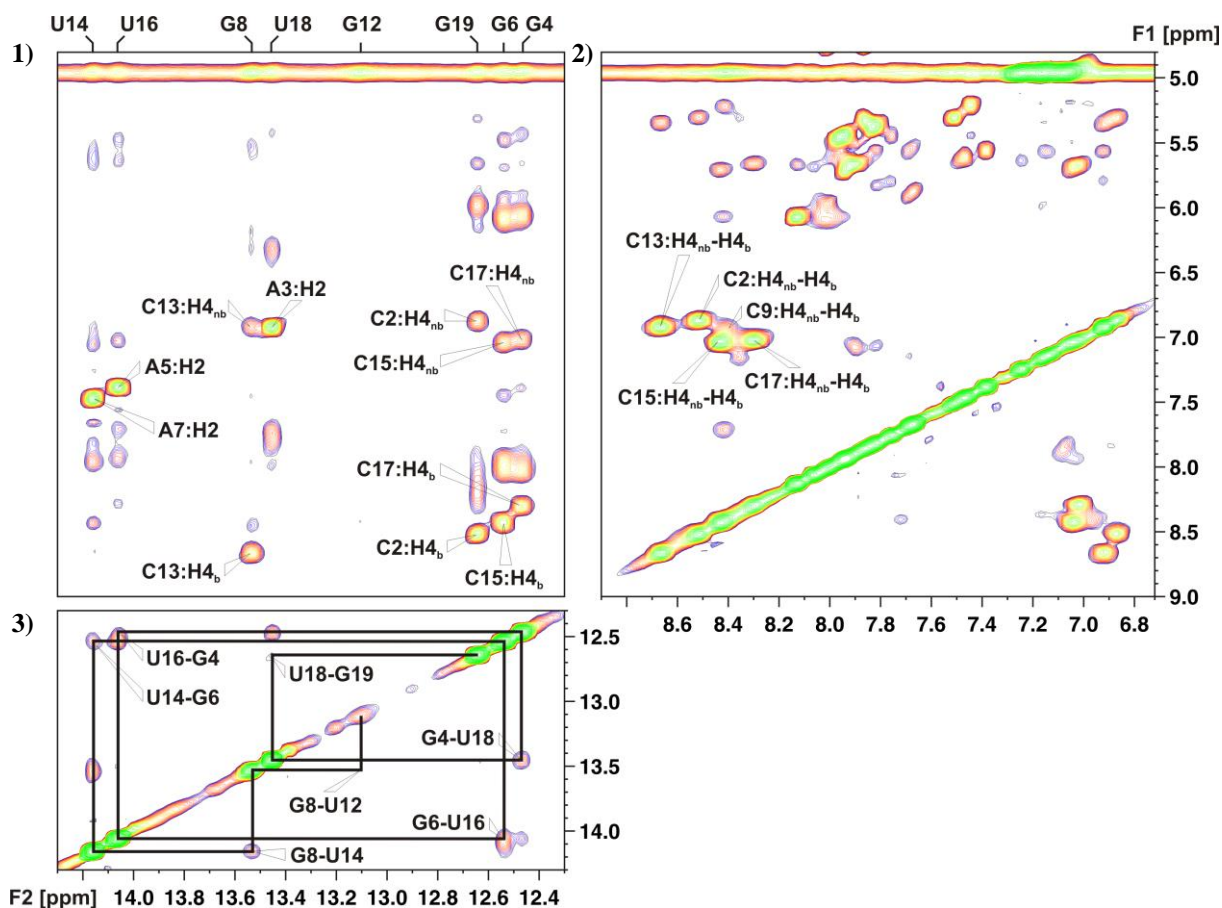


Rys. 33. Fragment widma ^1H NMR (600 MHz, 90% $\text{H}_2\text{O}/10\%$ D_2O) obejmujący zakres sygnałów protonów iminowych dupleksu I. Nad widmem zaznaczone zostały przypisania sygnałów rezonansowych.



Rys. 34. Schemat oddziaływań dipolowych protonów wymiennych w parach zasad Watsona-Cricka. Internukleotydydowe oddziaływania pomiędzy protonami sąsiednich par zasad zaznaczone zostały liniami przerywanymi, natomiast obserwowane oddziaływania w obrębie par zasad – liniami ciągłymi.

Analiza widm wykazała, że sygnały protonów iminowych reszt urydyny są przesunięte w stronę wyższych częstotliwości niż sygnały iminowe guanozyn^{28,97}. Taka sytuacja jest typowa dla kanonicznych par zasad typu Watsona-Cricka. W analizowanych widmach sygnały iminowe są na ogół intensywne i wąskie z wyjątkiem dwóch linii, które pochodziły od protonów terminalnych reszt guanozyny (Rys. 33). W tym przypadku, poszerzenie linii jest wynikiem efektu topnienia końców dupleksu.



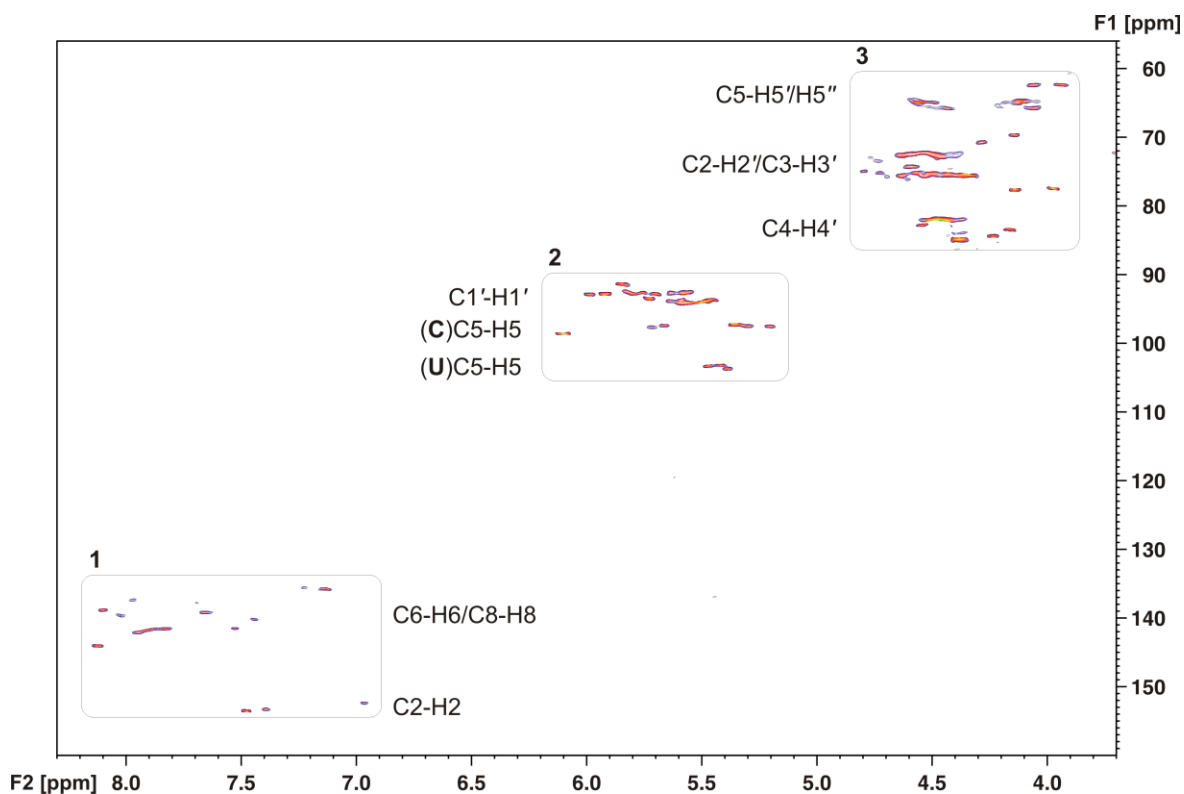
Rys. 35. Wybrane regiony widma 2D NOESY dupleksu I w $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (600 MHz, 10°C): 1) zakres iminowo – aminowy; 2) region, w którym występują sygnały korelacyjne pochodzące od protonów aminowych; 3) region przydiagonalny protonów iminowych z zaznaczoną ścieżką sekwencyjną.

Sygnały pochodzące od grup aminowych cytydyn łatwo można rozróżnić ze względu na silne oddziaływania NOE między geminalnymi protonami. Przypisania tych sygnałów dokonałem w oparciu o korelacje z protonami H5 oraz z protonami iminowymi. Protony aminowe reszt cytydyny zaangażowane w tworzenie wiązań wodorowych typu Watsona-Cricka dawały korelacje w zakresie 8.3 – 8.7 ppm, natomiast protony nie uczestniczące w wiązaniach wodorowych znajdowały się w regionie 6.7 – 7.2 ppm. Pozostałe sygnały pochodzące od grup aminowych reszt adenozy i guanozy nie były obserwowane ze względu na pośrednią w skali czasu NMR rotację grupy aminowej wokół wiązań C-N²⁸, co jest typowe dla cząsteczek RNA.

Wartości przesunięć chemicznych δ_{H} protonów iminowych i aminowych w temperaturze 10°C zebrane zostały w tabeli 2 (Rozdział IV.2.1.1.1).

2.1.1.3. Analiza widm ^{13}C NMR

Przypisanie linii rezonansowych ^{13}C NMR dokonałem w oparciu o widma korelacyjne ^1H - ^{13}C HSQC wykonane dla próbek o naturalnym składzie izotopowym. W przedstawionym na rysunku 36 widmie, zaznaczone zostały charakterystyczne regiony występowania sygnałów korelacyjnych ^1H - ^{13}C grup CH i CH_2 ^{28,191}. W pierwszym kroku analizy przystąpiłem do identyfikacji sygnałów korelacyjnych C2-H2, C8-H8 i C6-H6. Sygnały pochodzące od atomów węgla C2 reszt adenozyyny są najslabiej ekranowane, co pozwala na ich jednoznaczne przypisanie. Również sygnały C8-H8 i C6-H6 bardzo dobrze są rozseparowane (Rys. 36), dzięki czemu mogłem wyznaczyć przesunięcia chemiczne odpowiadających im jąder.

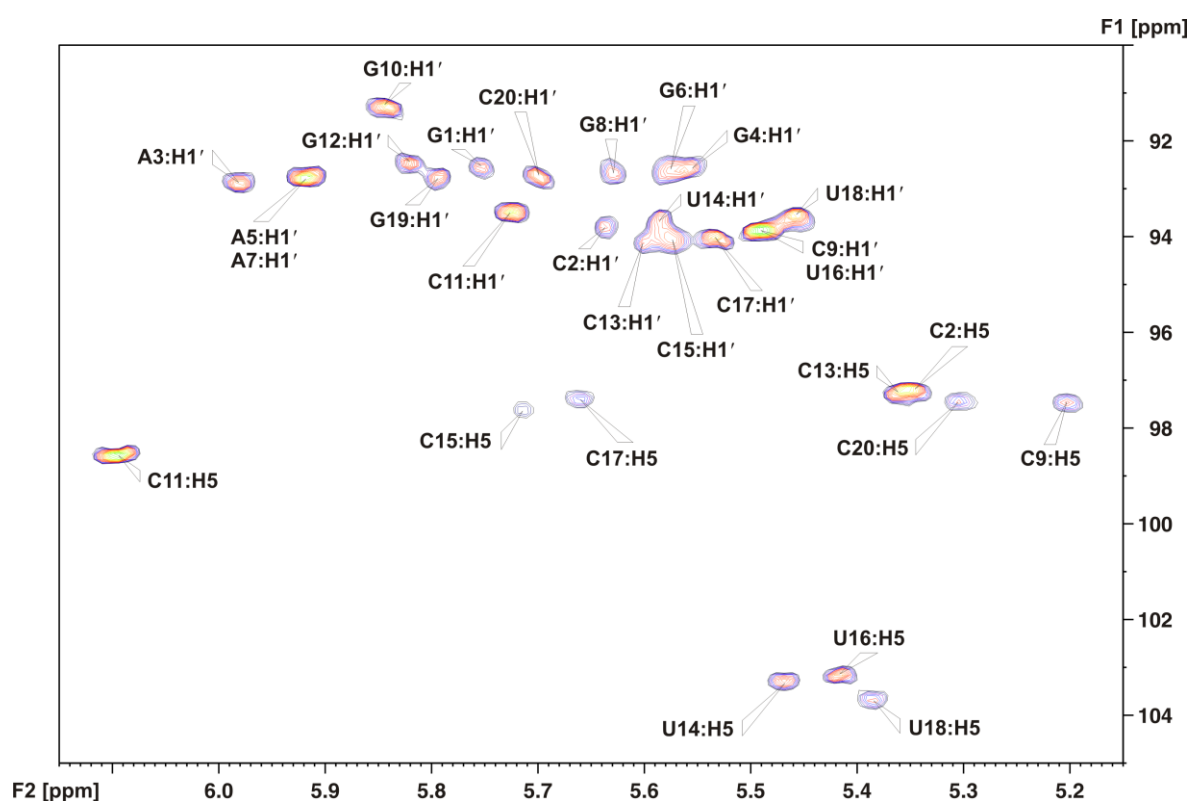


Rys. 36. Widmo korelacyjne ^1H - ^{13}C HSQC dupletu I w D_2O (600 MHz, 25°C). Na osi F1 zaznaczona została skala przesunięć chemicznych jąder ^{13}C , a na osi F2 – ^1H . W widmie zaznaczono zakresy występowania sygnałów korelacyjnych:

1) C2-H2/C6-H6/C8-H8; 2) C1'-H1'/C5-H5; 3) C2'-H2'/C3'-H3'/C4'-H4'/C5'-H5', H5''.

Drugi region zaznaczony w widmie obejmuje sygnały pochodzące od korelacji pomiędzy atomami C5-H5 oraz C1'-H1'. Sygnały korelacyjne C5-H5 są dobrze rozdzielone w zależności od typu reszty pirymidynowej. Przesunięcia chemiczne ^{13}C atomów węgla C5 reszt urydyny mają mniejsze wartości niż analogiczne przesunięcia dla reszt cytydyny, co

pozwała na rozróżnienie tych reszt (Rys. 37). W tym regionie, przy mniejszych wartościach przesunięć chemicznych ^{13}C , znajdują się również sygnały korelacyjne $\text{C1}'\text{-H1}'$. Pozostałe sygnały pierścieni cukrowych znajdują się przy najniższych wartościach przesunięć chemicznych ^{13}C i ^1H . Znajomość typowych zakresów przesunięć chemicznych ^{13}C pierścieni rybozy umożliwiła takie wyodrębnienie regionów, w których występują sygnały $\text{C4}'\text{-H4}'$, $\text{C2}'\text{-H2}'$, $\text{C3}'\text{-H3}'$ oraz $\text{C5}'\text{-H5}'/\text{H5}''$. Analiza widma $^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$ HSQC znacznie ułatwiła wyznaczenie sekwencyjnych ścieżek NOE w widmach 2D NOESY oraz przypisanie pozostałych protonów cząsteczki. Wartości przesunięć chemicznych jąder ^{13}C podane zostały w tabeli 3.



Rys. 37. Fragment widma $^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$ HSQC dupletu I w D_2O (600 MHz, 25°C) obejmujący sygnały korelacyjne protonów z atomami węgla $\text{C1}'$ oraz C5 . Na osi F1 zaznaczona została skala przesunięć chemicznych jąder ^{13}C , a na osi F2 – ^1H .

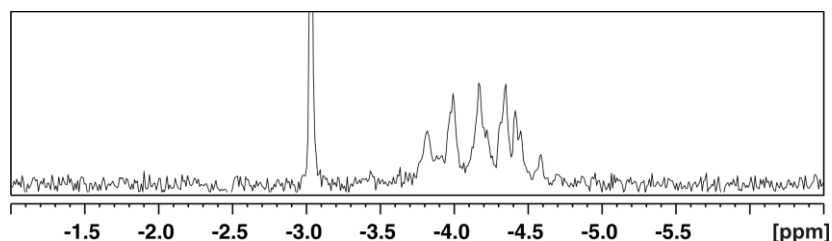
Tabela 3. Wartości przesunięć chemicznych δ (ppm) sygnałów ^{13}C oraz ^{31}P NMR [D_2O , 25°C].

Res.	C6/C8	C2/C5	C1'	C2'	C3'	C4'	C5'		^{31}P
G1	138.8	–	92.6	74.9	74.2	85.0	62.4		–
C2	141.6	97.3	93.8	75.4	72.7	82.0	65.2		-4.26
A3	139.6	152.4	92.9	75.7	73.0	82.0	65.2		-3.81
G4	135.7	–	92.6	75.3	72.6	81.9	*		-3.94
A5	139.1	153.3	92.7	75.6	72.7	81.9	*		-4.12
G6	135.8	–	92.6	75.3	72.9	81.9	65.8		-3.97
A7	139.2	153.4	92.7	75.6	72.5	81.9	*		-4.15
G8	135.5	–	92.6	75.4	72.7	82.1	*		-4.15
C9	140.1	97.5	93.9	75.5	72.4	81.9	64.8		-4.40
G10	137.8	–	91.3	77.6	70.7	84.3	65.7		-3.97
C11	144.0	98.6	93.5	75.6	74.1	84.7	62.3		–
G12	137.4	–	92.5	75.1	73.4	82.8	65.5		-3.80
C13	141.6	97.3	94.2	75.4	72.3	81.9	64.8		-4.35
U14	142.1	103.3	93.7	75.2	72.2	81.9	*		-4.34
C15	141.8	97.6	94.0	75.5	72.6	81.9	*		-4.30
U16	142.1	103.1	93.9	75.3	72.2	82.1	*		-4.58
C17	141.7	97.4	94.0	75.5	72.6	82.0	*		-4.45
U18	141.5	103.7	93.6	75.2	72.4	82.0	64.4		-4.40
G19	136.4	–	92.8	75.5	72.4	82.0	*		-4.17
C20	141.5	97.4	92.7	77.5	69.7	83.4	65.2		-4.33

* Sygnały, które nie zostały przypisane.

2.1.1.4. Analiza widm ^{31}P NMR

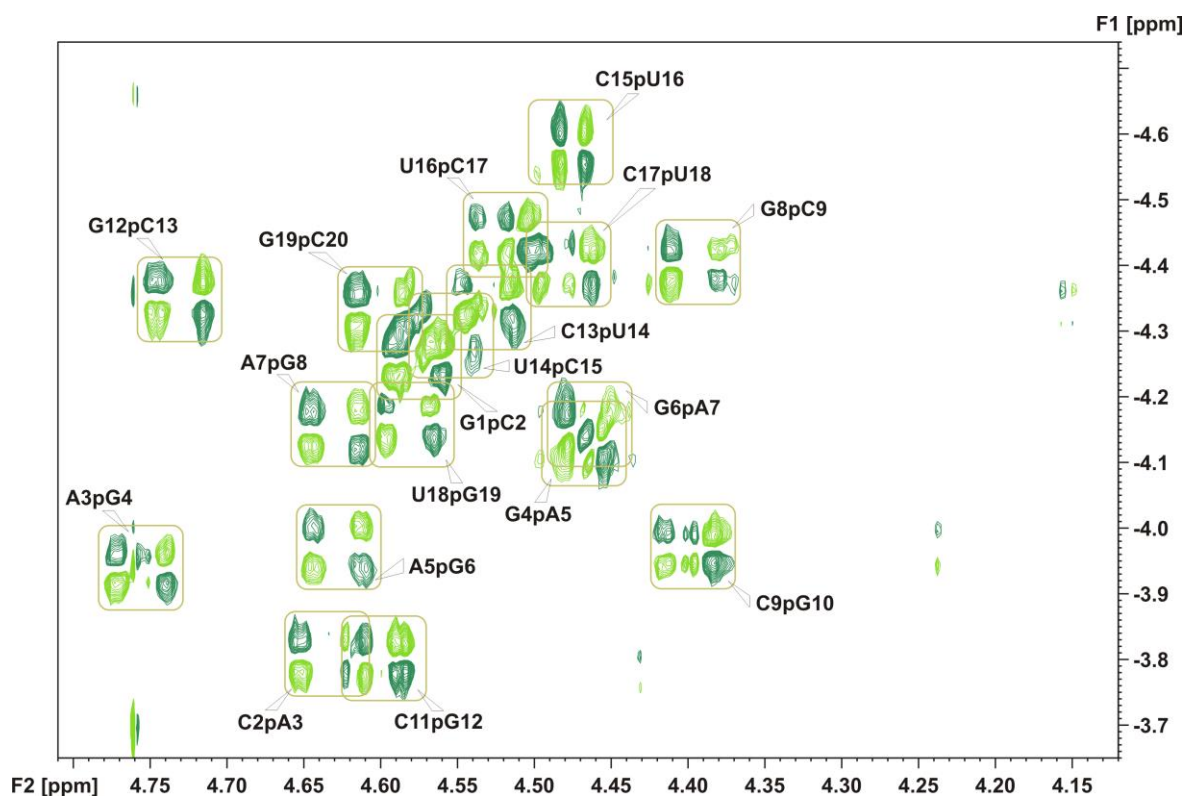
Linie rezonansowe pochodzące od jąder ^{31}P w widmie NMR dupleksu **I** koncentrują się w typowym dla formy A-RNA wąskim zakresie spektralnym o szerokości około 1 ppm^{105,195} (Rys. 38). Przypisania tych linii przeprowadziłem w oparciu o widma korelacyjne ^1H - ^{31}P HSQC (Rys. 39). Eksperyment ten posłużył mi nie tylko do przypisania sygnałów rezonansowych ^{31}P , ale także pomógł wyznaczyć i potwierdzić wartości przesunięć chemicznych protonów H3'. Ponadto analiza widm ^1H - ^{31}P HSQC pozwoliła na oszacowanie wartości stałych sprzężenia ^1H - ^{31}P , znajomość których była niezbędna do ustalenia konformacji szkieletu fosforocukrowego.



Rys. 38. Widmo ^{31}P NMR dupleksu **I** w D_2O (243 MHz, 25°C).

Najsilniejsze sygnały w widmie ^1H - ^{31}P HSQC pochodzą od wicynalnych sprzężeń $\text{H}3'_{(i)}\text{-P}_{(i+1)}$. Ponadto dostrzec można również kilka znacznie słabszych, intranukleotydowych sygnałów korelacyjnych pomiędzy jądrami ^{31}P a protonami $\text{H}5'$, $\text{H}5''$ i $\text{H}4'$. Korelacje te są wynikiem sprzężeń skalarnych dalekiego zasięgu, a ich charakter wskazuje na stabilną strukturę typu A-RNA dupleksu^{28,195}.

Wartości przesunięć chemicznych sygnałów ^{31}P NMR analizowanej cząsteczki zamieszczone zostały w tabeli 3.



Rys. 39. Widmo korelacyjne ^1H - ^{31}P NMR dupleksu **I** w D_2O (25°C) z zaznaczonymi sygnałami $\text{H}3'_{(n-1)}\text{-P}_{(n)}$. Na osi F1 zaznaczona została skala przesunięć chemicznych jąder ^{31}P , a na osi F2 – ^1H .

Wyznaczone wartości przesunięć chemicznych sygnałów ^1H , oraz ^{13}C i ^{31}P NMR dupleksu **I** zdeponowane zostały w banku BMRB¹⁹⁶ (ang. *Biological Magnetic Resonance Data Bank*) i przechowywane są pod identyfikatorem 15571.

2.1.2. Analiza konformacyjna. Wyznaczenie więzów strukturalnych (I)

2.1.2.1. Pomiar wielkości efektów NOE

Pomiarów wielkości wzmocnienia NOE dla protonów dupletu I, dokonałem na podstawie integracji sygnałów korelacyjnych w widmach 2D NOESY wykonanych z czasem mieszania $\tau_m = 150$ ms. W badaniach strukturalnych biomolekuł widma te stanowią główne źródło informacji o odległościach międzyprotonowych^{28,197}. Efekt NOE obserwujemy gdy dwa spiny jądrowe znajdują się blisko siebie w przestrzeni, przy czym przyjmuje się, że odległość graniczna, dla której obserwujemy wzmocnienie NOE wynosi 6 Å. Wszystkie sygnały korelacyjne w widmie były w tej samej fazie, co sygnały diagonalne co świadczyło o tym, że spełniony został warunek $\tau_c \omega_r \gg 1$.

Analizowane sygnały widma 2D NOESY optymalizowałem metodą nieliniowej aproksymacji krzywymi Lorentza, korzystając z dostępnej funkcji programu Felix. Optymalizacja pasm rezonansowych eliminowała wpływ szumów oraz umożliwiła także integrację tych sygnałów, które częściowo nakładały się na siebie.

Wielkości wzmocnienia NOE porównałem do średniej wartości tego efektu dla wszystkich par H5-H6. Objętości sygnałów dla każdej pary protonów mierzyłem po obu stronach diagonalnej i następnie je uśredniałem. W przypadkach, gdy sygnały silnie nakładały się oraz integracje mierzone po obu stronach diagonalnej znacznie się różniły, wtedy uwzględniałem tylko wyniki z regionu o lepszej rozdzielczości. Większość pomiarów integracji sygnałów NOE dokonałem z widma wykonanego w temperaturze 25°C. Wyjątek stanowiły te sygnały, które były zasłonięte przez sygnał wody. W tym przypadku analizowałem widma 2D NOESY wykonane w temperaturze 20 °C. W oparciu o efekty NOE wyznaczyłem więzy na odległości między atomami stosując metodę ISPA¹⁰⁰. W metodzie tej odległość d_{ij} między dwoma protonami i oraz j otrzymuje się według wzoru:

$$d_{ij} = \left(\frac{A_{wz}}{A_{ij}} \right)^{1/6} d_{wz}, \quad (18)$$

gdzie A_{wz} oraz A_{ij} są odpowiednio objętością sygnału wzorca oraz danego sygnału NOE. We wzorze wielkość d_{wz} jest odległością pomiędzy parą protonów wzorca. Jako sygnał wzorca przyjąłem sygnał korelacyjny protonów H5-H6 pirymidyn, które znajdują się w odległości 2.45 Å¹⁹⁷. Dolne i górne granice więzów odległościowych obliczałem przyjmując wartości

błędów odpowiednio -15% i +30%. Większy błąd dla górnej granicy przyjąłem dlatego, że przy zastosowanym czasie mieszania 150 ms możliwe jest wystąpienie efektu dyfuzji spinów. Efekt ten wpływa na wielkość wzmocnienia NOE i może prowadzić do jego zawyżenia. W widmach wykonanych z krótszym czasem mieszania niż 150 ms, stosunek sygnału do szumu był zbyt mały, aby widma te nadawały się do analizy ilościowej.

Dodatkowe więzy odległościowe o zakresie 4.5 – 7.0 Å zadawałem na pary protonów, dla których sygnały NOE występowały w widmach 2D NOESY, wykonanych z czasem mieszania 400 ms, a nie były widoczne w analogicznych widmach z czasem mieszania 150 ms.

Dla protonów wymieniających, dla których sygnały korelacyjne były widoczne w widmach 2D NOESY wykonanych w mieszaninie 90% H₂O/10% D₂O, wprowadziłem więzy odległościowe w granicach 1.8 – 6.0 Å. W oparciu o te widma dla wszystkich reszt nałożyłem więzy na kanoniczne parowanie się zasad i ich planarność. Na istnienie wiązań wodorowych, typowych dla par Watsona-Cricka wskazywały między innymi charakterystyczne przesunięcia chemiczne protonów iminowych oraz aminowych. W przypadku par **A:U** dodatkowym argumentem przemawiającym za występowaniem par Watsona-Cricka były bardzo intensywne sygnały korelacyjne pomiędzy protonami H2 reszt adenozyne, a protonami iminowymi komplementarnych reszt urydyny. Na tworzenie się kanonicznych par **G:C** wskazywała obecność sygnałów korelacyjnych pomiędzy protonami iminowymi reszt guanozyny a protonami aminowymi komplementarnych reszt cytydyny. W oparciu o powyższe rozważania, oraz zgodnie ze znaną w kwasach nukleinowych geometrią oddziaływań Watsona-Cricka, zadałem więzy z granicą błędu ± 0.2 Å pomiędzy atomami parujących się zasad¹²².

2.1.2.2. Analiza konformacji pierścieni cukrowych

W cząsteczkach kwasów nukleinowych, utworzony przez atomy węgla C1', C2', C3', C4' oraz atom tlenu O4' pierścień cukrowy może przyjmować różne konformacje. Typową dla dwuniciowych cząsteczek A-RNA jest konformacja C3'-*endo*, natomiast charakterystyczną dla struktur B-DNA jest konformacja C2'-*endo*. Geometrię pierścienia rybozy można opisać za pomocą pięciu endocyklicznych kątów torsyjnych ν_i (Rys 3).

Podstawową metodą analizy konformacyjnej części cukrowej kwasów nukleinowych są techniki oparte na pomiarze homojądrowych sprzężeń skalarnych ¹H-¹H. Z uwagi na różne

wartości sprzężeń $^3J_{H1'H2'}$, $^3J_{H2'H3'}$ oraz $^3J_{H3'H4'}$ techniki te pozwalają z dużą dokładnością określić, z którym konformerem mamy do czynienia w danej jednostce nukleotydowej. Dla próbek wzbogaconych izotopowo opracowane zostały dodatkowe metody opierające się na analizie heterojądrowych sprzężeń 1H - ^{13}C ¹⁹⁸⁻²⁰⁰. Z uwagi na silne nakładanie się sygnałów, rzadziej stosowane są metody bazujące na pomiarze efektu NOE pomiędzy protonami pierścienia cukrowego²⁰¹.

Konformację reszt rybozy w duplekcie RNA wyznaczyłem w oparciu o analizę sygnałów korelacyjnych $H1'$ - $H2'$ w widmach DQF-COSY. Stosunkowo łatwo ją określić, ponieważ dwie najczęściej występujące konformacje pierścieni cukrowych charakteryzują się znacznie różniącymi się wartościami sprzężeń skalarnych $^3J_{H1'H2'}$. W konformacji N stała sprzężenia $H1'$ - $H2'$ jest bardzo mała - poniżej 2 Hz, natomiast w konformacji S sprzężenie to wynosi około 8 – 10 Hz.

W regionie $H1'$ - $H2'$ widma DQF-COSY dupletu **I** (Rys. 25) zauważyć można jedynie cztery sygnały należące do terminalnych reszt **G1**, **G10**, **C11** i **C20**. Najsilniejsze z nich pochodzą od reszt **G10** i **C20** z końca 3'. Na podstawie struktury subtelnej tych sygnałów zmierzyłem wartości stałych sprzężenia, które wynoszą około 4 Hz. Ponieważ wielkość ta jest pośrednia pomiędzy wartościami oczekiwanymi dla konformacji N i S, przyjąłem, że pierścienie cukrowe tych reszt znajdują się w równowadze pomiędzy stanem S i N. Dwa pozostałe sygnały pochodzą od reszt z końca 5' i mają mniejsze intensywności. Wyznaczone wartości stałych sprzężenia $H1'$ - $H2'$ dla obu tych reszt wynoszą blisko 3 Hz. Stąd mogłem wnioskować, że również i te reszty rybozy znajdują się w równowadze N-S, lecz ze znaczną przewagą populacji N. Udział populacji *C2'-endo* w terminalnych resztach nukleotydowych może być wynikiem tzw. zjawiska topnienia końców dupletu. Brak sygnałów od pozostałych reszt w widmach DQF-COSY świadczy o tym, że wielkości sprzężeń $H1'$ - $H2'$ są bardzo małe (< 2 Hz). W związku z tym mogłem założyć, że udział konformacji *C3'-endo* dla tych nukleotydów wynosi prawie 100%. Ta analiza pozwoliła wprowadzić odpowiednie więzy na kąty torsyjne pierścieni cukrowych wszystkich reszt nukleotydowych. Dla układów cukrowych, dla których sygnały $H1'$ - $H2'$ nie były obserwowane wprowadzałem więzy narzucające konformację N. W pozostałych przypadkach zadawałem bardzo słabe więzy (Tabela 4), które pozwalały na przyjęcie przez te reszty zarówno konformacji *C3'-endo* jak i *C2'-endo*.

Tabela 4. Zakresy zadanych więzów na kąty endocykliczne pierścieni cukrowych.

Symbol	Definicja kąta torsyjnego	Zakresy więzów dla reszt w konformacji N [°]	Zakresy więzów dla reszt terminalnych [°]
v_0	C1'-C2'-C3'-C4'	3 ± 15	-0.5 ± 35
v_1	C2'-C3'-C4'-O4'	-25 ± 15	0 ± 55
v_2	C3'-C4'-O4'-C1'	37 ± 15	1 ± 65
v_3	C4'-O4'-C1'-C2'	-36 ± 15	-1.5 ± 65
v_4	O4'-C1'-C2'-C3'	21 ± 15	1.5 ± 50

2.1.2.3. Analiza kątów torsyjnych wokół wiązań N-glikozydowych

Orientacja zasady heterocyklicznej względem pierścienia cukrowego opisana jest za pomocą kąta torsyjnego χ , zdefiniowanego dla nukleozydów purynowych przez atomy O4'-C1'-N9-C4, lub O4'-C1'-N1-C2 dla nukleozydów pirymidynowych²². W cząsteczkach kwasów nukleinowych kąty te przyjmują wartości, które znajdują się w dwóch charakterystycznych zakresach. Gdy kąt torsyjny χ przyjmuje wartość z przedziału od -180° do 90° mówimy o konformacji *anti*, natomiast gdy znajduje się w przedziale od 40° do 90° mamy do czynienia z konformacją *syn*. Wartość kąta wokół wiązania N-glikozydowego można wyznaczyć na podstawie pomiaru wielkości heterojądrowych sprzężeń skalarnych^{202,203}, analizy przesunięć chemicznych^{28,204} lub na podstawie pomiaru efektu NOE^{28,201}.

Kąty torsyjne χ określiłem na podstawie analizy sygnałów korelacyjnych widm 2D NOESY ($\tau_m = 150$ ms) wykonanych w D₂O. W aromatyczno-anomerycznym regionie widma większość sygnałów, za wyjątkiem korelacji protonów H5-H6 tych samych jednostek pirymidynowych, odznaczała się małą intensywnością. W konformacji *syn* odległość pomiędzy protonem H6 lub H8 a protonem anomerycznym tej samej jednostki wynosi 2 – 2.5 Å. W przypadku tej konformacji należałoby oczekiwać w widmie 2D NOESY sygnałów o porównywalnych intensywnościach z sygnałami korelacyjnymi H5-H6 reszt pirymidynowych. Tak intensywne oddziaływania jednak nie występowały. Ta wstępnie przeprowadzona analiza intensywności sygnałów H6/H8-H1' wskazywała na konformację *anti* reszt nukleotydocy. Pomiar wielkości efektów NOE, którego podstawą była integracja sygnałów, jednoznacznie potwierdził wcześniejsze rozważania. Zmierzonym objętościom sygnałów odpowiadały odległości rzędu 3.4 – 3.5 Å, co wskazywało na konformację *anti*.

Jedynie dla terminalnych reszt efekty NOE były nieco silniejsze (3.2 Å), prawdopodobnie spowodowane ich większą swobodą konformacyjną wynikającą z topnienia końców dupleksu.

Również analiza otrzymanych odległości międzyprotonowych H6/H8-H2' oraz H6/H8-H3', uwzględniająca ich zależność od konformacji pierścienia rybozy wskazywała na orientację *anti*. W przypadku jednostek adenozynowych dodatkowe argumenty potwierdzające taką konformację otrzymałem z analizy oddziaływań NOE protonów H2 z protonami pierścieni cukrowych tych samych jednostek nukleotydowych. W widmach 2D NOESY (400 ms) obserwowałem jedynie kontakty intranukleotydowe pomiędzy protonami H2 i H1', natomiast nie rejestrowałem korelacji do pozostałych protonów pierścienia cukrowego.

Przeprowadzona analiza wskazywała na typową strukturę A-RNA i pozwoliła wyprowadzić więzy na kąty χ w zakresie $-158 \pm 30^\circ$.

2.1.2.4. Analiza kątów torsyjnych w łańcuchach fosforocukrowych

Określenie wartości kątów torsyjnych α i ζ szkieletu fosforocukrowego zarówno cząsteczek RNA, jak i DNA metodami spektroskopii NMR obarczone jest dużym stopniem niepewności²⁸. Kąty te, zdefiniowane przez atomy $O3'_{n-1}-P-O5'-C5'$ (α) oraz $C3'-O3'-P_{n+1}-O5'_{n+1}$ (ζ) nie mogą być wyznaczone bezpośrednio z pomiaru wartości stałych sprzężeń, ponieważ w przyrodzie nie występuje trwały izotop tlenu o spinie 1/2. Dlatego też jedyne źródło informacji o tych kątach stanowią przesunięcia chemiczne jąder fosforu¹⁰⁵.

Analiza przesunięć chemicznych ^{31}P NMR badanego dupleksu wykazała, że wszystkie sygnały znajdują się w charakterystycznym dla konformacji A-RNA zakresie od -3.5 do -4.5 ppm (względem sygnału TMP). Na tej podstawie można było wprowadzić tylko bardzo swobodne więzy wykluczające konformację *trans* obu kątów ($0 \pm 120^\circ$).

Kąt β , wyznaczony przez atomy $P-O5'-C5'-C4'$, oraz kąt torsyjny ϵ ($C4'-C3'-O3'-P_{n+1}$) można określić na podstawie analizy heterojądrowych sprzężeń skalarnych pomiędzy atomami fosforu a protonami pierścienia cukrowego H3', H4', H5' i H5''. Obserwowane w widmach $^1\text{H}-^{31}\text{P}$ HSQC intensywne sygnały korelacyjne pochodzą od oddziaływań H3'-P i wskazują na duże wartości stałych sprzężeń skalarnych pomiędzy spinami tych jąder. W regularnych, prawoskrętnych strukturach helikalnych, sprzężenia te są rzędu 8 – 10 Hz. Na tej podstawie mogłem przyjąć, że w duplesie I kąty ϵ przyjmują wartości typowe dla formy

A-RNA z przedziału $-153 \pm 30^\circ$, i tym samym pozwoliło mi to nałożyć podczas obliczeń odpowiednie więzy. Z uwagi na silne nakładanie się sygnałów H3'-P dla reszt **G1**, **G4**, **C13** oraz **U14** nie mogłem jednoznacznie oszacować wartości kątów ϵ , stąd dla tych jednostek nukleotydowych wprowadziłem swobodne więzy ($-120 \pm 120^\circ$) wykluczające jedynie sterycznie wzbronioną konformację *gauche*⁺.

W widmie obserwowałem również słabsze sygnały pochodzące od sprzężeń pomiędzy protonami H5', H5'' a jądrami fosforu. Sprzężenia te dostarczają informacji o wartościach kątów β ²⁸. W typowej, najczęściej spotykanej w cząsteczkach RNA konformacji *trans* oba sprzężenia ³J_{PH5'} i ³J_{PH5''} są małe (poniżej 5 Hz), w przeciwieństwie do konformacji *gauche*⁻ oraz *gauche*⁺, dla których jedno ze sprzężeń jest rzędu 10 Hz. Ta szacunkowa ocena sprzężeń skalarnych pozwoliła mi przyjąć, że w badanym duplekcie kąty β odpowiadają typowej dla formy A-RNA konformacji *trans*. Tym samym podczas obliczeń mogłem wprowadzić odpowiednie więzy na kąty β ($178 \pm 30^\circ$).

Kąt torsyjny γ określa przestrzenną orientację podstawnika przy atomie C5' w łańcuchu fosfodiestrowym względem pierścienia rybozy i zdefiniowany jest przez atomy O5'-C5'-C4'-C3'. Wartości kątów γ można ustalić z pomiaru wicynalnych stałych sprzężeń ³J_{H4'H5'} oraz ³J_{H4'H5''}, ponieważ występujące w przyrodzie trzy klasyczne rotametry (*gauche*⁺, *gauche*⁻ oraz *trans*) związane są z różnymi wartościami tych sprzężeń¹⁹⁴. W niektórych przypadkach (konformacja *trans* oraz *gauche*⁻) dodatkowych informacji mogą dostarczyć pomiary heterojądrowych sprzężeń ³J_{C3'H5'} i ³J_{C3'H5''}, prowadzone dla próbek wzbogaconych izotopem ¹³C.

Kąty γ badanego dupleksu wyznaczyłem na podstawie analizy widm DQF-COSY (600 MHz, D₂O). W regularnych cząsteczkach A-RNA dominującą formą jest konformacja *gauche*⁺, dla której wartości sprzężeń ³J_{H4'H5'} i ³J_{H4'H5''} są rzędu 2 – 3 Hz. Brak sygnałów korelacyjnych w widmie DQF-COSY pomiędzy protonami H4' i H5'/H5'' wskazywał na małe wartości tych stałych sprzężeń. Stąd mogłem przyjąć, że w analizowanym duplekcie kąty γ znajdują się w typowym dla formy A-RNA zakresie ($54 \pm 30^\circ$). Również analiza widma ¹H-³¹P HSQC dostarczyła dodatkowych argumentów wskazujących na konformację *gauche*⁺. W widmie tym zaobserwować można słabe intranukleotydowe sygnały H4'-P pochodzące od heterojądrowych sprzężeń skalarnych poprzez cztery wiązania. Obserwacja tych sprzężeń możliwa jest jedynie wtedy, gdy wiązania chemiczne w łańcuchu P-O5'-C5'-C4'-H4' ułożone są w kształcie litery W. Taki przestrzenny układ wiązań jest charakterystyczny dla struktur

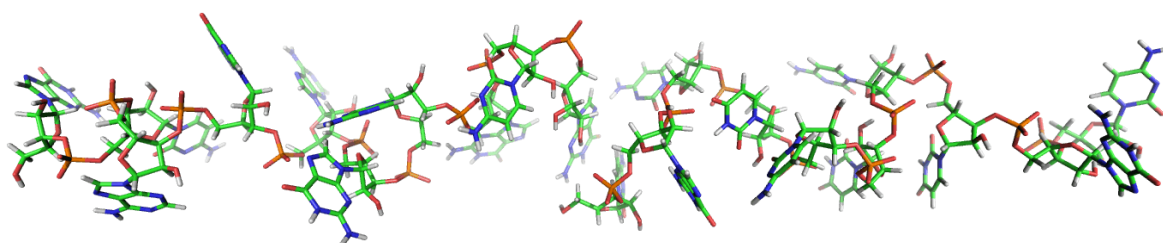
typu A-RNA, stąd obserwacja sygnałów H4'-P była dodatkowym potwierdzeniem nałożonych więzów na kąty torsyjne β i γ . Podczas obliczeń na kąty torsyjne γ wszystkich reszt nukleotydowych dupleksu **I**, zostały narzucone odpowiednie więzy determinujące konformację *gauche*⁺.

W szkielecie fosforocukrowym kąt torsyjny δ , utworzony wzdłuż wiązań C5'-C4'-C3'-O3', ściśle związany jest z konformacją rybozy. Analiza konformacyjna pierścieni cukrowych dupleksu **I** przedstawiona została w rozdziale IV.2.1.2.2.

2.1.3. Restryktywna dynamika molekularna (I)

Obliczenia strukturalne przeprowadziłem w oparciu o algorytm dynamiki molekularnej w przestrzeni kątów torsyjnych¹⁵² (TAMD – ang. *Torsion Angle Molecular Dynamics*) zaimplementowany w pakiecie Xplor-NIH^{205,206}. Podczas obliczeń posługiwałem się zmodyfikowaną wersją pola siłowego CHARMM²⁰⁷. Wyjściowe modele dupleksu wygenerowane zostały za pomocą standardowego skryptu dostarczonego w programie (*generate_template.inp*). Aby uniezależnić wynik obliczeń od warunków początkowych, obliczenia prowadziłem dla zbioru pięćdziesięciu liniowych, przypadkowych struktur o prawidłowej geometrii wiązań kowalencyjnych i chiralności atomów węgla (Rys. 40). Następnie dla każdej struktury przeprowadziłem obliczenia dynamiki molekularnej zgodnie z protokołem TAMD, który składał się z czterech etapów. W pierwszym etapie przeprowadzana była 64 ps dynamika molekularna w przestrzeni kątów torsyjnych (8 000 cykli) w temperaturze 20 000 K. Podczas tego etapu stałe siłowe na więzy NOE (w_{NOE}) wzrastały liniowo od 2 do 75 kcal·mol⁻¹·Å⁻², natomiast współczynniki wagowe na oddziaływania van der Waalsa (w_{vdW}) malały z 5 do 0.3. Stała siłowa na więzy kątów torsyjnych (w_{dihedral}) była niezmienna i wynosiła 100 kcal·mol⁻¹·rad⁻². Po tym etapie nastąpiło powolne schładzanie w przeciągu 70 ps dynamiki TAMD (10 000 cykli) do temperatury 300 K. W trakcie tego etapu stałe siłowe na oddziaływania vdW wzrastały od 0.3 do 1.0, natomiast stałe siłowe na więzy NOE nie zmieniały się i wynosiły 100 kcal·mol⁻¹·Å⁻². W trzecim kroku przeprowadzone zostało schładzanie od temperatury początkowej 3 000 K do 300 K w kartezyjskim układzie współrzędnych (6 000 cykli), a następnie przeprowadzona została minimalizacja energii metodą gradientów sprzężonych¹²⁹ (1 000 cykli). Podczas obu tych etapów wartość stałej siłowej na kąty torsyjne wynosiła 200 kcal·mol⁻¹·rad⁻², natomiast współczynniki wagowe na więzy NOE wynosiły odpowiednio 125 kcal·mol⁻¹·Å⁻² dla etapu

schładzania, oraz $200 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{\AA}^{-2}$ podczas minimalizacji. Końcowe struktury otrzymałem po przeprowadzeniu tzw. procedury udokładnienia. Podczas tego etapu obliczeń wprowadziłem dodatkowe więzy na planarność, które ograniczały parametry *buckle* i *stagger* parujących się zasad¹²². W protokole udokładnienia wykorzystałem również potencjały na kąty torsyjne (RAMA) i wzajemne orientacje zasad (ORIE) zdefiniowane w bazie DELPHIC²⁰⁸. Zastosowany przeze mnie standardowy protokół nie dawał wymaganej zgodności ze wszystkimi odległościami międzyatomowymi oraz długościami wiązań kowalencyjnych. Dlatego w końcowym etapie protokołu udokładnienia wprowadziłem dodatkowo 200 cykli dynamiki metodą Verlet, która zakończona została 600 krokami minimalizacji energii metodą gradientów sprzężonych. Zabieg ten nie zmieniał zasadniczo struktur końcowych, natomiast zdecydowanie poprawiał geometrię cząsteczki.



Rys. 40. Przykładowa struktura początkowa dupleksu referencyjnego.

Ważniejsze parametry zastosowanego protokołu zestawione zostały w tabeli 5, natomiast wykorzystane podczas obliczeń skrypty znajdują się w aneksie 5.

Tabela 5. Protokół dynamiki symulowanego wyżarzania w przestrzeni kątów torsyjnych.

	Etap 1	Etap 2	Etap 3	Etap 4
	Dynamika wysokotemperaturowa TAMD	Powolne schładzanie w przestrzeni kątów torsyjnych	Powolne schładzanie w układzie kartezyjskim	Minimalizacja metodą gradientów sprzężonych
temperatura	20 000 K	20 000 K \Rightarrow 300 K	3000 K \Rightarrow 300 K	–
liczba iteracji	8000	10000	6000	1200
krok całkowania	0.008 ps	0.007 ps	0.003 ps	–
Δt	64 ps	70 ps	18 ps	–
w_{NOE}	2 \Rightarrow 75	100	125	200
w_{dihedral}	100	100	200	200
w_{vdW}	5 \Rightarrow 0.3	0.3 \Rightarrow 1.0	1.0	1.0

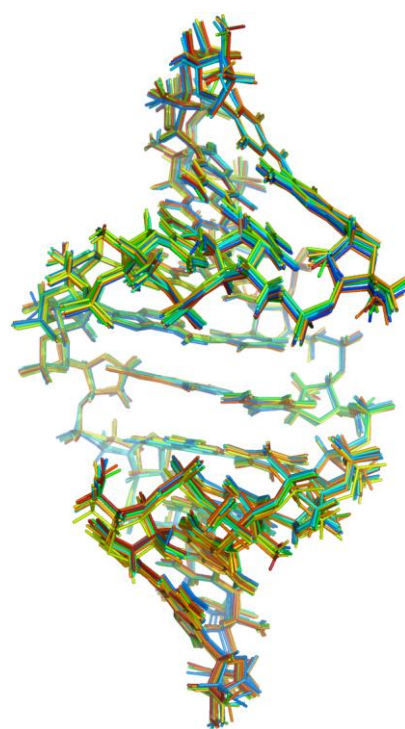
Podczas obliczeń wykorzystałem 367 więzów odległościowych otrzymanych na podstawie analizy widm 2D NOESY, oraz 212 więzów na kąty torsyjne. Dokładna statystyka więzów zamieszczona została w tabeli na rysunku 41. W wyniku obliczeń z 50 liniowych struktur

początkowych otrzymałem 40 struktur dupleksów, które zachowywały prawidłową stereochemię, oraz nie naruszały odległościowych ($\leq 0.3 \text{ \AA}$) i kątowych ($\leq 5^\circ$) więzów NMR. Spośród tych struktur, do dalszej analizy, wybrałem 10 struktur o najniższej energii. Struktury te wykazują bardzo duże podobieństwo i należą do jednej rodziny (Rys. 41). Obliczone dla 10 struktur średnie wartości odchylenia standardowego (RMSD) dla wszystkich ciężkich atomów wynoszą $0.31 \pm 0.07 \text{ \AA}$, oraz $0.38 \pm 0.06 \text{ \AA}$ dla ciężkich atomów szkieletu fosforocukrowego.

Współrzędne kartezjańskie końcowych struktur zdeponowałem w banku danych PDB (*Protein Data Bank*) pod identyfikatorem 2JXQ.

Statystyka więzów wykorzystanych w obliczeniach.

Całkowita liczba więzów NOE:	367
intranukleotydowe	216
internukleotydowe	151
Więzy na wiązania wodorowe	60
Więzy na planarność	10
Więzy na kąty dwuścienne:	212
szkieletu fosfodiesterowego	92
rybozy	100
wiązania glikozydowego	20
Średnia liczba więzów NOE przypadających na resztę nukleotydową	18.35
Średnia liczba więzów NOE oraz więzów na kąty dwuścienne przypadających na resztę nukleotydową	28.95



Rys. 41. Superpozycja rodziny 10 struktur przestrzeni konformacyjnej duplesu referencyjnego.

2.1.4. Analiza przestrzeni konformacyjnej rodziny struktur (I)

Dla wyznaczonych struktur przeprowadziłem analizę przestrzeni konformacyjnej za pomocą programu Curves^{30,31} w wersji 5.3. Uśrednione z 10 końcowych struktur wartości kątów torsyjnych łańcuchów fosfodiesterowych i kątów wokół wiązań N-glikozydowych oraz parametrów P i v_{max} - określających pofałdowanie pierścieni cukrowych, zestawione zostały w tabeli 6. Natomiast średnie wartości wybranych parametrów helikalnych wraz z odchyleniami standardowymi zebrane zostały w tabeli 7.

Tabela 6. Średnie wartości kątów torsyjnych łańcuchów fosfodiesterowych (α , β , γ , δ , ϵ , ζ), kąta glikozydowego (χ) oraz parametrów opisujących konformację pierścieni cukrowych (P, v_{max}) obliczonych dla dupleksu I. W nawiasach podane zostały wartości odchylenia standardowego.

Reszta	α	β	γ	δ	ϵ	ζ	χ	P	v_{max}
G1	–	–	24 (1)	87 (1)	207 (4)	291 (3)	197 (2)	7 (3)	38 (0)
C2	283 (5)	169 (6)	65 (2)	83 (0)	212 (2)	289 (2)	200 (2)	13 (1)	40 (0)
A3	289 (5)	173 (4)	58 (7)	79 (1)	199 (3)	295 (3)	194 (2)	29 (1)	41 (1)
G4	294 (7)	192 (4)	36 (8)	81 (1)	202 (2)	290 (3)	205 (2)	16 (3)	41 (1)
A5	301 (5)	167 (5)	54 (5)	79 (1)	200 (2)	296 (3)	202 (3)	24 (2)	42 (1)
G6	293 (4)	187 (2)	42 (5)	80 (1)	201 (3)	287 (4)	201 (4)	20 (4)	41 (1)
A7	291 (7)	174 (5)	58 (8)	81 (1)	195 (2)	306 (5)	204 (3)	17 (2)	41 (1)
G8	289 (5)	191 (9)	44 (7)	79 (1)	203 (5)	289 (4)	200 (6)	23 (4)	41 (1)
C9	284 (10)	162 (6)	76 (6)	85 (1)	202 (2)	295 (3)	206 (3)	19 (2)	36 (1)
G10	293 (4)	206 (2)	24 (0)	88 (1)	–	–	221 (2)	4 (1)	37 (0)
C11	–	–	25 (1)	86 (1)	204 (2)	292 (3)	199 (1)	6 (2)	38 (1)
G12	303 (3)	180 (4)	44 (2)	85 (1)	214 (3)	283 (4)	206 (2)	9 (2)	38 (0)
C13	304 (5)	165 (6)	43 (3)	82 (1)	198 (2)	290 (3)	208 (1)	14 (2)	41 (0)
U14	303 (3)	192 (4)	33 (4)	83 (1)	210 (4)	286 (3)	217 (2)	10 (1)	40 (1)
C15	305 (6)	159 (4)	54 (7)	80 (1)	206 (2)	282 (2)	205 (3)	17 (2)	41 (1)
U16	310 (3)	183 (5)	31 (4)	85 (1)	217 (5)	279 (4)	211 (1)	6 (2)	40 (0)
C17	305 (3)	156 (8)	53 (6)	80 (1)	203 (2)	286 (2)	202 (4)	20 (2)	41 (1)
U18	301 (3)	184 (6)	39 (8)	84 (1)	199 (2)	297 (1)	211 (2)	11 (4)	39 (0)
G19	299 (3)	180 (5)	49 (4)	80 (1)	200 (3)	289 (3)	198 (2)	23 (2)	40 (0)
C20	293 (5)	178 (5)	52 (3)	86 (1)	–	–	215 (2)	11 (1)	37 (0)
Średnia:	297 (8)	178 (13)	45 (14)	83 (3)	204 (6)	290 (6)	205 (7)	15 (7)	40 (2)
A-RNA ^{209,210}	294	186	49	88	202	294	202	18	39

Tabela 7. Uśrednione wartości wybranych parametrów helikalnych wraz z odchyleniami standardowymi dla dupleksu I.

Para zasad	<i>x-Displacement</i> dx (Å)	<i>y-Displacement</i> dy (Å)	<i>Inclination</i> η (°)	<i>Propeller twist</i> ω (°)
G1-C20	-4.7 (0.1)	-0.2 (0.1)	19 (1)	-12 (3)
C2-G19	-4.7 (0.1)	0.6 (0.1)	17 (1)	-11 (2)
A3-U18	-4.8 (0.1)	0.0 (0.1)	19 (1)	-6 (2)
G4-C17	-4.6 (0.1)	0.1 (0.1)	17 (1)	-4 (2)
A5-U16	-4.8 (0.1)	0.1 (0.1)	20 (1)	-11 (2)
G6-C15	-4.4 (0.1)	-0.1 (0.1)	18 (2)	-6 (3)
A7-U14	-4.8 (0.1)	0.2 (0.1)	21 (2)	-9 (2)
G8-C13	-4.4 (0.2)	-0.3 (0.2)	17 (2)	-7 (2)
C9-G12	-4.3 (0.1)	0.3 (0.1)	20 (2)	-25 (2)
G10-C11	-4.6 (0.2)	-0.1 (0.2)	19 (1)	-1 (3)
Średnia:	-4.6 (0.2)	0.1 (0.3)	19 (2)	-9 (7)
A-RNA ¹⁶¹ :	-5.3	0.0	16	-14

Sekwencja par zasad	<i>Shift</i> D _x (Å)	<i>Rise</i> D _z (Å)	<i>Twist</i> Ω (°)	<i>Roll</i> ρ (°)
G1-C2	0.0 (0.1)	2.6 (0.1)	36 (1)	-10 (1)
C2-A3	-0.1 (0.1)	2.8 (0.1)	30 (2)	7 (2)
A3-G4	0.2 (0.2)	2.3 (0.1)	34 (2)	2 (3)
G4-A5	0.0 (0.1)	2.5 (0.1)	30 (2)	1 (2)
A5-G6	0.4 (0.2)	2.6 (0.1)	34 (2)	7 (3)
G6-A7	-0.5 (0.2)	2.6 (0.1)	32 (2)	-2 (3)
A7-G8	0.6 (0.2)	2.4 (0.1)	30 (2)	7 (3)
G8-C9	0.3 (0.2)	2.6 (0.1)	36 (2)	-7 (1)
C9-G10	-0.6 (0.1)	2.8 (0.2)	34 (1)	4 (1)
Średnia:	0.2 (0.4)	2.6 (0.2)	33 (3)	1 (6)
A-RNA ¹⁶¹ :	0.0	2.8	33	0

Struktura dupleksu referencyjnego wykazuje cechy regularnej struktury prawoskrętnej z wszystkimi cechami charakterystycznymi dla podwójnej helisy A-RNA. Wymienić tu można zarówno konformację *anti* pierścieni zasad heterocyklicznych, jak i konformację C3'-*endo* pierścieni cukrowych. We wszystkich jednostkach nukleotydowych kąty χ niewiele się różnią, a ich średnia wartość ($205 \pm 7^\circ$) w granicach błędu odpowiada otrzymanej dla formy A-RNA (202°). Podobnie parametry P i v_{max} określające konformację reszt cukrowych niewiele odbiegają od obserwowanych w kanonicznych strukturach A-RNA i przyjmują średnie wartości odpowiednio $15 \pm 7^\circ$ i $40 \pm 2^\circ$.

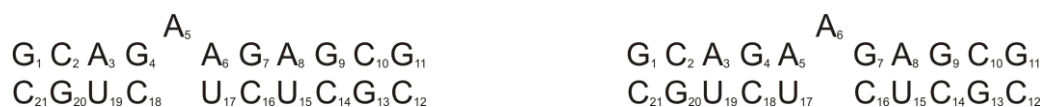
Zachowane zostały również wiązania wodorowe typu Watsona-Cricka. Regularność otrzymanych struktur potwierdzona została analizą kątów torsyjnych szkieletu fosfodiesterowego. Wartości wszystkich kątów zawierają się w standardowych dla dupleksów typu A-RNA zakresach. Również analiza parametrów helikalnych pozwala zaklasyfikować dupleks referencyjny jako typową strukturę A-RNA, a otrzymane wartości parametrów

x-Displacement ($-4.6 \pm 0.2 \text{ \AA}$) oraz *Inclination* ($39 \pm 2^\circ$) tylko nieznacznie różnią się od typowych dla formy kanonicznej. Również średnia wartość parametru *Rise* ($2.6 \pm 0.2 \text{ \AA}$) oraz *Propeller twist* ($-9 \pm 7^\circ$) klasyfikuje dupleks referencyjny jako typową strukturę A-RNA, a obserwowane dla tego ostatniego parametru zmiany wynikają z próby dostosowania się sparowanych jednostek nukleotydowych do ich oddziaływań z sąsiednimi resztami. Pozostałe parametry nie wykazują większych różnic w stosunku do wartości obserwowanych dla struktur kanonicznych.

2.2. Badania strukturalne dupleksu II

2.2.1. Analiza strukturalna w oparciu o widma NMR (II)

Druga z analizowanych przeze mnie cząsteczek posiadała prawie identyczną sekwencję zasad, jak omawiany w poprzednim rozdziale dupleks I, z tym że w centralnej pozycji w górnej nici wprowadzono dodatkową resztę adenozy. Ponieważ w górnej nici, obok siebie znajdują się dwie reszty adeniny A5 i A6, naprzeciwko jednej, komplementarnej do nich, reszty urydyny U17, to teoretycznie każda z reszt adeniny, A5 lub A6, może tworzyć parę z komplementarną urydyną U17 (Rys. 42), bądź też może istnieć równowaga pomiędzy tymi dwoma strukturami.

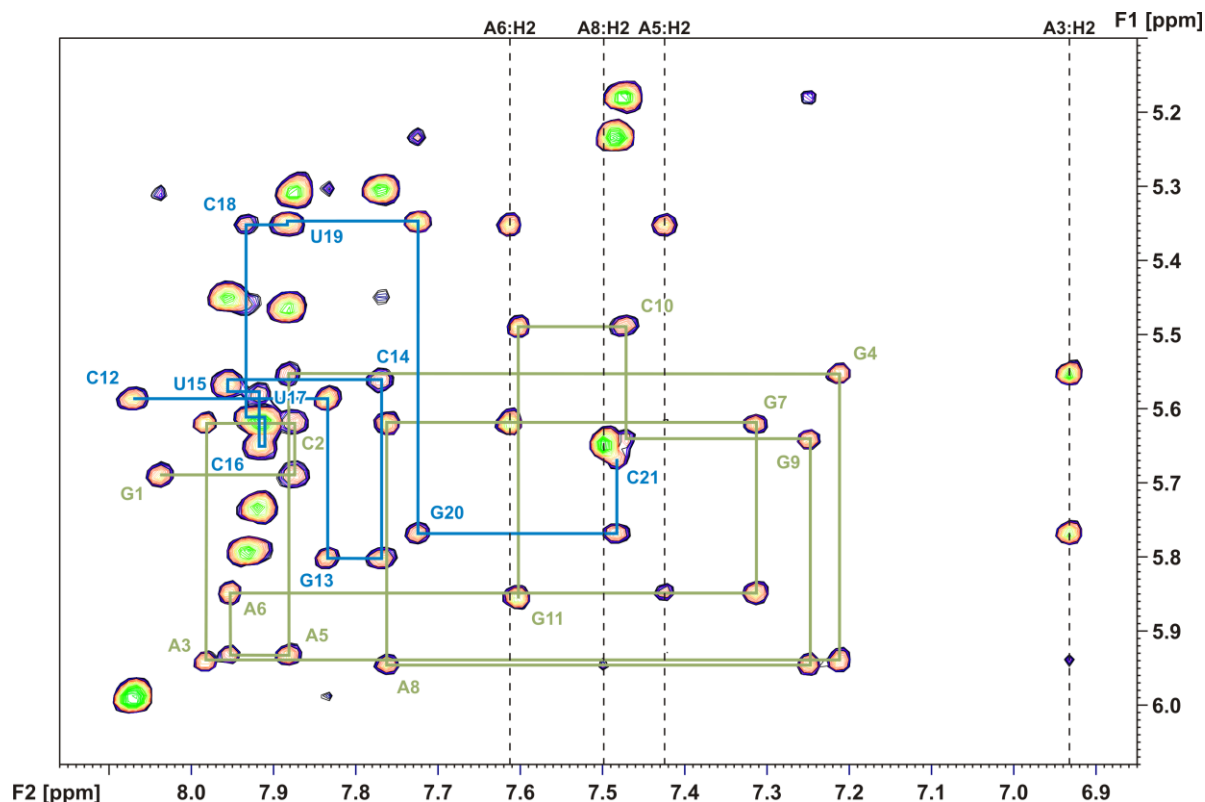


Rys. 42. Dwie możliwe struktury drugorzędowe dupleksu II.

Przypisania sygnałów ^1H , ^{13}C oraz ^{31}P NMR dokonałem w oparciu o widma 2D NOESY, TOCSY i DQF-COSY oraz heterojądrowe widma korelacyjne ^1H - ^{13}C i ^1H - ^{31}P HSQC stosując te same metody, co podczas analizy widm dupleksu referencyjnego. Sygnały obserwowane w widmie 2D NOESY (D_2O) wykazują typowe cechy sekwencyjnych oddziaływań charakterystycznych dla dwuniciowych fragmentów cząsteczek A-RNA.

Układ sygnałów w widmach dupleksów I i II jest bardzo podobny, dlatego w tym rozdziale skupię się głównie na dokonaniu analizy strukturalnej fragmentu wybrzuszenia oraz pokazaniu różnic obserwowanych w widmach obu cząsteczek wywołanych obecnością

dotatkowej, niesparowanej reszty. Fragment widma 2D NOESY z zaznaczonymi ścieżkami NOE wyznaczonymi dla obu nici dupletu **II** przedstawiony jest na rysunku 43.

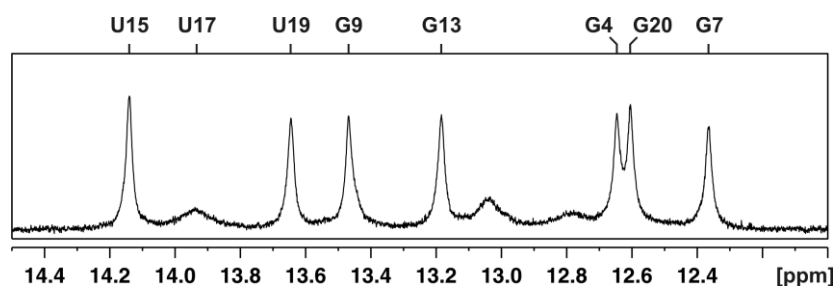


Rys. 43. Region sygnałów H2/H6/H8-H5/H1' w widmie 2D NOESY ($\tau_m = 400$ ms) dupletu **II** w D_2O (600 MHz, 25°C). W widmie zaznaczona została sekwencyjna ścieżka H6/H8_(i)-H1'_(i)-H6/H8_(i+1) – kolorem zielonym dla górnej nici, natomiast niebieskim – dla dolnej nici. Przerwane linie wskazują położenie sygnałów H2 reszt adenozyiny.

Dla nici zawierającej niesparowaną resztę adeniny zaobserwowałem nieprzerwany szlak połączeń sekwencyjnych H6/H8-H1' łącznie z regionem wybrzuszenia **-G4-A5-A6-G7-**. Niestety, w przypadku drugiej nici, z uwagi na nakładanie się sygnałów korelacyjnych reszt **C16** i **U17** w widmach wykonanych w zakresie temperatur 15 – 35°C, nie udało się jednoznacznie ustalić, czy zachowane są oddziaływania warstwowe pomiędzy tymi dwoma resztami. W oparciu o wyznaczone ścieżki NOE przypisałem sygnały pochodzące od protonów zasad heterocyklicznych oraz protonów anomerycznych. W celu przypisania pozostałych sygnałów rezonansowych zastosowałem standardowe metody, jak dla dupletu referencyjnego. Poprawność przypisań sygnałów 1H NMR potwierdziłem poprzez analizę widm korelacyjnych 1H - ^{13}C HSQC i 1H - ^{31}P HSQC. Przypisałem wszystkie sygnały rezonansowe protonów niewymienialnych z wyjątkiem protonów H5'/H5'' dla kilku reszt nukleotydowych oraz protonów H4' reszt **C2** i **G7**. Brakujące przesunięcia chemiczne

sygnałów H4' wyznaczyłem przez porównanie z widmami dupleksu referencyjnego. Również poprawność przypisania sygnałów geminalnych protonów H5'/H5'' reszt **C2**, **A3** i **G13** potwierdziłem wykorzystując analizę porównawczą z widmami dupleksu **I**.

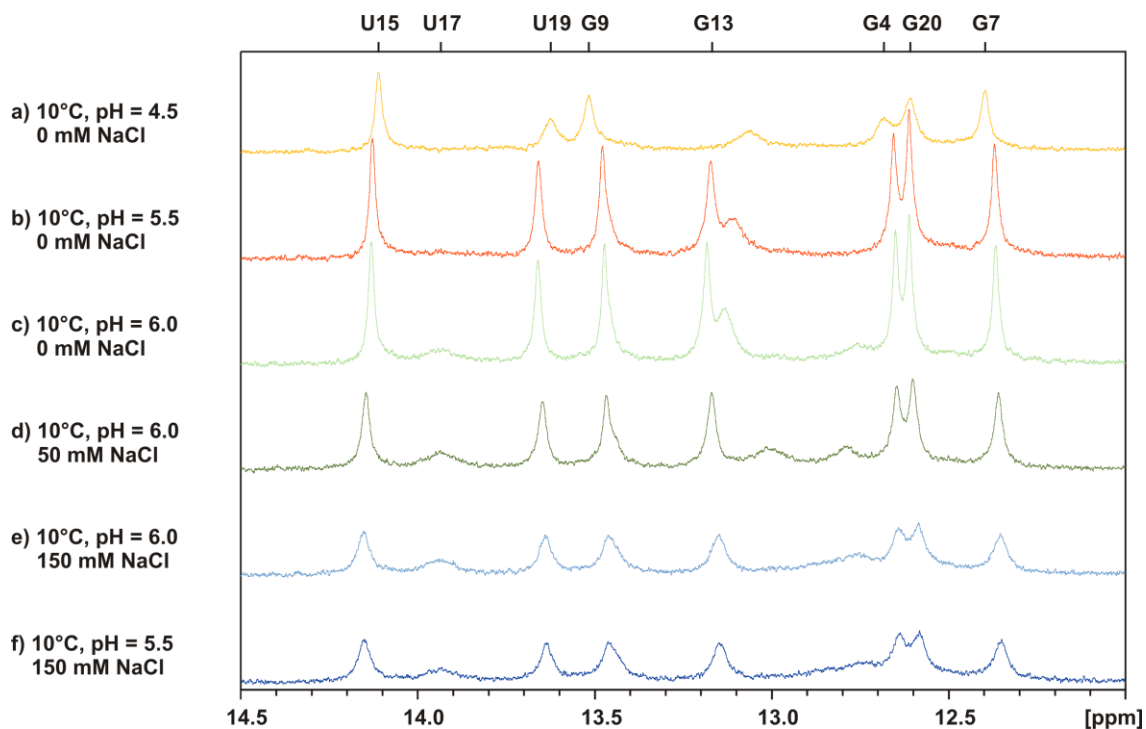
Przypisałem również sygnały pochodzące od protonów wymieniających w widmach wykonanych w mieszaninie 90% H₂O/10% D₂O. Widma te stanowiły szczególnie ważne źródło danych o strukturze drugorzędowej cząsteczki, ponieważ przesunięcia chemiczne protonów iminowych (10–15 ppm), jak również protonów aminowych (6–9 ppm), dostarczają informacji o zawiązywaniu się par zasad w cząsteczkach RNA. W widmie ¹H NMR w regionie typowym dla par zasad Watsona-Cricka zaobserwować można siedem wąskich oraz trzy szerokie sygnały (Rys. 44). Wąskie sygnały pochodzące od protonów iminowych przypisałem na podstawie analizy widma 2D NOESY zarejestrowanego w temperaturze 10°C, za pomocą metod opisanych w rozdziale IV.2.1.1.2. Sygnały te pochodzą od reszt urydyny **U15** i **U17** oraz od wszystkich reszt guanozyny z wyjątkiem terminalnych.



Rys. 44. Fragment widma ¹H NMR (600 MHz, 90% H₂O/10% D₂O) obejmujący zakres sygnałów protonów iminowych dupleksu **II** z ich przypisaniem.

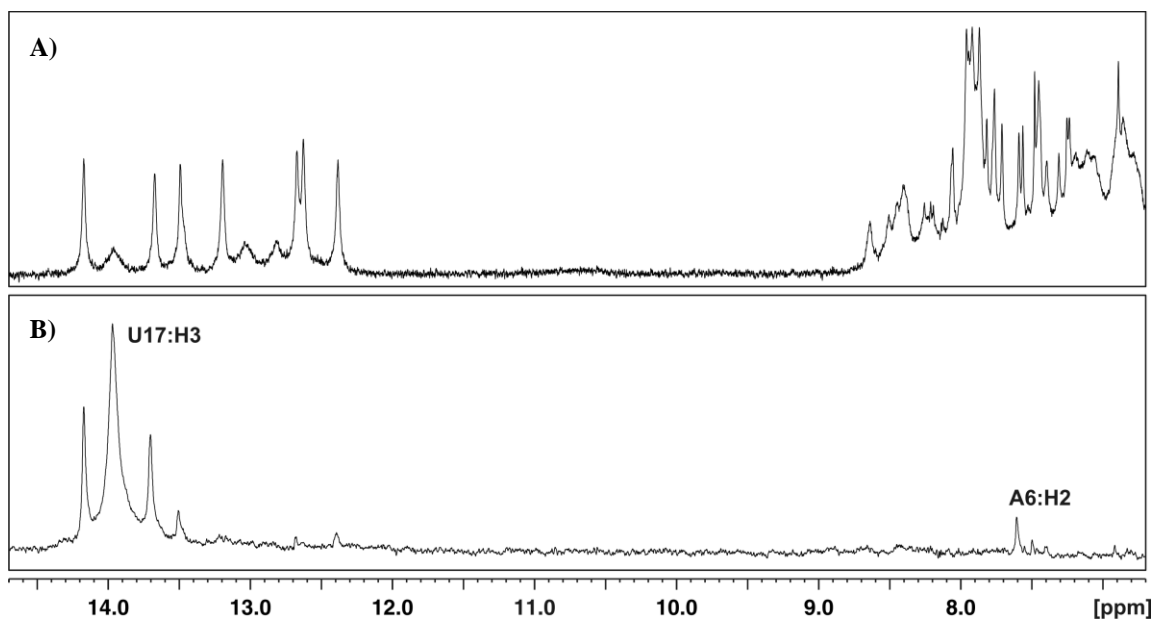
Linie rezonansowe protonów iminowych, które nie uczestniczą w tworzeniu par zasad występują w zakresie od 10.0 do 11.0 ppm. Szeroki sygnał rezonansowy znajdujący się przy 13.94 ppm wskazywał na zawiązywanie się dodatkowej pary **A-U**, dlatego wstępnie przypisany został do protonu H3 pozostałej reszty urydyny **U17**. Sygnał ten jest poszerzony w stosunku do pozostałych protonów zaangażowanych w tworzenie par zasad Watsona-Cricka i nie obserwowałem dla niego korelacji w widmie 2D NOESY. Może to wskazywać na znacznie słabszy charakter pary **A-U** sąsiadującej z wybrzuszoną resztą. W celu potwierdzenia poprawności przypisania sygnału **U17:H3** oraz określenia, która z dwu możliwych par zasad, **A5-U17** lub **A6-U17**, zawiązuje się, przeprowadziłem różnicowy eksperyment 1D-NOE. Dla ustalenia optymalnych warunków pomiaru, w których sygnał

iminowy byłby najbardziej intensywny, wykonałem dodatkowe widma 1D ^1H NMR w różnych warunkach pH i stężenia soli (Rys. 45).



Rys. 45. Zmiany zachodzące w widmie ^1H NMR (zakres protonów iminowych) w zależności od warunków roztworu.

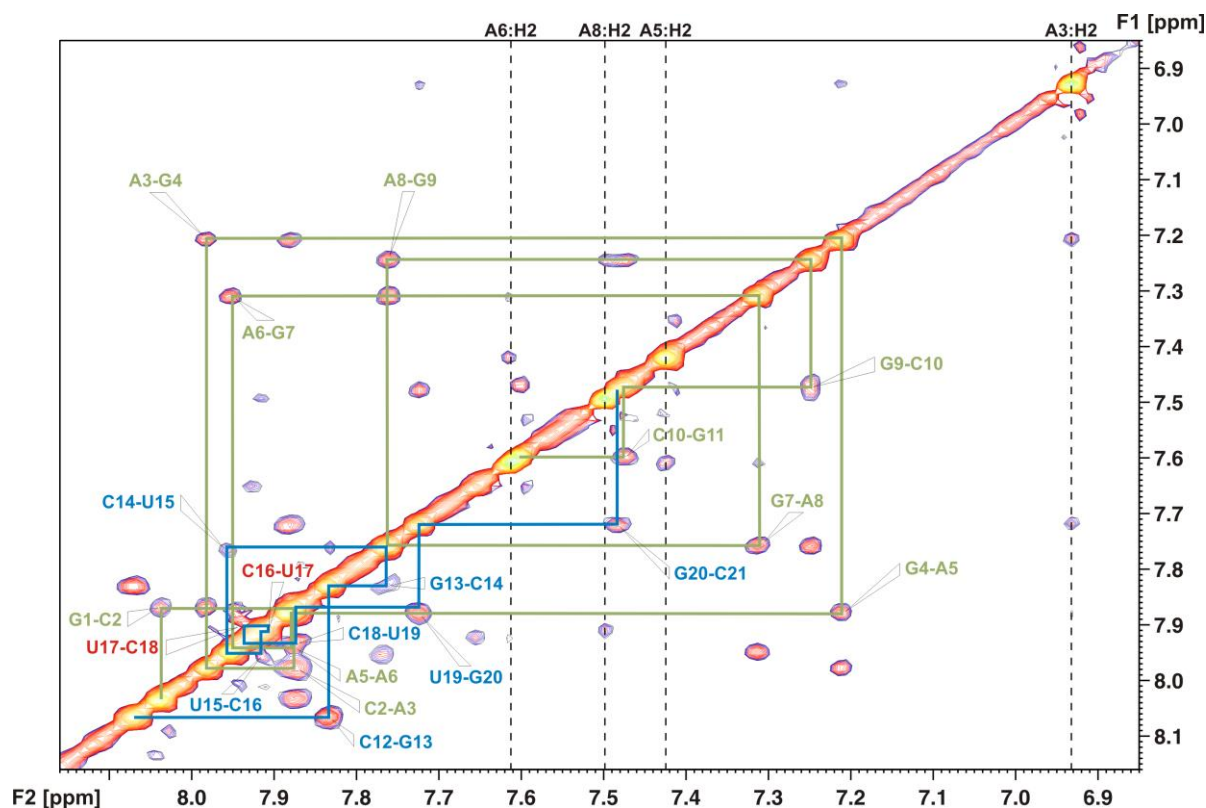
Najbardziej optymalne warunki dla wykonania różnicowych widm 1D NOE uzyskałem dla temperatury 10°C , pH = 6.0 i 50 mM NaCl. W tych warunkach wykonałem serię różnicowych widm NOE stosując metodę "jump & return"²¹¹ do wytlumienia sygnału wody. Podczas selektywnego naświetlania próbki częstotliwością rezonansową protonu **U17:H3** zaobserwowałem efekt wzmocnienia NOE jedynie dla sygnału **A6:H2** (Rys. 46). Nie obserwowałem natomiast wzmocnienia NOE dla protonu H2 reszty **A5**, stąd wyniki tego eksperymentu jednoznacznie wskazują, że tylko reszta **A6** tworzy parę z urydynam **U17**. Poszerzenie sygnału protonu iminowego reszty **U17** najprawdopodobniej jest wynikiem dynamicznego charakteru pary **A6:U17** lub może wynikać z dużej dostępności cząsteczek wody w regionie wybrzuszenia i związaną z tym szybką wymianą tego protonu z protonami wody.



Rys. 46. Fragment widma ^1H NMR dupletu **II** w 90% $\text{H}_2\text{O}/10\%$ D_2O (A), oraz odpowiadający jemu zakres w różnicowym widmie 1D NOE (B).

Obserwowane kontakty NOE niesparowanej reszty adenozyne **A5** ściśle zależą od konformacji regionu wybrzuszenia, stąd informacje o orientacji tej reszty uzyskać można z widm 2D NOESY (D_2O). W widmie zidentyfikowałem charakterystyczne sygnały korelacyjne wskazujące na nieprzerwany ciąg oddziaływań warstwowych w obrębie regionu wybrzuszenia, podobny jak w strukturach A-RNA, co pozwoliło mi przypuszczać, że wybrzuszona reszta ulokowana jest pomiędzy sąsiadującymi parami zasad i skierowana do wnętrza helisy. Obserwacja sekwencyjnych kontaktów NOE H6/H8-H1', jak również H6/H8-H2' i H6/H8-H3' dla górnej nici jest możliwa jedynie przy takiej orientacji niesparowanej reszty. Obecność oddziaływań NOE pomiędzy protonami **A5:H2** i **C18:H1'** w komplementarnej nici, oraz korelacji protonu **A5:H2** z protonami **A5:H1'** i **A6:H1'**, jak również obecność sekwencyjnych sygnałów w regionie aromatyczno-aromatycznym widma pomiędzy resztami **-G4-A5-A6-G7-** (Rys. 47) dodatkowo świadczyły o tym, że reszta adenozyne **A5** skierowana jest do wnętrza helisy. W przeciwnym przypadku nie obserwowałbym sygnałów NOE pomiędzy tą resztą a sąsiednimi resztami, **G4** i **A6** ze względu na duże odległości między protonami ($> 5 \text{ \AA}$). Dane eksperymentalne jednoznacznie wskazywały, że istnieją oddziaływania warstwowe pomiędzy niesparowaną resztą a sąsiednimi zasadami heterocyklicznymi, co wykluczało strukturę typu *loop out*. Ponadto, obecność sygnałów NOE pomiędzy protonami **A6:H2** a **C18:H1'** potwierdzała wcześniejsze obserwacje, iż to reszta **A6**, a nie **A5** tworzy parę z urydyną **U17**. Obserwacja sygnału

A6:H2-C18:H1' nie byłaby możliwa gdyby zawiązywała się para **A5:U17** zamiast **A6:U17**. W takim przypadku wybrzuszona reszta **A6** oddzielałaby od reszty **C18** dodatkowa para zasad **A5:U17** i odległość **A6:H2-C18:H1'** byłaby znacznie większa. W widmach wykonanych w D₂O, nie obserwowałem żadnych sygnałów pochodzących od wymiany chemicznej, których obecność wskazywałaby na występowanie równowagi konformacyjnej par zasad **A5:U17/A6:U17**. Również sygnały pochodzące od protonów niewymienialnych heterocyklicznych zasad **A5**, **A6** i **U17** regionu wybrzuszenia mają typowe szerokości sygnałów dla stabilnych struktur RNA. Ponadto, korelacje tych protonów z jądrami ¹³C obserwowane w widmie ¹H-¹³C HSQC również nie wykazują poszerzenia. W przypadku, gdy reszta **U17** ulegałaby wymianie między parą z adenozyną **A5** a resztą **A6**, należałoby oczekiwać słabego kontaktu NOE do protonu **A5-H2** lub poszerzenia linii rezonansowych, towarzyszącego procesowi wymiany.



Rys. 47. Przydiagonalny region sygnałów korelacyjnych H2/H6/H8 widma 2D NOESY dupletu **II** w D₂O (600 MHz, 25 °C). Na widmie zaznaczone zostały sekwencyjne ścieżki H6/H8_(i)- H6/H8_(i+1) kolorem zielonym dla górnej nici, niebieskim – dla dolnej nici. Kolorem czerwonym opisane zostały sygnały korelacyjne przesłonięte przez sygnały diagonalne. Przerywane linie wskazują położenie sygnałów H2 reszt adenozyiny.

Na pewną dynamikę regionu wybrzuszenia, podobnie jak w przypadku widm wykonanych w mieszaninie 90% H₂O/10% D₂O, wskazują informacje zawarte w widmach DQF-COSY (D₂O). W regionie H1'-H2' widma obserwowałem trzy sygnały pochodzące od reszt **A5**, **A6** i **G11**. Reszty cukrowe regionu wybrzuszenia odpowiadające adenozydom **A5** i **A6** mają sprzężenia H1'-H2' w granicach 3.3 Hz, co jest wynikiem niewielkiego udziału populacji C2'-endo. Trzeci sygnał pochodzący od terminalnej reszty guanozyny **G11**, ma wartość stałej sprzężenia około 5 Hz. Stąd mogłem wnioskować, że konformacja tej reszty cukrowej znajduje się w stanie równowagi pomiędzy stanami S i N, z przewagą populacji S. Natomiast nieobecność pozostałych sygnałów korelacyjnych H1'-H2' w widmie DQF-COSY, wskazywała, że reszty te przyjmują konformację N.

Dodatkowych informacji o wpływie wybrzuszenia na konformację szkieletu fosforocukrowego dostarczają widma korelacyjne ¹H-³¹P HSQC. Ponieważ wszystkie sygnały ³¹P NMR znajdują się w wąskim zakresie o szerokości około 1 ppm (-4.6 – -3.7 ppm), sugeruje to, że obecność dodatkowej reszty nie zaburza konformacji szkieletu fosfodiesterowego typowego dla formy A-RNA. Również wielkości stałych sprzężenia skalarnego ³J_{PH5'}, ³J_{PH5''} i ³J_{PH3'} nie odbiegają od wielkości typowych dla formy A-RNA, stąd mogłem sądzić, iż geometria cząsteczki nie różni się znacząco od dwuniciowych struktur helikalnych A-RNA.

Wartości wyznaczonych przesunięć chemicznych dla protonów (Tabela 8), oraz jąder ¹³C i ³¹P (Tabela 9) zostały zdeponowane w banku BMRB pod identyfikatorem 15572. Porównanie wartości przesunięć chemicznych linii rezonansowych NMR dupleksów **I** oraz **II** wskazuje jedynie na niewielkie zmiany wywołane obecnością dodatkowej reszty adenozyny. Dla zdecydowanej większości sygnałów ¹H NMR różnice te nie przekraczają 0.1 ppm, natomiast dla heterojąder wartości te różnią się przeważnie nie więcej niż 0.4 ppm dla ¹³C i 0.1 ppm dla ³¹P. Jedynie w regionie wybrzuszenia oraz w przypadku reszt terminalnych zanotowałem nieco większe różnice, przy czym w przypadku reszt terminalnych dotyczyły one głównie sygnałów wymienialnych. Jednak największe różnice wartości przesunięć chemicznych zaobserwowałem w regionie wybrzuszenia, dla reszt **G4**, **A6** i **U17**, co jest związane ze zmianą otoczenia chemicznego i innym układem oddziaływań warstwowych w tym fragmencie cząsteczki. W porównaniu do dupleksu referencyjnego, proton H2' reszty **G4**, jest silniej ekranowany o 0.24 ppm, natomiast sygnały H2 i H8 reszty **A6** ulegają przesunięciu (w stosunku do odpowiadających im protonów reszty **A5** dupleksu referencyjnego) w stronę wyższych częstości pola o odpowiednio 0.22 ppm (H2) i 0.29 ppm (H8). Zmianę położenia sygnału rezonansowego o 0.20 ppm zanotowałem także dla protonu

H5 reszty U17 dupleksu II. W dupleksie z wybrzuszeniem wartość przesunięcia chemicznego protonu H5 wynosi 5.62 ppm, natomiast analogiczny sygnał pochodzący od reszty urydyny U16 dupleksu referencyjnego znajduje się przy 5.42 ppm.

Tabela 8. Wartości przesunięć chemicznych $\delta^1\text{H}$ (ppm) sygnałów dupleksu II.

Res.	H6/H8	H2/H5	H1'	H2'	H3'	H4'	H5'/H5''	amino	imino
G1	8.04	–	5.69	4.75	4.57	4.34	4.03/3.90	* / *	*
C2	7.87	5.31	5.62	4.65	4.61	4.49	4.56/4.20	6.82/8.49	–
A3	7.98	6.93	5.94	4.61	4.71	4.52	4.54/4.18	* / *	–
G4	7.21	–	5.56	4.27	4.54	4.45	4.49/4.08	* / *	12.64
A5	7.88	7.42	5.93	4.42	4.71	4.47	4.44/4.15	* / *	–
A6	7.95	7.61	5.85	4.62	4.62	4.49	4.38/4.16	* / *	–
G7	7.31	–	5.62	4.61	4.46	4.48	4.37/4.14	* / *	12.37
A8	7.76	7.49	5.95	4.67	4.65	4.52	4.53/4.16	* / *	–
G9	7.25	–	5.64	4.44	4.43	4.43	4.49/4.06	* / *	13.47
C10	7.47	5.18	5.49	4.33	4.42	4.39	4.50/4.04	6.77/8.37	–
G11	7.60	–	5.86	4.09	4.28	4.22	4.44/4.03	* / *	*
C12	8.07	5.99	5.59	4.58	4.58	4.34	4.05/3.93	7.01/8.16	–
G13	7.83	–	5.80	4.63	4.71	4.52	4.52/4.19	* / *	13.18
C14	7.77	5.31	5.56	4.42	4.48	4.48	4.59/4.14	6.89/8.63	–
U15	7.96	5.45	5.58	4.54	4.55	4.46	4.58/4.13	–	14.14
C16	7.92	5.74	5.66	4.32	4.52	4.46	4.58/4.13	7.08/8.38	–
U17	7.91	5.62	5.61	4.38	4.56	4.42	* /4.11	–	13.94
C18	7.93	5.79	5.35	4.31	4.50	4.41	* /4.09	7.17/8.43	*
U19	7.88	5.47	5.35	4.52	4.59	4.37	* /4.08	–	13.64
G20	7.72	–	5.77	4.35	4.61	4.42	* /4.08	* / *	12.61
C21	7.48	5.23	5.67	3.95	4.10	4.14	4.48/4.00	6.91/8.26	–

* Sygnały, które nie zostały przypisane.

Tabela 9. Wartości przesunięć chemicznych δ (ppm) sygnałów ^{13}C oraz ^{31}P NMR dupleksu II [D_2O , 25°C].

Res.	C6/C8	C2/C5	C1'	C2'	C3'	C4'	C5'		^{31}P
G1	138.77	–	92.53	74.90	73.96	84.83	62.23		–
C2	141.59	97.17	93.84	75.59	72.36	*	*		-4.32
A3	139.40	152.35	92.93	75.62	72.96	82.02	*		-3.80
G4	136.23	–	91.76	76.12	*	*	*		-3.90
A5	140.47	154.25	91.40	76.30	74.56	83.53	*		-4.08
A6	140.54	153.81	91.30	*	*	*	66.61		-4.16
G7	136.72	–	92.28	75.28	*	*	66.85		-3.94
A8	139.37	153.35	92.93	75.61	*	82.02	*		-4.10
G9	135.53	–	92.58	75.28	72.72	81.92	*		-4.16
C10	140.06	97.51	93.84	75.36	72.14	81.91	64.57		-4.41
G11	137.34	–	91.30	77.85	70.36	83.93	65.58		-3.99
C12	142.81	98.94	93.84	75.40	73.67	84.43	62.03		–
G13	136.55	–	92.53	75.27	72.96	*	*		-3.91
C14	141.31	97.17	93.96	75.37	72.26	81.96	*		-4.42
U15	141.96	103.28	93.81	75.23	72.10	81.95	*		-4.44
C16	141.90	97.71	94.08	75.52	72.39	81.95	*		-4.35
U17	141.96	103.46	93.83	75.40	*	82.26	*		-4.49
C18	142.07	97.64	93.89	75.19	*	*	*		-4.52
U19	141.59	103.48	93.50	75.06	72.32	81.83	*		-4.41
G20	136.29	–	92.74	75.46	*	81.91	*		-4.14
C21	141.29	97.51	92.76	77.43	69.53	83.27	64.98		-4.32

* Sygnały, które nie zostały przypisane.

Porównując wartości przesunięć chemicznych obu dupleksów, można stwierdzić, iż wprowadzenie dodatkowej reszty nukleotydowej nie pociąga za sobą znaczących zmian przesunięć chemicznych sygnałów w widmach NMR, a obserwowane zmiany mają jedynie charakter lokalny obejmujący reszty ograniczające wybrzuszenie po stronie 5' oraz 3'. Porównanie przesunięć chemicznych sygnałów pochodzących od odpowiadających sobie fragmentów helikalnych obu dupleksów wskazywało na ich znaczne podobieństwo strukturalne.

2.2.2. Analiza konformacyjna. Wyznaczenie więzów strukturalnych (II)

W oparciu o przedstawione w rozdziale IV.2.1.2 metody, na podstawie analizy wartości przesunięć chemicznych, sprzężeń skalarnych oraz integracji pozadiagonalnych sygnałów NOE, wyznaczyłem więzy strukturalne.

Więzy na odległości międzyprotonowe otrzymałem z widm 2D NOESY ($\tau_m = 150$ ms) wykonanych w temperaturze 25°C i 20°C. Odległości między protonami wyznaczyłem metodą ISPA, a dolną i górną granicę więzów otrzymałem przyjmując odpowiednio -15% i +30% zmierzonej odległości. Na podstawie analizy kontaktów NOE obserwowanych w widmach 2D NOESY (400 ms) otrzymałem dodatkowe informacje, które umożliwiły mi wyprowadzenie 17 kolejnych więzów na odległości międzyprotonowe o zakresie 4.5 – 7.0 Å. Ponadto, aby dodatkowo ograniczyć dostępną przestrzeń konformacyjną, na intranukleotydowe odległości międzyprotonowe reszty **A5**, dla których nie obserwowałem sygnałów w widmie 2D NOESY ($\tau_m = 400$ ms) wprowadziłem więzy typu uNOE. Dolnej granicy tych więzów przypisałem wartość 5 Å, natomiast górną granicę dobrałem tak, aby w żaden sposób nie ograniczała swobody konformacyjnej cząsteczki i przypisałem jej wartość 20 Å. Dla protonów wymiennalnych, których korelacje obserwowałem w widmie 2D NOESY (90% H₂O/10% D₂O), ustaliłem więzy o granicach 1.8 – 6.0 Å. Większość z 14 otrzymanych tą drogą więzów dotyczyła obserwowanych kontaktów NOE między protonami wymiennalnymi, iminowymi i aminowymi, sąsiadujących ze sobą reszt. Analiza widm w mieszaninie 90% H₂O/10% D₂O wykazała również, że wszystkie reszty nukleotydowe, poza resztą **A5**, zaangażowane są w tworzenie kanonicznych par Watsona-Cricka. Obserwacja ta pozwoliła mi na wprowadzenie więzów na wiązania wodorowe oraz planarność par zasad (rozdział IV.2.1.2). Jednak w przypadku pary **A6:U17**, z uwagi na

znaczne poszerzenie sygnału H3 reszty **U17**, zadany wiązom przypisałem dwukrotnie większą tolerancję ($\pm 0.4 \text{ \AA}$). Dla tej pary nie stosowałem również wiązków na planarność.

Następnie na podstawie widm DQF-COSY (D_2O) wyznaczyłem więzy na kąty torsyjne pierścieni cukrowych. Na podstawie wyznaczonych wartości sprzężeń skalarnych $^3J_{H1'H2'}$, wprowadziłem więzy na konformację C3'-*endo* dla wszystkich reszt z wyjątkiem terminalnej guanozyny **G11** (o wartości stałej sprzężenia $\sim 5 \text{ Hz}$) oraz reszt **A5** i **A6** ($^3J_{H1'H2'} \sim 3 \text{ Hz}$), dla których wprowadziłem słabe więzy umożliwiające przyjęcie zarówno geometrii C3'-*endo* oraz C2'-*endo*.

Konformację wokół wiązania glikozydowego dla większości reszt nukleotydowych określiłem opierając się na analizie kontaktów NOE H6/H8-H1'/H2'/H3' jako *anti* i przypisałem kątom χ zakres $-158 \pm 30^\circ$. Jedynie w przypadku reszt **C16** i **U17**, z uwagi na silne nakładanie się sygnałów w widmach 2D NOESY, kąty te pozostawiłem swobodne.

Więzy na kąty torsyjne α i ζ otrzymałem z analizy przesunięć chemicznych linii ^{31}P NMR. Ponieważ dla żadnej reszty nie stwierdziłem znaczących zmian przesunięć chemicznych ^{31}P w stosunku do pozostałych sygnałów, stąd mogłem wprowadzić ograniczenia na wartości kątów α i ζ o zakresie $0 \pm 120^\circ$, które eliminowały region *trans*.

Informacji o wartościach kątów torsyjnych β oraz ϵ szkieletu fosforocukrowego dostarczyła analiza widm 1H - ^{31}P HSQC NMR, w których wszystkie sygnały o dużych wartościach stałych sprzężeń pochodziły jedynie od korelacji H3'- $P_{(n+1)}$. Dlatego kąty β wszystkich reszt ograniczyłem do wartości $178 \pm 30^\circ$, natomiast dla większości kątów ϵ przyjąłem zakres $-153 \pm 30^\circ$. Tylko w przypadku reszt cytydyny **C14**, **C16** i **C18**, dla których wartości sprzężeń na skutek nakładania się sygnałów nie można było oszacować, wprowadziłem więzy z zakresem błędu $120 \pm 120^\circ$.

Wartości kątów torsyjnych γ szkieletu fosforocukrowego ograniczyłem do zakresu $54 \pm 30^\circ$ z uwagi na brak silnych sygnałów pochodzących od sprzężeń H4'-H5'/H5'' w widmach DQF-COSY.

Podczas obliczeń metodami dynamiki molekularnej nie wprowadziłem wiązków na kąty torsyjne α , β oraz γ dla reszt **A5** i **A6** regionu wybrzuszenia, co pozwoliło na pełniejsze przeszukanie przestrzeni konformacyjnej. Również kąty torsyjne ζ reszt **G4** i **G5** pozostawiłem swobodne.

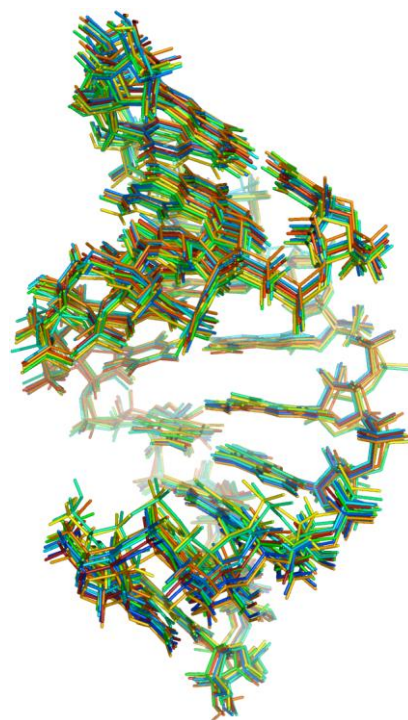
2.2.3. Restryktywna dynamika molekularna (II)

Obliczenia przestrzennej struktury dupleksu **II** przeprowadziłem za pomocą programu Xplor-NIH^{205,206} z wykorzystaniem protokołu symulowanego wyżarzania w metodzie dynamiki molekularnej TAMD¹⁵². Zastosowany protokół nie różnił się zasadniczo od opisanego uprzednio (rozdział IV.2.1.3). Jedyne różnice dotyczyły wprowadzonych podczas obliczeń więzów strukturalnych. W sumie podczas dynamiki wykorzystałem 337 więzów na odległości międzyprotonowe, oraz 213 więzów na kąty torsyjne (Rys. 48, Tabela). Uwzględniłem również więzy na parowanie się zasad typu Watsona Cricka, a podczas etapu udokładnienia więzy na ich planarność. Dodatkowo, na wszystkie reszty nukleotydowe z wyjątkiem jednej - reszty adenozynowej **A5** zadane zostały potencjały DELPHIC²⁰⁸. Wstępne obliczenia przeprowadzone z użyciem wszystkich tych więzów nie dały zadowalających rezultatów. Analiza otrzymanych struktur pokazała, że niektóre odległości międzyprotonowe w regionie wybrzuszenia są na tyle małe, że powinienem obserwować dodatkowe sygnały w widmach 2D NOESY. Ponieważ powtórna analiza widm wykluczała możliwość tych kontaktów, wprowadziłem dodatkowo 4 więzy uNOE pomiędzy protonem H2 reszty **A5** a protonami H5 i H6 reszt **U17** i **C18**. Dopiero w tym momencie przystąpiłem do właściwych obliczeń.

W wyniku obliczeń, startując z 50 liniowych struktur początkowych, otrzymałem 36 struktur zgodnych z danymi eksperymentalnymi. Do oceny struktur końcowych przyjąłem takie kryterium jak uprzednio, tzn. uznałem, że więzy odległościowe zostały spełnione, jeśli nie były naruszone więcej aniżeli o 0.3 Å, natomiast więzy kątowe - więcej niż o 5°. Następnie, do dalszej analizy, wybrałem 10 struktur, dla których energia potencjalna mierzona w polu siłowym CHARMM była najmniejsza. Wszystkie te struktury wykazują znaczne podobieństwo, co pozwoliło mi zaliczyć je do jednej rodziny (Rys. 48). Wartość parametru RMSD wyznaczona w oparciu o wzór (17) obliczona dla wszystkich ciężkich atomów tych struktur wynosi 0.62 ± 0.26 Å. Uwzględniając tylko region wybrzuszenia obejmujący resztę **A5** oraz pary zasad **G4-C18** i **A6-U17**, wartość RMSD obliczona dla ciężkich atomów wynosi 0.69 ± 0.30 Å.

Współrzędne struktur końcowych zdeponowałem w banku danych PDB pod identyfikatorem 2JXS.

Statystyka wiązań wykorzystanych w obliczeniach.	
Całkowita liczba wiązań NOE:	337
intranukleotydowe	196
internukleotydowe	141
Wiązy typu uNOE	3
Wiązy na wiązania wodorowe	60
Wiązy na planarność	9
Wiązy na kąty dwuścienne:	213
szkieletu fosfodiesterowego	89
rybozy	105
wiązania glikozydowego	19
Średnia liczba wiązań NOE przypadających na resztę nukleotydową	16.05
Średnia liczba wiązań NOE oraz wiązań na kąty dwuścienne przypadających na resztę nukleotydową	26.19



Rys. 48. Nałożenie rodziny 10 struktur przestrzeni konformacyjnej dupleksu **II**.

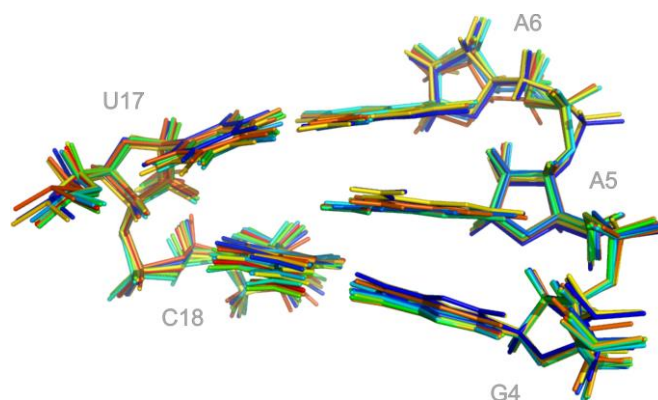
2.2.4. Analiza przestrzeni konformacyjnej rodziny struktur (II)

W celu określenia zaburzeń regularnej struktury A-RNA indukowanych obecnością wybruszenia, przeprowadziłem szczegółową analizę przestrzeni konformacyjnej otrzymanych struktur. Analizy tej dokonałem za pomocą programu Curves^{30,31}. Obliczone średnie wartości kątów torsyjnych łańcuchów fosfodiesterowych, oraz kątów wokół wiązań N-glikozydowych, a także wartości kątów fazowych pseudorotacji P i amplitudy pofałdowania pierścieni cukrowych v_{max} , przedstawione są w tabeli 10. W tabeli 11 umieściłem natomiast wartości wybranych parametrów helikalnych otrzymanych dla rodziny 10 struktur dupleksu **II**.

Tabela 10. Średnie wartości kątów torsyjnych łańcuchów fosfodiesterowych (α , β , γ , δ , ε , ζ), kąta glikozydowego (χ) oraz parametrów opisujących konformację pierścieni cukrowych (P, v_{max}) obliczonych dla dupleksu **II**. W nawiasach podane zostały wartości odchylenia standardowego.

Reszta	α	β	γ	δ	ε	ζ	χ	P	v_{max}
G1	–	–	28 (5)	86 (2)	201 (4)	288 (4)	192 (3)	12 (9)	37 (1)
C2	303 (6)	180 (5)	44 (4)	87 (2)	214 (2)	287 (4)	214 (2)	1 (2)	39 (1)
A3	309 (4)	159 (5)	49 (6)	79 (1)	201 (5)	294 (4)	195 (3)	27 (2)	42 (1)
G4	300 (5)	191 (6)	33 (3)	83 (2)	202 (3)	289 (4)	211 (1)	13 (3)	39 (1)
A5	313 (4)	165 (5)	46 (3)	83 (1)	187 (16)	278 (11)	212 (2)	27 (7)	38 (1)
A6	315 (69)	188 (18)	115 (55)	84 (3)	200 (3)	297 (5)	201 (4)	8 (7)	40 (1)
G7	297 (4)	178 (7)	48 (5)	80 (1)	201 (4)	296 (4)	205 (3)	18 (3)	41 (1)
A8	301 (7)	179 (8)	39 (4)	78 (1)	196 (3)	302 (3)	201 (2)	23 (1)	43 (1)
G9	296 (4)	181 (4)	50 (4)	78 (1)	196 (4)	288 (3)	197 (2)	30 (1)	42 (1)
C10	280 (9)	171 (4)	73 (9)	84 (1)	196 (2)	304 (3)	204 (4)	13 (1)	39 (1)
G11	282 (4)	202 (3)	37 (6)	84 (1)	–	–	214 (2)	15 (5)	38 (1)
C12	–	–	33 (3)	87 (1)	200 (2)	299 (3)	202 (2)	0 (2)	41 (0)
G13	297 (3)	187 (2)	40 (3)	83 (0)	212 (2)	284 (3)	204 (1)	8 (1)	41 (0)
C14	310 (7)	163 (6)	43 (2)	80 (0)	202 (2)	286 (4)	207 (1)	11 (1)	43 (0)
U15	306 (6)	184 (7)	36 (10)	83 (1)	205 (3)	291 (6)	206 (3)	12 (4)	40 (1)
C16	305 (8)	176 (10)	41 (4)	83 (2)	205 (6)	284 (2)	211 (3)	15 (4)	39 (1)
U17	302 (8)	172 (7)	45 (7)	81 (2)	207 (5)	294 (6)	212 (5)	18 (4)	41 (1)
C18	302 (8)	184 (15)	51 (6)	84 (1)	213 (3)	285 (3)	195 (6)	7 (3)	41 (1)
U19	310 (5)	177 (8)	37 (4)	84 (2)	201 (3)	297 (3)	206 (2)	10 (3)	40 (1)
G20	298 (5)	172 (4)	52 (8)	79 (0)	191 (1)	302 (2)	195 (3)	26 (2)	41 (1)
C21	287 (3)	197 (4)	40 (2)	87 (1)	–	–	217 (1)	12 (2)	35 (1)
Średnia:	299 (9)	180 (11)	45 (9)	83 (3)	202 (6)	293 (7)	204 (7)	14 (8)	40 (2)
A-RNA ^{209,210}	294	186	49	88	202	294	202	18	39

Szczegółowa analiza otrzymanej w wyniku obliczeń rMD rodziny struktur ukazuje, że niesparowana reszta adenozynowa **A5** akomoduje pomiędzy sąsiadujące pary we wszystkich strukturach zgodnych z danymi NMR (Rys. 49). Jednakże dla 3 spośród 36 struktur, zaobserwowałem różnice w konformacji szkieletu fosfordiestrowego w regionie wybrzuszenia. Dla tych trzech struktur wartości kątów α i γ reszty **A6** wynoszą odpowiednio 86° oraz 218° i odbiegają od wartości typowych dla formy A-RNA (294° i 49°). Natomiast analiza pozostałych 33 struktur wykazuje, iż wartości kątów torsyjnych γ reszty **A6** ($\sim 90^\circ$) znajdują się poza typowym regionem *gauche*⁺. Również wartości kątów torsyjnych α reszty **A6** ($\sim 247^\circ$) odbiegają od typowych dla struktur A-RNA (294°), co jest zapewne konsekwencją dynamicznej natury łańcucha fosforocukrowego w regionie wybrzuszenia, a także większej swobody konformacyjnej kątów torsyjnych α i γ . Natomiast porównanie pozostałych kątów torsyjnych nie ujawnia większych odstępstw od wartości charakterystycznych dla formy A-RNA.



Rys. 49. Region wybruszenia dupleksu II dla 10 struktur o najniższej energii. Widok od strony dużej bruzdy.

Tabela 11. Uśrednione wartości wybranych parametrów helikalnych dupleksu II wraz z odchyleniami standardowymi.

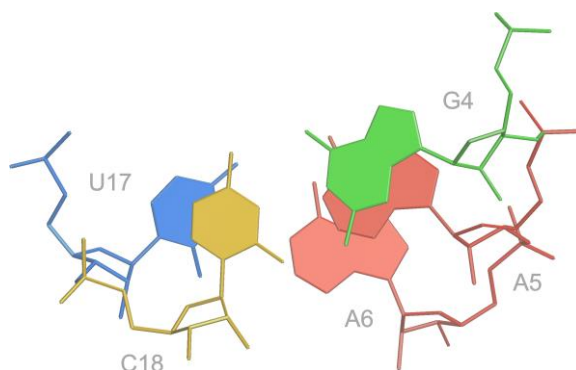
Para zasad	<i>x-Displacement</i> dx (Å)	<i>y-Displacement</i> dy (Å)	<i>Inclination</i> η (°)	<i>Propeller twist</i> ω (°)
G1-C21	-4.3 (0.2)	0.1 (0.1)	13 (1)	-1 (3)
C2-G20	-4.2 (0.2)	0.7 (0.1)	13 (2)	-21 (2)
A3-U19	-4.2 (0.3)	0.2 (0.2)	12 (1)	-13 (2)
G4-C18	-4.3 (0.1)	0.5 (0.2)	11 (2)	-11 (2)
A6-U17	-4.8 (0.2)	0.5 (0.2)	17 (2)	-8 (3)
G7-C16	-4.2 (0.2)	0.3 (0.0)	17 (2)	-12 (2)
A8-U15	-4.6 (0.1)	0.5 (0.1)	15 (2)	-1 (2)
G9-C14	-4.1 (0.2)	0.1 (0.1)	15 (2)	-7 (3)
C10-G13	-4.3 (0.2)	0.4 (0.1)	15 (2)	-21 (3)
G11-C12	-4.2 (0.2)	0.2 (0.1)	16 (2)	-7 (4)
Średnia:	-4.3 (0.2)	0.4 (0.2)	15 (2)	-10 (7)
A-RNA ¹⁶¹ :	-5.3	0.0	16	-14

Sekwencja par zasad	<i>Shift</i> D _x (Å)	<i>Rise</i> D _z (Å)	<i>Twist</i> Ω (°)	<i>Roll</i> ρ (°)
G1-C2	0.2 (0.1)	2.6 (0.1)	40 (1)	-9 (2)
C2-A3	0.2 (0.1)	2.8 (0.2)	29 (1)	11 (3)
A3-G4	0.1 (0.3)	2.3 (0.1)	36 (2)	4 (2)
A6-G7	0.4 (0.3)	2.6 (0.2)	29 (1)	1 (2)
G7-A8	-0.1 (0.1)	2.1 (0.1)	34 (2)	5 (2)
A8-G9	0.9 (0.3)	2.6 (0.1)	29 (1)	8 (3)
G9-C10	-0.2 (0.2)	2.9 (0.1)	35 (1)	-10 (2)
C10-G11	0.0 (0.1)	2.4 (0.1)	35 (1)	9 (1)
Średnia:	0.2 (0.4)	2.5 (0.2)	33 (4)	2 (8)
A-RNA ¹⁶¹ :	0.0	2.8	33	0

Podobnie analiza parametrów helikalnych, wyznaczonych dla regionów dwuniciowych po obu stronach wybruszenia, nie wykazała znaczących rozbieżności od wartości otrzymanych dla formy kanonicznej. W porównaniu do formy kanonicznej, zaobserwowałem jedynie zmniejszenie promienia kanału biegnącego wzdłuż osi helisy, charakterystycznego

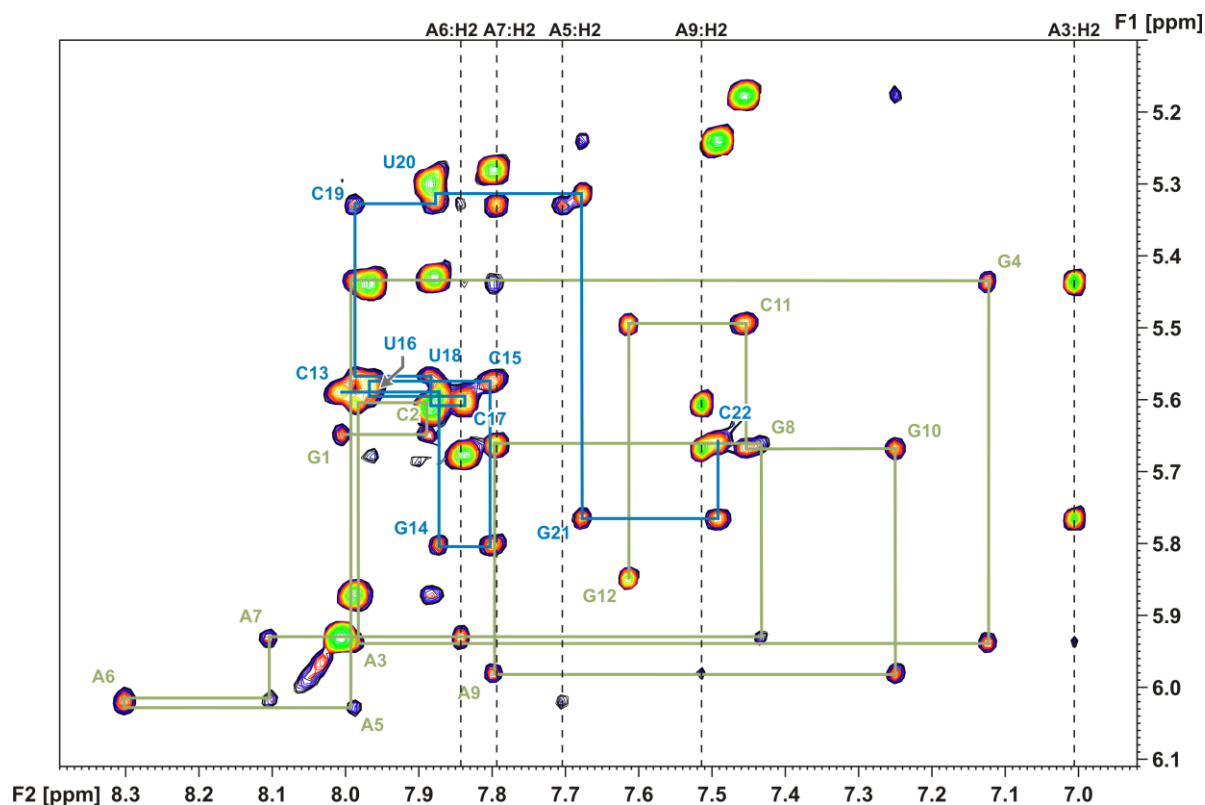
dla formy A. Otrzymana średnia wartość parametru x -Displacement wynosząca $-4.3 \pm 2 \text{ \AA}$ jest mniejsza od tej obserwowanej dla struktury kanonicznej: 5.3 \AA .

Analiza lokalnych parametrów helikalnych między zasadami (ang. *local inter-base parameters*) dostarczyła dodatkowych informacji odnośnie położenia wybrzuszonej reszty **A5**. Otrzymana w tym przypadku średnia wartość parametru *shift* między sąsiednimi zasadami w nici wynosi $0.2 \pm 0.4 \text{ \AA}$, podczas gdy ten sam parametr dla reszt **A5/A6** jest równy $-1.9 \pm 0.3 \text{ \AA}$. Ponadto, kąt skrętu *twist* dla kroku **A5/A6** jest znacznie zredukowany od średniej wartości $32 \pm 3^\circ$ do $18 \pm 4^\circ$. Te lokalne odchylenia parametrów helikalnych obserwowane w miejscu wybrzuszenia wynikają zapewne ze szczególnej aranżacji reszt heterocyklicznych w regionie wybrzuszenia. Za wspomniane zmiany odpowiedzialne są niewątpliwie oddziaływania warstwowe między pierścieniami zasad, które wpływają na stabilność RNA jak również minimalizują ekspozycję powierzchni hydrofobowej zasady na oddziaływanie polarnego rozpuszczalnika. Intrahelikalna pozycja wybrzuszonej reszty **A5** stabilizowana jest poprzez oddziaływania warstwowe, silniejsze z sąsiadującą po stronie 5' resztą **G4**, aniżeli resztą **A6** (Rys. 50).



Rys. 50. Nakładanie się sąsiadujących zasad w rzucie wzdłuż osi helisy reprezentujące model oddziaływań warstwowych w regionie wybrzuszenia dupleksu **II**.

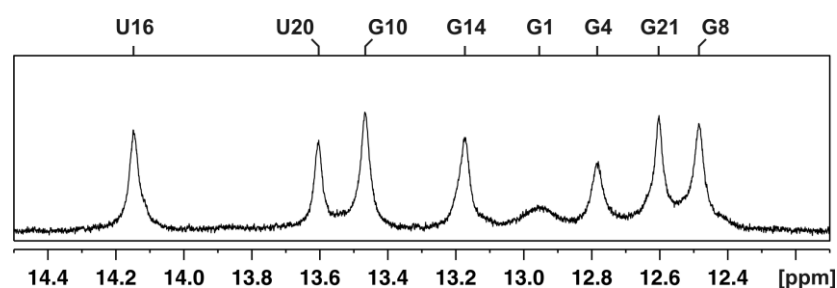
konformacji wokół wiązania glikozydowego. Wyznaczona nieprzerwana ścieżka NOE dla nici zawierającej niesparowane reszty adeniny wskazuje na zachowanie dosyć bliskiego kontaktu pomiędzy kolejnymi resztami **-G4-A5-A6-A7-G8-** w strukturze cząsteczki. Obserwowane w nici intra- i internukleotydowe korelacje protonów H2 adenozyń **A5**, **A6** i **A7** wykazują podobieństwo do tych rejestrowanych dla regularnych struktur helikalnych. Kontakty NOE protonu **C19:H1'** do protonów H2 każdej z tych reszt sugerują, że reszty adeniny zorientowane są w kierunku osi helisy. Obserwacja ścieżek $H8_{(i)}-H2'_{(i)}-H8_{(i+1)}$ oraz $H8_{(i)}-H3'_{(i)}-H8_{(i+1)}$ dodatkowo potwierdza ten fakt. Również w przypadku komplementarnej nici obecność sekwencyjnych kontaktów $H2'_{(i)}-H5/H6_{(i+1)}$ oraz $H3'_{(i)}-H5/H6_{(i+1)}$ pomiędzy resztami **-C17-U18-C19-**, jak i sygnałów korelacyjnych między protonami zasad heterocyklicznych, wyraźnie wskazuje na zachowanie silnych oddziaływań warstwowych dla tych reszt.



Rys. 52. Region sygnałów H2/H6/H8-H5/H1' w widmie 2D NOESY ($\tau_m = 400$ ms) dupletu **III** w D_2O (600 MHz, 25°C). W widmie zaznaczona została sekwencyjna ścieżka H6/H8_(i)-H1'_(i)-H6/H8_(i+1) – kolorem zielonym dla górnej nici, natomiast niebieskim – dla dolnej nici. Przerwane linie wskazują położenie sygnałów H2 reszt adeniny.

W oparciu o analizę widma 2D-NOESY wykonanego w 90% $H_2O/10\%$ D_2O (10°C) przypisałem również sygnały protonów wymienialnych. W widmie obserwowałem jedynie

osiem sygnałów pochodzących od protonów iminowych – siedem wąskich oraz jeden wyraźnie poszerzony w stosunku do pozostałych. Przepisania wąskich sygnałów dokonałem w oparciu o obserwowane kontakty NOE, analogicznie jak w poprzednich przypadkach (rozdział IV.2.1.1.2 i IV.2.2.1). Przesunięcie chemiczne poszerzonego sygnału ma wartość 12.94 ppm i odpowiada zaangażowanej w tworzenie pary Watsona-Cricka reszcie guanozyny (Rys. 53). Obserwowane w widmie bardzo słabe korelacje dla tego sygnału wskazują, iż pochodzi on najprawdopodobniej od terminalnej reszty **G1**. Na żadnym z widm wykonanych w 90% H₂O/10% D₂O nie zaobserwowałem natomiast sygnału protonu iminowego reszty **U18**, dlatego niewiele można powiedzieć o ewentualnym zaangażowaniu tej reszty w tworzenie wiązań wodorowych. Nieobecność tego sygnału może być spowodowana dużą dynamiką regionu albo szybką wymianą protonu **U18:H3** z wodą.

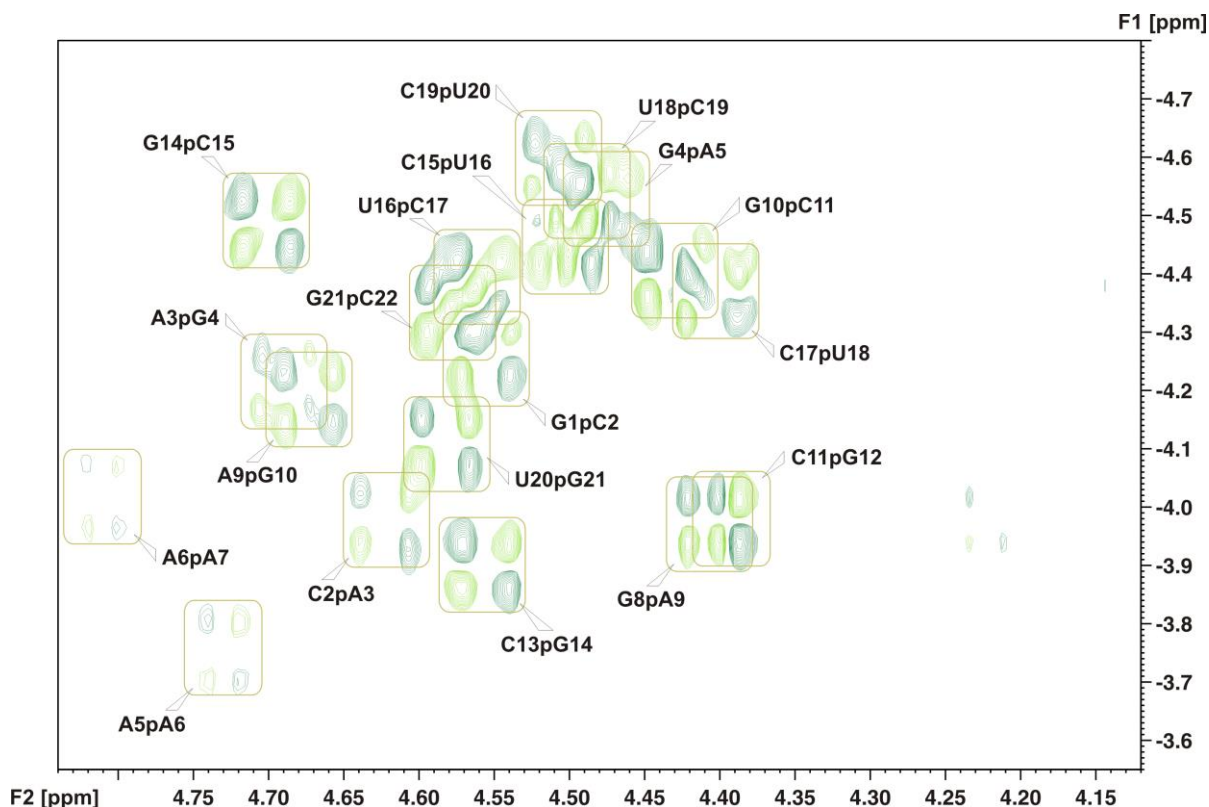


Rys. 53. Fragment widma ¹H NMR (600 MHz, 90% H₂O/10% D₂O) obejmujący zakres sygnałów protonów iminowych dupleksu **III**. Nad widmem zaznaczone zostały przypisanie sygnałów rezonansowych.

O dynamicznym charakterze wybrzuszenia informują także obserwowane w widmie DQF-COSY pośrednie między formą C2'-*endo* i C3'-*endo* sprzężenia ³J_{H1'-H2'} reszt **A5** i **A6** (~4 Hz). Również terminalna guanozyna **G12** znajduje się w stanie równowagi konformacyjnej C2'-*endo*/C3'-*endo*, o czym świadczy wielkość stałej sprzężenia ³J_{H1'H2'} wynosząca 4.7 Hz. W widmie nie były natomiast obecne inne sygnały H1'-H2', co jednoznacznie wskazywało na konformację N pozostałych jednostek nukleotydowych. Trudno jest powiedzieć coś więcej o ewentualnych zaburzeniach konformacji szkieletu fosforocukrowego na podstawie analizy sprzężeń ³J_{H4'H5'} i ³J_{H4'H5''}, gdyż w odpowiadającym regionie widma DQF-COSY sygnały rezonansowe silnie się nakładały.

Kolejnych, niezbędnych do ustalenia struktury tego dupleksu informacji dotyczących konformacji szkieletu fosfodiesterowego dostarczyły widma ¹H-³¹P HSQC. Ich analiza skłoniła mnie do wniosku, iż nie należy oczekiwać nietypowych konformacji bezpośrednio wokół grup fosforanowych, czego potwierdzeniem jest silne zgrupowanie linii rezonansowych ³¹P NMR dupleksu. Podobnie, sprzężenia ³J_{PH3'}, ³J_{H4'H5'} i ³J_{H4'H5''} nie różnią się od tych

oczekiwanych dla regularnych struktur A-RNA. Niestety, nie udało się przypisać sygnału ^{31}P NMR dla reszty **G8** (Rys. 54). Z tego względu nie byłem w stanie oszacować wielkości sprzężeń ^3J , a tym samym określić konformacji szkieletu fosforocukrowego pomiędzy resztami **A7-G8**.



Rys. 54. Widmo korelacyjne ^1H - ^{31}P NMR dupletu **III** w D_2O (25°C) z zaznaczonymi sygnałami $\text{H}3'_{(n)}\text{-P}_{(n)}$. Na osi F1 zaznaczona została skala przesunięć chemicznych jąder ^{31}P , a na osi F2 – ^1H .

Porównanie wartości przesunięć chemicznych sygnałów dupletu **III** (Tabele 12 i 13), zarówno do przesunięć chemicznych dupletu **I**, jak i **II** wykazuje znaczne podobieństwo. Obserwowane różnice mają charakter lokalny, obejmujący jedynie sygnały należące do atomów z regionu pętli wewnętrznej, oraz ewentualnie nieliczne sygnały pochodzące od terminalnych zasad. W przypadku większości sygnałów ^1H NMR wartości przesunięć chemicznych różnią się mniej niż 0.1 ppm, natomiast różnice przesunięć chemicznych sygnałów ^{13}C nie przekraczają zazwyczaj 0.4 ppm, a sygnałów ^{31}P – 0.2 ppm. W stosunku do dupletu referencyjnego nieznacznie większe różnice zaobserwować można dla pojedynczych sygnałów reszt **G4**, **G8** i **C19**. W przypadku reszty **G4** największe zmiany dotyczą protonu $\text{H}3$, który w porównaniu do dupletu referencyjnego jest słabiej ekranowany o 0.30 ppm, oraz silniej przesłanianego (o 0.26 ppm) protonu $\text{H}2'$. W przypadku reszty **C19**,

proton H1' ulega przesunięciu w kierunku niższych wartości przesunięć chemicznych o 0.21 ppm w stosunku do dupleksu referencyjnego, natomiast protony **G8:H8** i **C19:H5** są słabiej ekranowane o odpowiednio 0.31 ppm i 0.21 ppm.

Analiza porównawcza wartości przesunięć chemicznych obu dupleksów pokazuje, że zmiany przesunięć chemicznych wywołane wprowadzeniem dodatkowych jednostek nukleotydowych są niewielkie. Te małe różnice przesunięć chemicznych sygnałów rezonansowych wskazują niewątpliwie na duże podobieństwo strukturalne odpowiadających sobie fragmentów helikalnych obu dupleksów. Warto zwrócić uwagę na stosunkowo niewielkie, jednak większe niż w przypadku dupleksu **II**, różnice przesunięć chemicznych jąder ^{31}P . Jest to prawdopodobnie wynikiem próby rozładowania naprężeń występujących w szkielecie fosforocukrowym, wywołanych akomodacją niesparowanych reszt do helikalnej struktury dupleksu.

Tabela 12. Wartości przesunięć chemicznych $\delta^1\text{H}$ (ppm) sygnałów dupleksu **III** [D_2O , 25°C].

Res.	H6/H8	H2/H5	H1'	H2'	H3'	H4'	H5'/H5''	amino	imino
G1	8.00	–	5.65	4.70	4.55	4.31	4.01/3.88	* / *	12.94
C2	7.88	5.30	5.60	4.61	4.62	4.47	* /4.19	6.78/8.45	–
A3	7.99	7.00	5.94	4.65	4.69	4.52	4.56/4.18	* / *	–
G4	7.12	–	5.43	4.25	4.48	4.40	* /4.07	* / *	12.77
A5	7.99	7.71	6.03	4.44	4.73	4.50	* /4.13	* / *	–
A6	8.30	7.84	6.02	4.68	4.81	4.56	4.43/4.23	* / *	–
A7	8.10	7.79	5.93	4.69	4.70	4.59	4.46/4.23	* / *	–
G8	7.43	–	5.66	4.65	4.47	4.51	* /4.17	* / *	12.47
A9	7.80	7.51	5.98	4.68	4.66	4.54	* /4.17	* / *	–
G10	7.25	–	5.67	4.43	4.43	4.45	4.50/4.07	* / *	13.45
C11	7.45	5.18	5.50	4.34	4.39	4.43	4.50/4.05	6.75/8.37	–
G12	7.61	–	5.85	4.09	4.28	4.22	4.43/4.04	* / *	*
C13	8.01	5.93	5.59	4.54	4.55	4.33	4.02/3.92	* / *	–
G14	7.87	–	5.80	4.63	4.70	4.52	4.53/4.18	* / *	13.16
C15	7.80	5.28	5.57	4.40	4.49	4.48	4.59/4.14	6.82/8.62	–
U16	7.97	5.44	5.59	4.57	4.54	4.47	* /4.14	–	14.13
C17	7.84	5.68	5.61	4.47	4.41	*	* /4.14	7.05/8.31	–
U18	7.88	5.61	5.57	4.41	4.48	*	* /4.14	–	*
C19	7.99	5.87	5.33	4.26	4.51	4.37	* /4.12	7.21/8.31	–
U20	7.88	5.43	5.31	4.52	4.58	4.31	4.47/4.08	–	13.59
G21	7.68	–	5.77	4.36	4.58	4.43	4.48/4.09	* / *	12.59
C22	7.49	5.24	5.66	3.95	4.10	4.15	4.49/4.01	6.84/8.21	–

* Sygnały, które nie zostały przypisane.

Tabela 13. Wartości przesunięć chemicznych δ (ppm) sygnałów ^{13}C oraz ^{31}P NMR dupleksu **III** [D_2O , 25°C].

Res.	C6/C8	C2/C5	C1'	C2'	C3'	C4'	C5'		^{31}P
G1	138.71	–	*	*	*	84.65	*		–
C2	141.73	97.14	*	75.47	*	*	*		-4.27
A3	*	152.46	92.81	*	72.86	*	*		-3.95
G4	136.23	–	92.59	75.63	*	*	*		-4.18
A5	*	153.85	91.07	76.49	*	*	*		-4.53
A6	141.71	154.37	90.69	*	75.68	84.35	*		-3.68
A7	140.80	154.03	91.79	*	*	83.35	*		-3.99
G8	136.84	–	92.66	*	*	*	*		*
A9	139.66	153.39	92.79	*	*	*	*		-4.00
G10	135.65	–	*	75.48	*	*	*		-4.18
C11	140.09	97.57	93.77	75.51	*	*	*		-4.39
G12	137.40	–	91.43	77.82	70.42	83.91	*		-3.99
C13	142.97	98.78	*	75.50	*	84.48	62.20		–
G14	**	–	92.68	75.32	72.98	*	*		-3.92
C15	141.43	97.14	93.85	75.47	*	*	*		-4.50
U16	*	103.31	*	75.32	*	*	*		-4.47
C17	141.74	97.66	*	75.58	*	*	*		-4.44
U18	**	103.87	93.93	75.32	*	*	*		-4.36
C19	*	98.22	94.35	75.17	*	*	*		-4.54
U20	141.73	103.31	93.40	75.19	*	*	*		-4.57
G21	136.24	–	92.70	75.51	*	*	*		-4.10
C22	141.25	97.44	*	77.44	69.53	83.21	65.19		-4.33

* Sygnały, które nie zostały przypisane.

2.3.2. Analiza konformacyjna. Wyznaczenie więzów strukturalnych (III)

Odległości między parami protonów wyznaczyłem na podstawie objętości sygnałów korelacyjnych z widm 2D NOESY (D_2O) według wzoru (18), a otrzymanym wartościom przypisałem dolną i górną granicę błędu wynoszącą odpowiednio -15% i +30%. Dodatkowych 26 więzów, w tym 16 dla regionu pętli wewnętrznej (o granicach 4.0 – 7.0 Å) wyznaczyłem z analizy widm 2D NOESY, wykonanych z długim czasem mieszania $\tau_m = 400$ ms. Na podstawie obserwowanych sygnałów korelacyjnych protonów wymiennalnych w widmie 2D NOESY (90% H_2O /10% D_2O) uzyskałem dodatkowo więzy, dla których ustaliłem dolne i górne granice błędów, odpowiednio 1.8 Å oraz 6 Å. Więzy te wyznaczyłem opierając się głównie na widocznych sekwencyjnych kontaktach między protonami iminowymi dupleksu. Również w oparciu o analizę sygnałów protonów wymiennalnych wyznaczyłem więzy na wiązania wodorowe Watsona-Cricka oraz wprowadziłem więzy na planarność wszystkich par zasad dupleksu z wyjątkiem reszt adenozyne **A5**, **A6**, **A7** i jednostki nukleotydowej **U18**.

Na podstawie analizy sygnałów korelacyjnych H1'-H2' w widmach DQF-COSY określiłem konformację pierścieni cukrowych. Więzy na konformację C3'-*endo* zadałem dla wszystkich reszt, z wyjątkiem terminalnej reszty **G12** oraz adenozyń **A5** i **A6**, na które z uwagi na obserwowane stałe sprzężenia rzędu 4 Hz, nałożyłem więzy zezwalające przyjęcie zarówno formy C3'-*endo*, jak i C2'-*endo*.

Więzy na kąty χ w zakresie $-158 \pm 30^\circ$ zadałem dla wszystkich jednostek nukleotydowych na podstawie analizy intensywności intranukleotydowych sygnałów korelacyjnych obserwowanych pomiędzy protonami H2/H6/H8 i H1'/H2'/H3' w widmach 2D NOESY. Z powodu znacznego nakładania się sygnałów, analizę kątów χ dokonałem w oparciu o widma wykonane w trzech różnych temperaturach: 20, 25 i 30°C.

Wprowadziłem także więzy na kąty torsyjne α i ζ szkieletu fosforocukrowego ($0 \pm 120^\circ$) na podstawie analizy przesunięć chemicznych linii rezonansowych ^{31}P NMR, która wykazała koncentrację wszystkich sygnałów w typowym dla formy A-RNA wąskim zakresie ~ 1 ppm ($-3.6 - -4.7$ ppm). Podobnie jak w dupleksach **I** i **II**, nie zadałem więzów na kąty α i ζ w regionie pętli wewnętrznej, aby podczas dynamiki ułatwić cząsteczce penetrację przestrzeni konformacyjnej.

Na kąty torsyjne β większości reszt nukleotydowych nałożyłem więzy determinujące konformację *trans* ($178 \pm 30^\circ$) opierając się na obserwacji jedynie małych sprzężeń $^3J_{\text{PH}5'}$ i $^3J_{\text{PH}5''}$. Z uwagi na niemożność identyfikacji sygnałów ^{31}P reszt **A5** i **G8**, dla tych reszt nie zadałem więzów na kąty β . Tym samym nie wprowadziłem również restrykcji na kąty ϵ reszt **G4** i **A7**. Wartości pozostałych kątów ϵ , określiłem na podstawie analizy sprzężeń $^3J_{\text{PH}3'}$ i przyjąłem zakres $-153 \pm 30^\circ$ dla wszystkich reszt, oprócz **C15** i **U18**, których wartości sprzężeń z uwagi na silne nakładanie się sygnałów nie można było analizować. Dla tych dwu ostatnich reszt wprowadziłem więzy z zakresem błędów $120 \pm 120^\circ$.

Zdecydowanie trudniejszym zadaniem było wyznaczenie, na podstawie uzyskanych widm, wartości kątów γ szkieletu fosforocukrowego. Niestety, nie udało się otrzymać takiego widma DQF-COSY, w którym sygnały H4'-H5'/H5'' byłyby na tyle rozdzielone, abym mógł w oparciu o pomiar stałych sprzężeń $^3J_{\text{H}4'\text{H}5'}$ i $^3J_{\text{H}4'\text{H}5''}$ jednoznacznie określić zakresy kątów γ . Jedynie w przypadku kilku reszt (**G1**, **C13**, **U20** i **G21**) mogłem na podstawie posiadanych widm bez problemu określić wielkość stałej sprzężenia i tym samym wyznaczyć kąt γ . Ponieważ jednak w dupleksie **I** oraz **II** nie obserwowałem żadnych nietypowych dla formy A-RNA wartości sprzężeń, a porównanie widm wskazuje na duże podobieństwo

odpowiadających sobie fragmentów helikalnych wszystkich trzech dupleksów, stąd dla dwuniciowych regionów wprowadziłem więzy o zakresie $54 \pm 30^\circ$.

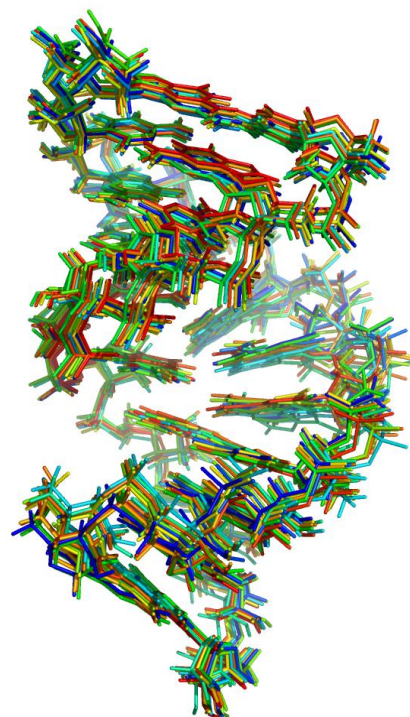
2.3.3. Restryktywna dynamika molekularna (III)

Obliczenia strukturalne przeprowadziłem metodami rMD za pomocą protokołu symulowanego wyżarzania (rozdział IV.2.1.3) w programie Xplor-NIH^{205,206}. Badania prowadziłem w polu siłowym CHARMM z uwzględnieniem danych eksperymentalnych NMR. Pełna statystyka wykorzystanych podczas dynamiki więzów podana została w tabeli na rysunku 55. Podczas etapu udokładnienia potencjały DELPHIC²⁰⁸ zadałem na wszystkie reszty z wyjątkiem występujących w pętli (**A5**, **A6**, **A7** oraz **U18**). Analiza pierwszych otrzymanych struktur wykazała, że w strukturach tych niektóre pary protonów znajdują się w odległościach, dla których w widmie 2D NOESY powinienem obserwować sygnały NOE. Ponieważ w niektórych przypadkach jednoznacznie mogłem ustalić, że korelacje takie nie występują, dlatego powtarzałem obliczenia wprowadzając ostatecznie 11 dodatkowych więzów typu uNOE (z dolną granicą równą 5 Å) uzyskanych w trakcie analizy widm i wstępnych struktur. Więzy te uniemożliwiały generowanie struktur, w których możliwe byłyby odległości mniejsze aniżeli 5 Å, między innymi pomiędzy protonem H2 reszty **A5**, i protonami H8 reszt **G4**, **A6** i **A7** oraz H1' reszty **U18**, jak również między protonem **A7**:H2 i protonami H5, H6 reszty **C19**, oraz **G8**:H1'. Wymienić tu można również więzy pomiędzy protonem H2 reszty **A6**, i odpowiednio protonami H8, H2' reszt **A5** i **A7**. W wyniku końcowych obliczeń otrzymałem 37 konformerów, zgodnych z danymi eksperymentalnymi, spośród których do dalszej analizy wybrałem 10 charakteryzujących się najniższą energią całkowitą. Superpozycję otrzymanej rodziny struktur przedstawia rysunek 55, natomiast region obejmujący niesparowane reszty ukazany został na rysunku 56. Zbieżność współrzędnych końcowych mierzona parametrem RMSD, dla wszystkich ciężkich atomów wynosi 1.12 Å natomiast dla regionu pętli wewnętrznej 1.18 Å. Wśród struktur o najniższej energii wszystkie reszty adenozyne **A5**, **A6** i **A7** skierowane są do wnętrza helisy, a konformacja cząsteczki stabilizowana jest poprzez oddziaływania warstwowe między kolejnymi resztami zasad w łańcuchu (Rys. 57). Analizowałem również oddziaływania warstwowe pomiędzy skrajnymi adenzynami pętli (**A5** i **A7**), a parami zasad G:C, które z nimi sąsiadują. Oddziaływanie pomiędzy resztą **A7** i sąsiednią resztą **G8** jest dużo silniejsze niż oddziaływanie reszty **A5** z resztą guanozyny **G4**, co przedstawione jest na rysunku 58.

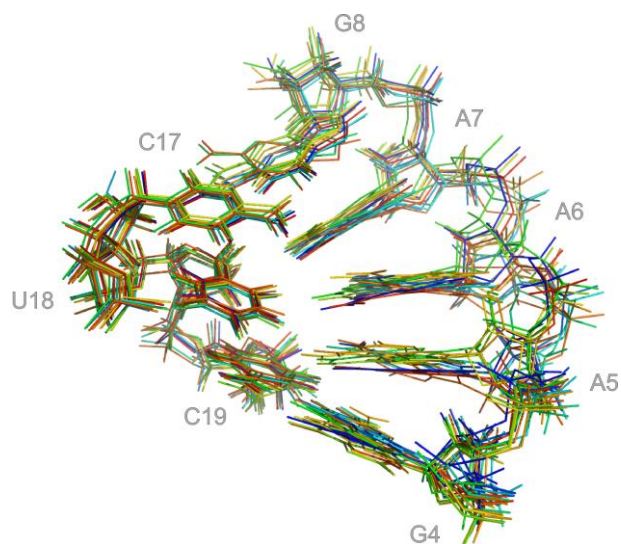
Silne oddziaływania warstwowe występują również między resztami **-C17-U18-C19-**naprzeciwległej nici. Przeprowadzone za pomocą programu RNA View²¹² obliczenia wykazały, że wśród 10 analizowanych struktur tylko cztery wykazywały zawiązywanie się wiązań wodorowych pomiędzy resztą **U18**, a resztami adeniny drugiej nici. Jednakże w żadnej z tych struktur program nie wykazał istnienia typowych dla kanonicznej pary A:U wiązań wodorowych, co sugeruje, że głównym czynnikiem odpowiedzialnym za stabilizację konformacji tego regionu są oddziaływania warstwowe. Przy takiej aranżacji reszt można dyskutować, czy tworzący się motyw strukturalny da się jeszcze zaklasyfikować jako wybrzuszenie dinukleotydowe, czy stanowi niesymetryczną pętlę wewnętrzną, w której w jednej nici znajdują się trzy niesparowane adenozyiny, a w nici naprzeciwległej niesparowana urydyna. Zgodnie z ogólnie przyjętą definicją motyw ten bardziej odpowiada pętli wewnętrznej, dlatego podczas omawiania tej struktury używałem raczej określenia „pętla” niż „wybrzuszenie”.

Statystyka wiązań wykorzystanych w obliczeniach.

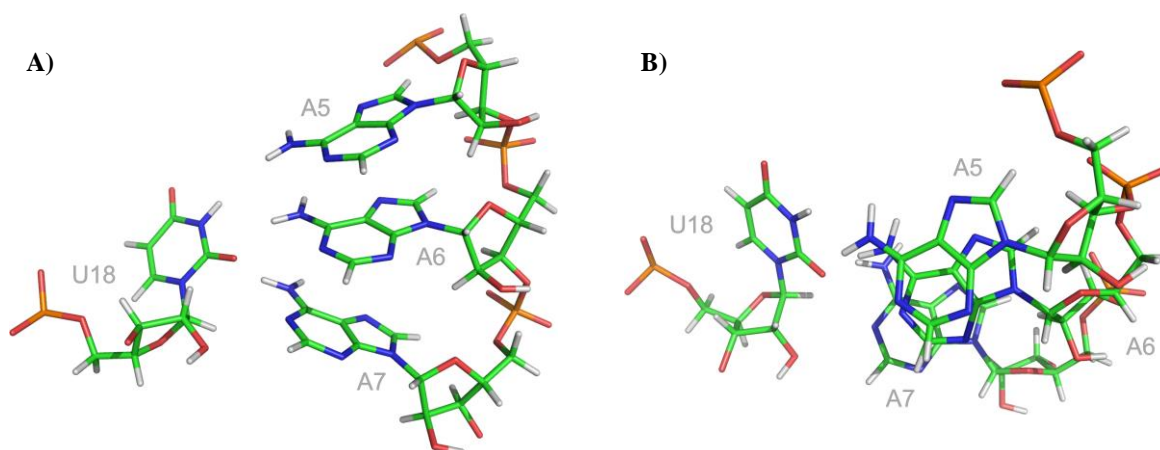
Całkowita liczba wiązań NOE:	329
intranukleotydowe	199
internukleotydowe	130
Wiązy typu uNOE	11
Wiązy na wiązania wodorowe	54
Wiązy na planarność	9
Wiązy na kąty dwuścienne:	214
szkieletu fosfodiesterowego	82
rybozy	110
wiązania glikozydowego	22
Średnia liczba wiązań NOE przypadających na resztę nukleotydową	14.95
Średnia liczba wiązań NOE oraz wiązań na kąty dwuścienne przypadających na resztę nukleotydową	24.68



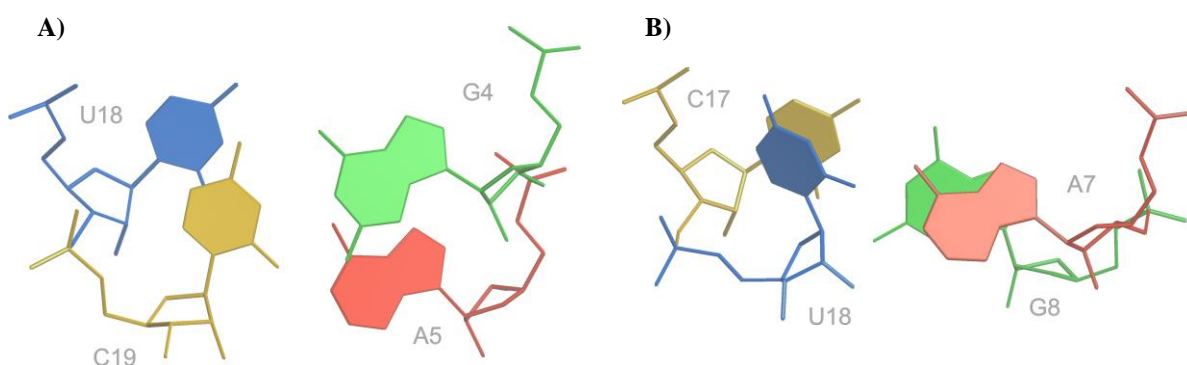
Rys. 55. Nałożenie rodziny 10 struktur przestrzeni konformacyjnej dupleksu **III**.



Rys. 56. Region pętli wewnętrznej dupletu **III** dla 10 struktur o najniższej energii w rzucie od strony dużej brzozy.

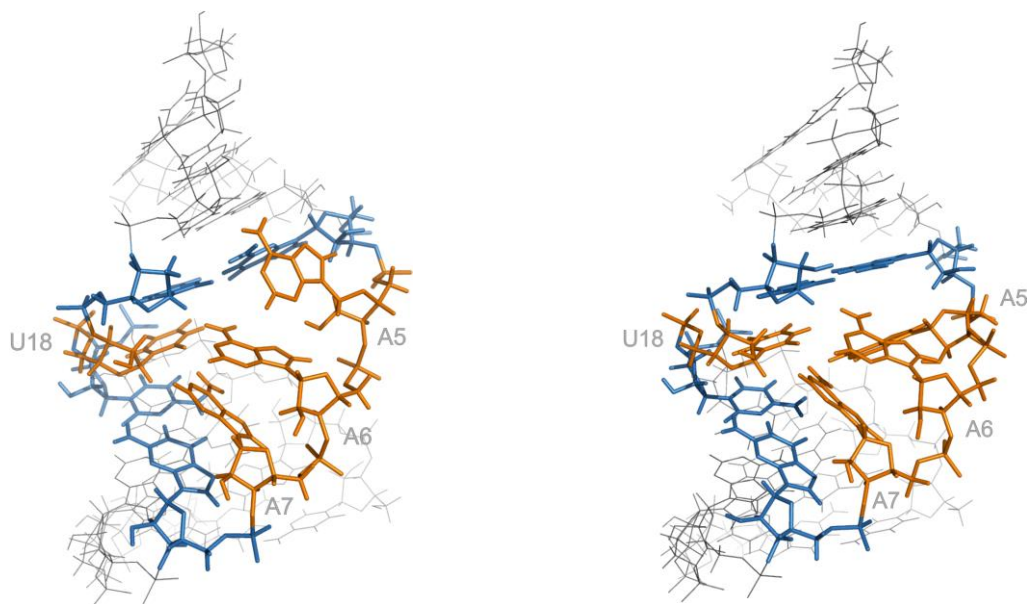


Rys. 57. Aranżacja niesparowanych reszt w strukturze o najniższej energii w rzucie od strony małej brzozy (A) i wzdłuż osi helisy (B).



Rys. 58. Nakładanie się sąsiadujących zasad w rzucie wzdłuż osi helisy dla reszt **G4**, **A5**, **U18** i **C19** (A) oraz reszt **A7**, **G8**, **C17** i **U18** (B) reprezentujące model oddziaływań warstwowych w regionie wybrzuszenia dupletu **II**.

Wśród 36 struktur przestrzeni konformacyjnej zgodnych z danymi eksperymentalnymi, lecz energetycznie mniej uprzywilejowanych, znajdowało się także 8 takich konformerów, w których jedna z reszt adenozynowych (A5, A6 lub A7) wyrzucona była na zewnątrz helisy, zachowując jednak kontakt z pozostałymi resztami układu helikalnego (Rys. 59).



Rys. 59. Przykładowe struktury dupleksu **III**, o niższej energii, w których jedna z reszt adenozynowych tworzących pętlę wewnętrzną wyrzucona jest na zewnątrz helisy.

2.3.4. Analiza przestrzeni konformacyjnej otrzymanej rodziny struktur (**III**)

Analizę parametrów helikalnych wyznaczonych struktur przeprowadziłem za pomocą programu Curves^{30,31}. Średnie wartości kątów torsyjnych otrzymane dla 10 struktur końcowych dupleksu **III** zestawione zostały w tabeli 14, natomiast uśrednione wartości parametrów helikalnych wraz z odchyleniami standardowymi przedstawione w tabeli 15.

Analiza średnich wartości kątów torsyjnych oraz parametrów pofałdowania cukru dla całego dupleksu wykazuje, iż wyznaczone wartości są porównywalne z otrzymanymi dla formy A-RNA. Jednak w przypadku analizowanej struktury wyraźnie ujawnia się większa dynamika strukturalna, o czym świadczą większe niż w przypadku struktur **I** i **II** wartości odchyżeń standardowych. Największe różnice odchyżeń standardowych występują dla parametrów określających konformację reszt A5, A6, A7 oraz C19, przy czym szczególnie duże zmiany zauważyć można w przypadku kątów α i γ reszt A7 i C19. Dla czterech struktur kąt α reszty

A7 odpowiada wartości typowej dla konformacji *gauche*⁻, równej $306 \pm 10^\circ$, natomiast w sześciu pozostałych strukturach kąty te przyjmują wartości z przedziału $68^\circ - 155^\circ$. W przypadku tych sześciu struktur z nietypowymi wartościami kąta α związane są również inne niż dla kanonicznej struktury, wartości kątów γ ($209 \pm 29^\circ$). Kąty γ reszty **A7** w pozostałych czterech strukturach przyjmują wartości typowe dla struktur A-RNA ($43 \pm 9^\circ$). W charakterystycznym dla formy A przedziale znajdują się również kąty α i γ reszt **A6** oraz **G8** większości otrzymanych struktur. Wśród analizowanych struktur o najniższej energii występuje tylko jedna struktura, w której reszta **A6** ma nietypową wartość kąta α , wynoszącą 91° oraz dwie struktury, w których dla reszty **G8** kąt ten wynosi $155 \pm 1^\circ$. Również wartości kątów γ odpowiednich reszt tych trzech struktur odbiegają od typowych wartości. W strukturze o nietypowej wartości kąta α reszty **A6** odpowiada kąt γ równy 197° , natomiast w przypadku dwóch struktur o odmiennej konformacji kąta α reszty **G8**, kąty γ przyjmują wartości $167 \pm 1^\circ$. Podobną korelację między kątami α i γ zaobserwowałem również dla reszty **C19** naprzeciwległej nici, przy czym dla trzech struktur kąty te przyjmują odpowiednio wartości $139 \pm 8^\circ$ (α) i $169 \pm 4^\circ$ (γ), dla kolejnych trzech – wynoszą: $226 \pm 2^\circ$ i $118 \pm 1^\circ$, a w pozostałych strukturach tylko nieznacznie różnią się w stosunku do formy kanonicznej (odpowiednio $321 \pm 13^\circ$ i $45 \pm 6^\circ$). Zmiany w konformacji reszty **C19** są niewątpliwie wywołane z jednej strony próbą akomodacji reszt **A5**, **A6** i **A7**, z drugiej zaś strony z taką aranżacją reszt związana jest większa swoboda konformacyjna całego regionu pętli. Pomimo widocznego wpływu obecności dodatkowych reszt adenozyliny na konformację komplementarnej nici, nie zaobserwowałem wyraźnej korelacji pomiędzy wartościami kątów α i γ reszty **C19**, a opisywanymi wcześniej kątami reszt naprzeciwległej nici. Pozostałe kąty torsyjne, zarówno reszt regionu pętli wewnętrznej, jak i reszt fragmentów dwuniciowych, przyjmują wartości charakterystyczne dla formy A-RNA, z zauważalnie jednak większym rozrzutem tych wartości (wyrażonym odchyleniem standardowym) dla reszt znajdujących się w pętli. Wyjątek stanowi kąt δ i związany z tym parametr P reszty **A5**, której pierścień cukrowy (dla pięciu struktur) znajduje się w konformacji N, a w pozostałych przyjmuje formę S.

Obliczone parametry helikalne dla fragmentów dwuniciowych (Tabela 15) pozwalają wnioskować, iż fragmenty te raczej nie wykazują większych odstępstw od formy kanonicznej. Warto jednak zwrócić uwagę na mniejsze niż dla formy A nachylenie par zasad względem głównej osi dupleksu, które mierzone jest parametrem *Inclination* ($10 \pm 4^\circ$), oraz wyrażoną parametrem *x-Displacement* zmniejszoną wartość średnicy kanału biegnącego wzdłuż osi

helisy ($-4.0 \pm 0.4 \text{ \AA}$). Wartości otrzymane dla obu tych parametrów są zauważalnie mniejsze w przypadku fragmentu znajdującego się po stronie 5' pętli aniżeli te otrzymane dla fragmentu po stronie 3'. Ta propagacja zaburzenia wywołana próbą minimalizacji naprężeń powstałych w wyniku akomodacji dodatkowych reszt pozwala wnioskować, iż konformacja pętli wewnętrznej wywiera większy wpływ na strukturę dwuniciowego fragmentu helikalnego po stronie 5' końca, niż na pary zasad znajdujące się po stronie 3'.

Niestety, w przeciwieństwie do poprzednio omawianego przypadku (dupleks **II**) nie udało się otrzymać adekwatnych wartości dla lokalnych parametrów helikalnych wyznaczanych między kolejnymi zasadami w nici oligonukleotydowej. Jest to spowodowane niedoskonałością programu Curves, który daje gorsze rezultaty podczas wyznaczania parametrów helikalnych jednoniciowych fragmentów aniżeli w pełni komplementarnych dupleksów.

Tabela 14. Średnie wartości kątów torsyjnych łańcuchów fosfodiesterowych (α , β , γ , δ , ϵ , ζ), kąta glikozydowego (χ) oraz parametrów opisujących konformację pierścieni cukrowych (P, v_{max}) obliczonych dla dupleksu **III**. W nawiasach podane zostały wartości odchylenia standardowego.

Reszta	α	β	γ	δ	ϵ	ζ	χ	P	v_{max}
G1	–	–	39 (15)	85 (1)	199 (3)	295 (3)	191 (2)	10 (2)	38 (1)
C2	286 (16)	192 (5)	47 (11)	88 (2)	207 (11)	291 (6)	208 (3)	2 (5)	38 (1)
A3	299 (9)	164 (8)	59 (8)	81 (2)	194 (6)	298 (5)	196 (3)	32 (3)	39 (2)
G4	285 (14)	190 (6)	49 (12)	82 (2)	196 (11)	268 (8)	211 (3)	24 (5)	39 (1)
A5	291 (21)	170 (9)	64 (15)	110 (28)	212 (13)	260 (22)	228 (16)	76 (79)	41 (2)
A6	263 (68)	159 (22)	81 (42)	82 (3)	203 (18)	282 (7)	208 (4)	22 (8)	39 (3)
A7	189 (104)	188 (19)	143 (89)	82 (3)	217 (7)	291 (12)	223 (8)	16 (8)	40 (2)
G8	261 (57)	160 (5)	86 (44)	82 (3)	197 (3)	298 (2)	210 (11)	15 (7)	41 (1)
A9	279 (11)	187 (6)	55 (10)	78 (2)	198 (6)	300 (3)	197 (4)	23 (7)	42 (1)
G10	296 (7)	177 (7)	52 (9)	76 (1)	196 (3)	287 (3)	193 (3)	25 (1)	43 (1)
C11	303 (4)	177 (4)	48 (4)	82 (1)	208 (2)	287 (2)	205 (1)	9 (1)	41 (0)
G12	305 (2)	158 (2)	61 (2)	81 (0)	–	–	197 (2)	29 (1)	39 (0)
C13	–	–	37 (3)	88 (1)	204 (3)	296 (3)	217 (1)	5 (1)	36 (1)
G14	291 (9)	173 (6)	51 (8)	81 (1)	185 (5)	297 (2)	205 (2)	28 (5)	40 (1)
C15	277 (10)	182 (4)	62 (9)	82 (1)	203 (3)	292 (5)	212 (2)	11 (2)	41 (1)
U16	302 (5)	192 (6)	25 (1)	82 (1)	200 (2)	297 (3)	213 (2)	8 (1)	42 (1)
C17	304 (5)	167 (3)	61 (2)	81 (1)	229 (3)	301 (4)	188 (2)	19 (2)	40 (1)
U18	308 (6)	170 (5)	46 (3)	83 (1)	231 (7)	263 (21)	188 (2)	11 (4)	40 (1)
C19	238 (80)	160 (39)	104 (55)	88 (7)	215 (14)	287 (7)	185 (10)	3 (16)	39 (2)
U20	304 (6)	187 (7)	34 (5)	85 (1)	201 (2)	296 (2)	201 (7)	5 (2)	39 (1)
G21	296 (6)	174 (4)	54 (4)	80 (1)	192 (1)	298 (2)	199 (2)	23 (2)	41 (1)
C22	293 (2)	194 (2)	38 (1)	89 (1)	–	–	217 (1)	5 (0)	36 (1)
Średnia:	294 (9)	180 (11)	48 (11)	83 (4)	200 (7)	294 (5)	203 (10)	15 (10)	40 (2)
A-RNA ^{209,210}	294	186	49	88	202	294	202	18	39

Tabela 15. Uśrednione wartości wybranych parametrów helikalnych dupleksu **III** wraz z odchyleniami standardowymi.

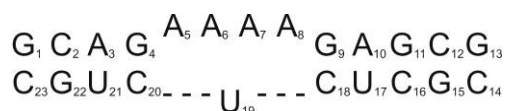
Para zasad	<i>x-Displacement</i> dx (Å)	<i>y-Displacement</i> dy (Å)	<i>Inclination</i> η (°)	<i>Propeller twist</i> ω (°)
G1-C22	-3.5 (0.7)	-0.2 (0.3)	8 (5)	-14 (6)
C2-G21	-3.6 (0.6)	0.3 (0.3)	6 (5)	-10 (6)
A3-U20	-3.7 (0.6)	-0.1 (0.2)	5 (5)	-4 (4)
G4-C19	-3.6 (0.6)	-0.1 (0.4)	6 (4)	-6 (7)
G8-C17	-4.1 (0.2)	0.5 (0.4)	13 (4)	-15 (8)
A9-U16	-4.9 (0.2)	0.3 (0.4)	14 (4)	-1 (3)
G10-C15	-4.1 (0.2)	0.1 (0.4)	13 (3)	-15 (2)
C11-G14	-4.5 (0.2)	0.4 (0.4)	12 (3)	-9 (4)
G12-C13	-4.1 (0.2)	0.2 (0.4)	14 (3)	-22 (3)
Średnia:	-4.0 (0.4)	0.2 (0.3)	10 (4)	-11 (7)
A-RNA ¹⁶¹ :	-5.3	0.0	16	-14

Sekwencja par zasad	<i>Shift</i> D _x (Å)	<i>Rise</i> D _z (Å)	<i>Twist</i> Ω (°)	<i>Roll</i> ρ (°)
G1-C2	-0.3 (0.2)	2.8 (0.2)	42 (2)	-2 (2)
C2-A3	-0.1 (0.1)	2.7 (0.2)	25 (2)	2 (4)
A3-G4	0.3 (0.3)	2.9 (0.3)	36 (3)	6 (3)
G8-A9	-0.7 (0.1)	2.5 (0.3)	32 (2)	8 (5)
A9-G10	0.6 (0.1)	2.8 (0.1)	31 (2)	6 (2)
G10-C11	0.0 (0.2)	3.1 (0.2)	35 (3)	-13 (4)
C11-G12	0.3 (0.1)	2.6 (0.2)	27 (1)	10 (3)
Średnia:	0.0 (0.4)	2.8 (0.2)	33 (6)	2 (8)
A-RNA ¹⁶¹ :	0.0	2.8	33	0

2.4. Badania strukturalne dupleksu **IV**

2.4.1. Analiza strukturalna w oparciu o widma NMR (**IV**)

Stosując metody wysokorozdzielczej spektroskopii NMR podjąłem również próbę ustalenia struktury dupleksu **IV** o sekwencji zasad przedstawionej na rysunku 60.



Rys. 60. Struktura drugorzędowa dupleksu **IV**.

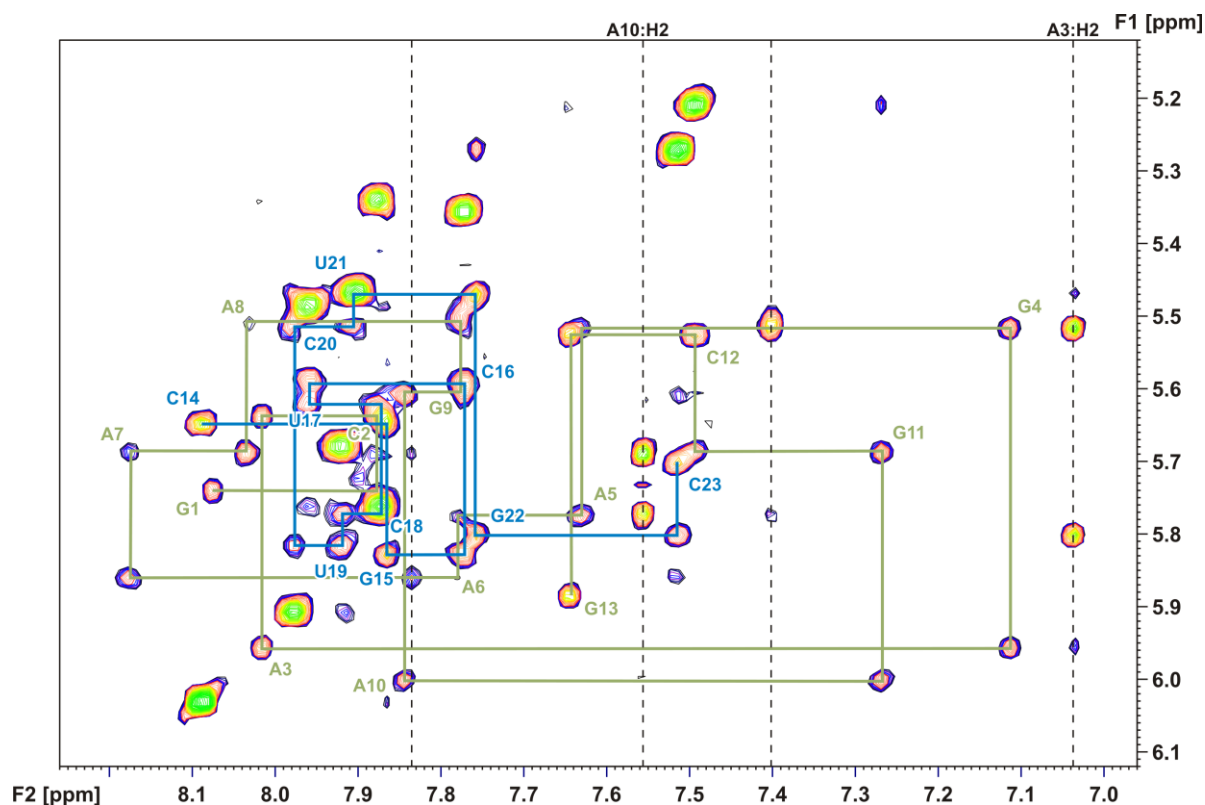
W tym celu wykonałem serię widm NMR: 2D NOESY w D₂O (τ_m = 400 ms), DQF-COSY, ¹H-¹³C HSQC oraz 2D NOESY w mieszaninie 90% H₂O/10% D₂O. Jednak z uwagi na bardzo szybko postępującą degradację próbki nie udało się wykonać pełnej serii eksperymentów, na

podstawie których możliwe byłoby wyznaczenie struktury trzeciorzędowej badanego dupleksu. Trudności w analizie strukturalnej cząsteczek RNA metodami spektroskopii NMR wynikają nie tylko z silnego zagęszczenia sygnałów, czy też braku dostatecznej ilości więzów strukturalnych w najbardziej interesujących regionach niehelikalnych, ale także podatności cząsteczek RNA na degradację. Może ona być wywołana obecnością enzymów, oddziaływaniem z jonami metalu, lub autodegradacją. Szczególnie wrażliwe na degradację są fragmenty jednoniciowe lub zawierające niekanoniczne pary zasad. Właściwości katalityczne niektórych cząsteczek RNA, zwanych rybozymami, są dobrze rozpoznane, jak na przykład rybozym *hammerhead*²¹³.

W oparciu o analizę wykonanych widm, korzystając z metod opisanych w rozdziale IV.2.1.1, a także na podstawie analizy porównawczej widm omówionych wcześniej dupleksów (**I**, **II**, **III**), przypisałem sygnały wymienialnych i niewymienialnych protonów. Analiza widma 2D NOESY w D₂O wykazała występowanie typowych dla formy A-RNA korelacji. Stosunkowo wąskie sygnały w widmie wskazują na pewne uporządkowanie struktury cząsteczki. Fragment widma, w którym zaznaczone zostały sekwencyjne ścieżki NOE dla obu nici dupleksu przedstawiony zostały na rysunku 61. W widmie tym zaobserwować można nieprzerwany szlak połączeń intra- i internukleotydowych wyznaczony dla reszt **-G4-A5-A6-A7-A8-G9-**. Obserwacja nieprzerwanej ścieżki NOE świadczy, że został zachowany dość bliski kontakt pomiędzy heterocyklicznymi resztami fragmentu wybrzuszenia. Niestety, analiza widma jest znacznie utrudniona z uwagi na bardzo silne nakładanie się sygnałów rezonansowych. Dostęp do widm wykonanych z krótszymi czasami mieszania niewątpliwie znacznie ułatwiłyby analizę tych regionów widma 2D NOESY, na których sygnały bardziej się nakładają. Również brak dobrego widma korelacyjnego ¹H-¹³C HSQC uniemożliwił przypisanie bardzo istotnych (z punktu widzenia strukturalnego) sygnałów H2 reszt adenzynowych z regionu wybrzuszenia. Stąd próba analizy konformacji tego fragmentu tylko na podstawie obserwowanych korelacji do protonów H8 może nie być pełna.

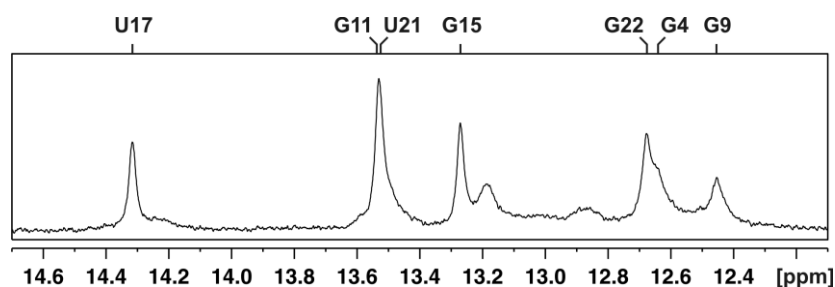
Informacja o konformacji pierścieni rybozy uzyskiwana jest między innymi na podstawie analizy wielkości stałych sprzężenia ³J_{H1'H2'} w widmie DQF-COSY, dlatego podjąłem próbę ich oszacowania. W przeprowadzonym eksperymencie, w regionie H1'-H2', zaobserwować można 6 sygnałów, z których połowa pochodzi od pierścieni cukrowych terminalnych reszt **G13** (o wielkości ³J_{H1'H2'} ~5 Hz), oraz **C14** i **C23** (~3 – 4 Hz). Pozostałe należą do reszt **A6**, **A7** i **U19**. Nie obserwowałem natomiast sygnałów od pozostałych reszt w regionie wybrzuszenia. Może to wskazywać, iż reszty te znajdują się w typowej dla formy A-RNA

konformacji C3'-*endo* (na przykład reszta **A5**) lub z drugiej strony być wynikiem znacznego poszerzenia sygnałów H2', których w przypadku pozostałych reszt nie udało się przypisać. Niestety, z uwagi na degradację próbki nie udało się przeprowadzić eksperymentów ^{31}P NMR, dlatego nie mogłem jednoznacznie przypisać sygnałów protonów sprzężonych z jądrami fosforu, ani wnioskować o konformacji szkieletu fosforocukrowego cząsteczki.



Rys. 61. Region sygnałów H2/H6/H8-H5/H1' w widmie 2D NOESY ($\tau_m = 400$ ms) dupletu **IV** w D_2O (600 MHz, 25°C). Na widmie zaznaczona została sekwencyjna ścieżka H6/H8_(i)-H1'_(i)-H6/H8_(i+1) – kolorem zielonym dla górnej nici, natomiast niebieskim – dla dolnej. Przerwane linie wskazują położenie sygnałów H2 reszt adenyminy.

Na podstawie eksperymentu ^1H NMR wykonanego w mieszaninie 90% $\text{H}_2\text{O}/10\%$ D_2O (Rys. 62) można wnosić, że zawiązujący się duplet ma bardziej dynamiczny charakter niż analogiczny duplet **II** zawierający jedną wybrzuszoną adeninę. W widmie widoczne jest poszerzenie sygnałów pochodzących od protonów zaangażowanych w tworzenie par zasad. Największą szerokością połówkową odznaczają się sygnały terminalnych reszt guanozyny. Również pewnemu poszerzeniu, lecz znacznie mniejszemu ulegają sygnały iminowe guanozyn **G4** i **G9**, zamykających wybrzuszenie. Trudno natomiast jest wnioskować o oddziaływaniach protonu iminowego reszty **U19**.



Rys. 62. Fragment widma ^1H NMR (600 MHz, 90% $\text{H}_2\text{O}/10\%$ D_2O) obejmujący zakres sygnałów protonów iminowych dupleksu **IV**. Nad widmem zaznaczone zostały przypisania sygnałów rezonansowych.

W oparciu o uzyskane dane NMR nie można było określić struktury przestrzennej dupleksu **IV**. Jedynie z analizy porównawczej przesunięć chemicznych linii rezonansowych odpowiadających sobie regionów dwuniciowych dupleksów **IV** i **I** można sugerować o pewnym podobieństwie strukturalnym tych fragmentów. Dowodem tego są nieznaczne różnice przesunięć chemicznych sygnałów. Wartości przesunięć chemicznych ^1H NMR odpowiadające temperaturze 25°C zamieszczone zostały w tabeli 16, natomiast sygnałów ^{13}C w tabeli 17.

Tabela 16. Wartości przesunięć chemicznych $\delta^1\text{H}$ (ppm) sygnałów dupleksu **IV** [D_2O , 25°C].

Res.	H6/H8	H2/H5	H1'	H2'	H3'	H4'	H5'/H5''	amino	imino
G1	8.06	–	5.73	4.78	4.58	4.38	4.04/3.91	* / *	*
C2	7.86	5.33	5.63	4.61	4.60	4.49	* /4.22	6.90/8.60	–
A3	8.00	7.02	5.95	4.66	4.70	4.51	4.56/4.19	* / *	–
G4	7.10	–	5.51	*	*	*	* /4.05	* / *	12.65
A5	7.62	*	5.76	4.28	*	*	*	* / *	–
A6	7.76	*	5.85	4.72	*	*	*	* / *	–
A7	8.16	*	5.68	4.37	*	*	*	* / *	–
A8	8.02	*	5.50	*	*	*	*	* / *	–
G9	7.77	–	5.60	*	*	*	* /4.20	* / *	12.46
A10	7.83	7.54	5.99	4.69	4.68	4.55	* /4.21	* / *	–
G11	7.26	–	5.68	4.45	4.45	4.46	4.50/4.08	* / *	13.53
C12	7.48	5.20	5.52	4.34	4.40	4.43	* /4.06	6.88/8.46	–
G13	7.63	–	5.87	4.11	4.30	4.24	4.44/4.05	* / *	*
C14	8.08	6.02	5.64	4.59	4.59	4.36	4.07/3.95	7.10/8.23	–
G15	7.85	–	5.82	4.66	4.71	*	* /4.21	* / *	13.27
C16	7.76	5.34	5.58	4.44	4.49	4.49	* / *	7.00/8.69	–
U17	7.95	5.47	5.61	4.51	*	4.45	* /4.14	–	14.32
C18	7.86	5.75	5.76	*	*	*	* /4.15	7.16/8.44	–
U19	7.91	5.67	5.81	4.47	*	*	* /4.18	–	*
C20	7.96	5.90	5.50	*	*	*	* /4.20	7.10/8.35	–
U21	7.89	5.46	5.46	4.59	*	*	* /4.14	–	13.52
G22	7.74	–	5.79	4.36	4.61	4.45	* /4.13	* / *	12.68
C23	7.50	5.26	5.69	3.95	4.14	4.14	4.48/4.01	7.01/8.36	–

* Sygnały, które nie zostały przypisane.

Tabela 17. Wartości przesunięć chemicznych δ (ppm) sygnałów ^{13}C NMR dupleksu **IV** [D_2O , 25°C].

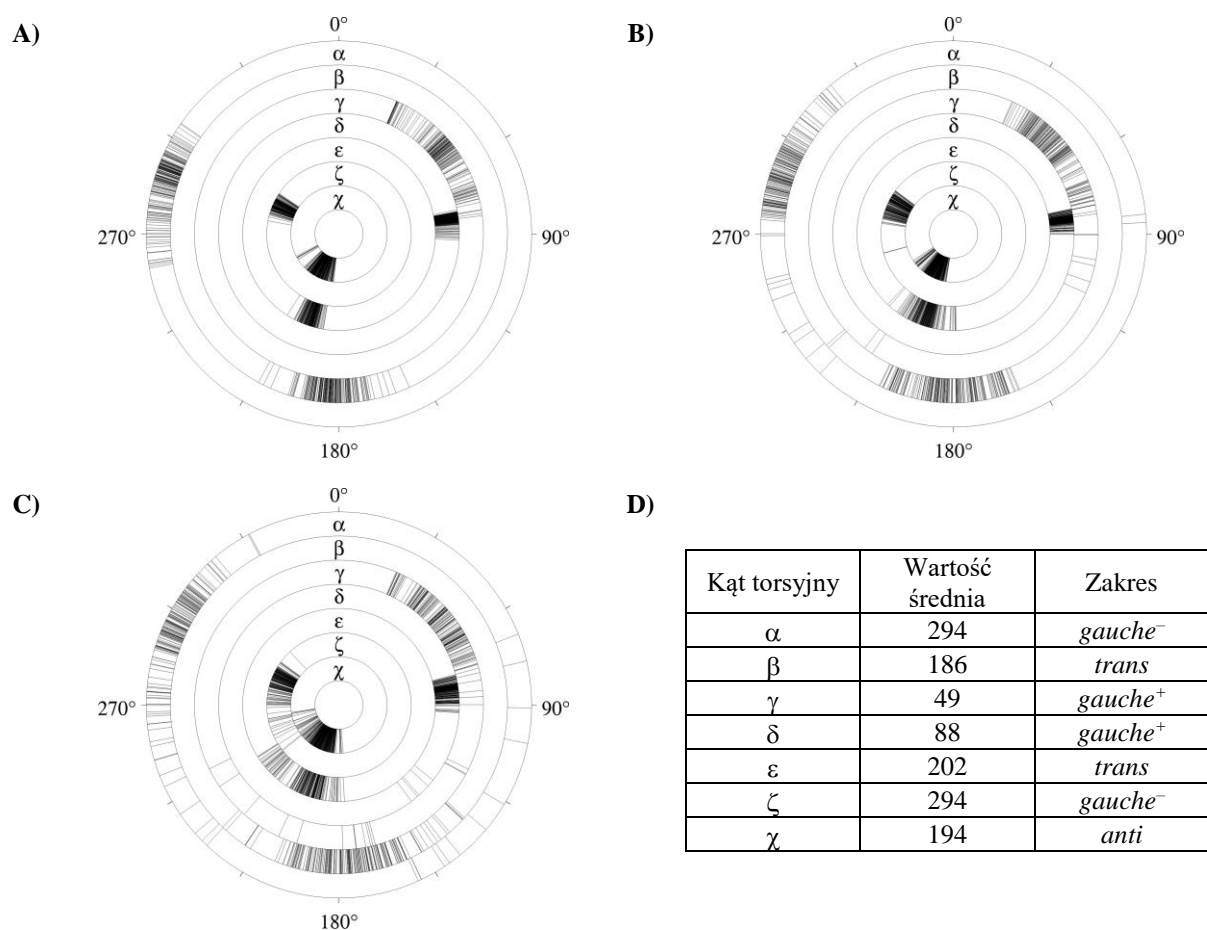
Res.	C6/C8	C2/C5	C1'	C2'	C3'	C4'	C5'
G1	*	–	*	*	*	*	62.28
C2	*	97.08	*	*	*	*	*
A3	*	152.39	*	*	*	*	*
G4	*	–	*	*	*	*	*
A5	*	*	*	*	*	*	*
A6	*	*	*	*	*	*	*
A7	*	*	*	*	*	*	*
A8	*	*	*	*	*	*	*
G9	*	–	*	*	*	*	*
A10	*	*	92.79	*	*	*	*
G11	*	–	*	*	*	*	*
C12	*	97.38	*	*	*	*	*
G13	*	–	*	77.74	70.39	*	*
C14	142.72	98.88	*	*	*	*	62.02
G15	*	–	*	*	*	*	*
C16	*	97.08	93.91	*	*	*	*
U17	*	103.35	*	*	*	*	*
C18	*	97.68	*	*	*	*	*
U19	*	104.22	*	*	*	*	*
C20	*	98.50	*	*	*	*	*
U21	*	103.56	93.57	*	*	*	*
G22	*	–	*	*	*	*	*
C23	*	97.42	*	77.33	69.53	83.22	*

* Sygnały, które nie zostały przypisane.

2.5. Podsumowanie. Analiza kątów torsyjnych, parametrów pofałdowania pierścieni cukrowych oraz parametrów helikalnych struktur **I**, **II** i **III**

Wartości wszystkich kątów torsyjnych rodzin 10 struktur dupleksów **I**, **II** oraz dupleksu **III** zestawione zostały za pomocą programu Nuclech²¹⁴ w postaci układających się koncentrycznie pierścieni przedstawionych na rysunku 63. Porównanie wykresów pozwala wychwycić pewne różnice strukturalne pomiędzy trzema badanymi cząsteczkami. Największe różnice obserwuje się dla kątów torsyjnych α i γ . W strukturach dupleksów **II** i **III** pojawiają się nietypowe dla formy A-RNA rotamery, które związane są z konformacjami nieobecnymi w strukturze odniesienia (**I**), przy czym w przypadku dupleksu **III** ich liczba jest największa. W strukturze cząsteczki **III** występują reszty nukleotydowe, w których pierścień cukrowy znajduje się w konformacji S (na co wskazują wartości kąta δ). Wykresy te ukazują także większy rozrzut poszczególnych kątów torsyjnych w przypadku dupleksów **II** i **III** niż dla struktury **I**, choć dla dupleksu z pojedynczą niesparowaną resztą adenozyne różnice są

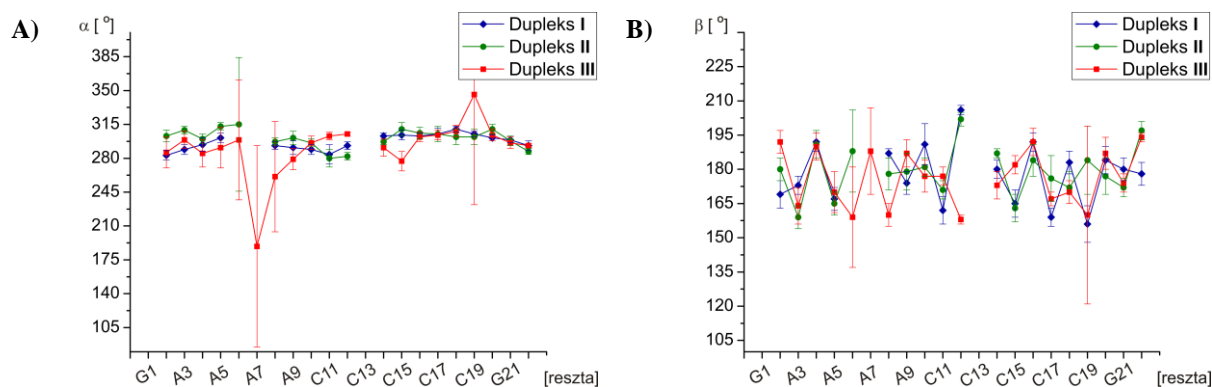
zdecydowanie mniejsze. Te obserwacje pokazują, iż wprowadzanie kolejnych niesparowanych reszt adenozyiny powoduje większą różnorodność konformacyjną, co odzwierciedla również analiza wartości RMSD wyznaczonych dla ciężkich atomów niesparowanych reszt i par zasad bezpośrednio z nimi sąsiadujących. Dla dupletu **II** wartość RMSD wynosi $0.69 \pm 0.30 \text{ \AA}$, przy wartości $0.31 \pm 0.07 \text{ \AA}$ otrzymanej dla całej struktury **I**, natomiast dla dupletu **III** jest jeszcze większa i wynosi 1.18 \AA .



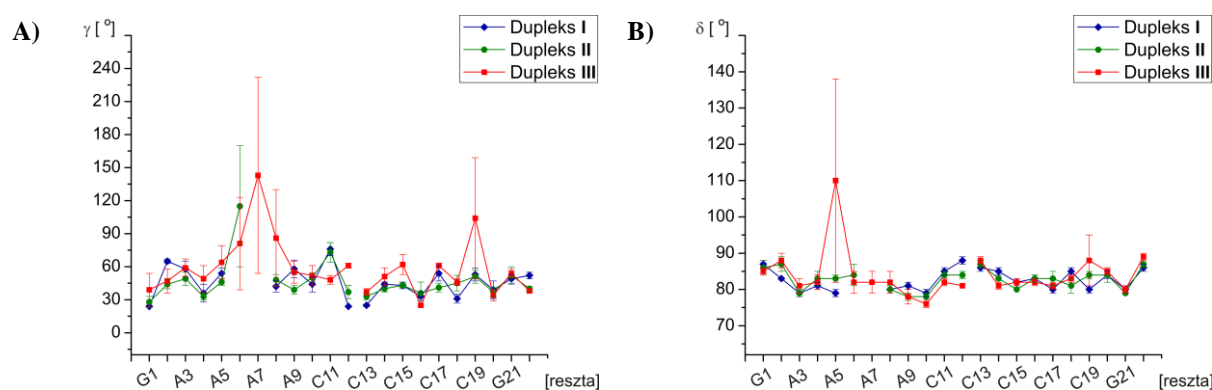
Rys. 63. Porównanie wartości kątów torsyjnych struktur końcowych dupletu **I** (A), **II** (B) i **III** (C). W tabeli (D) podano średnie wartości dla struktur A-RNA.

Przeprowadziłem szczegółową analizę porównując dla danych reszt otrzymane średnie wartości kątów torsyjnych ze wszystkich 10 struktur. Jak widać na rysunkach 64-68, wartości poszczególnych kątów dla cząsteczek **I** – **III** niewiele się różnią i w granicach błędów, odpowiadają wartościom typowym dla formy kanonicznej A-RNA. Wyjątek stanowią te wartości, które dotyczą niesparowanych reszt i par zasad z nimi sąsiadujących. W przypadku struktury z pojedynczym wybrzuszeniem (**II**) obserwowane zmiany mają jedynie charakter lokalny obejmujący resztę **A5** i sąsiadującą z nią resztę adenozyiny **A6**. Zmiany

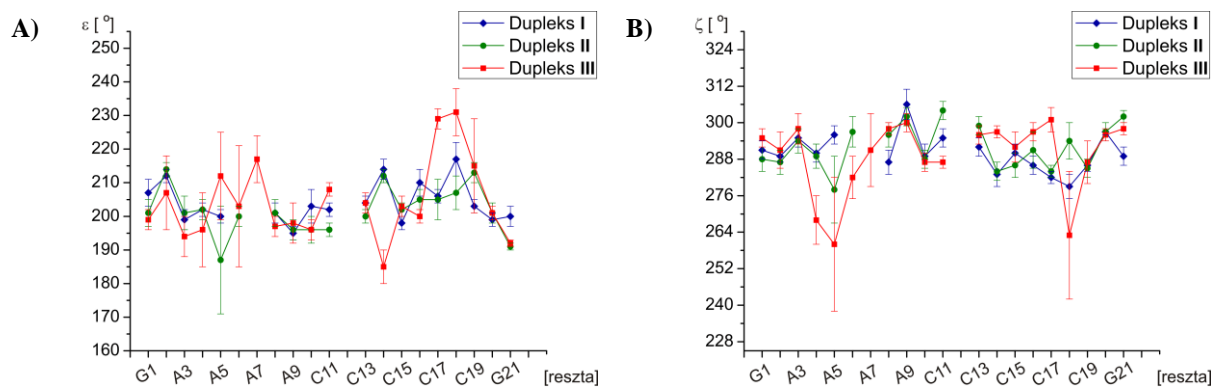
konformacyjne wyrażone są, nieznacznie odbiegającymi od pozostałych, wartościami kątów ϵ dla reszty **A5** oraz kątów α i γ dla reszty **A6** (Rys. 64A i 65A). Powyższa analiza pokazuje, że wprowadzenie pojedynczej reszty adenozynej pomiędzy helikalne fragmenty dwuniciowe dupleksu **II** wywołuje jedynie niewielkie zaburzenie w stosunku do regularnej struktury dupleksu. Zdecydowanie większe zmiany konformacyjne zaobserwowałem po wprowadzeniu dwóch dodatkowych reszt adenozynej (**III**). Obecność dwóch niesparowanych reszt indukuje większą labilność konformacyjną nici, w której te reszty wprowadzono i dodatkowo wymusza zmiany w nici naprzeciwległej. Świadczy o tym większa niż w strukturze **II** liczba konformerów z nietypowymi wartościami kątów torsyjnych α oraz γ . Te nietypowe wartości kątów występują dla reszt **A6**, **A7**, **G8** oraz dla reszty cytydyny **C19**, która znajduje się w drugiej nici (Rys. 64A i 65A). Dla reszty **G4** w dupleksie **III** jedynie kąty ζ ($268 \pm 8^\circ$) odbiegają od typowych wartości (294°) (Rys. 66B). Również kąty ζ reszt **A5** ($260 \pm 22^\circ$) i **U18** ($263 \pm 21^\circ$) różnią się zarówno od tych obserwowanych dla dupleksów **I** i **II**, jak i od występujących w kanonicznej formie A-RNA. Jednak dla obu tych reszt obserwuje się większą zmienność kąta ζ , co wynika zapewne z dynamicznego charakteru regionu. O dynamice regionu pętli świadczy także obecność konformerów, w których pierścień rybozy reszty **A5** przyjmuje formę S, co wiąże się z dużą zmiennością parametru P i δ (Rys. 68A i 65B). Takiej konformacji cukru nie obserwowałem natomiast w przypadku struktury **II**. Dynamika regionu pętli indukuje zmiany kątów β (Rys. 64B), na co wskazuje większe zróżnicowanie wartości tych kątów w przypadku reszt **A6** ($159 \pm 22^\circ$), **A7** ($188 \pm 19^\circ$) i **C19** ($160 \pm 39^\circ$). Zauważyć można, że wprowadzenie dodatkowej reszty wywołuje nieznaczne zmiany kątów ϵ reszt naprzeciwległej nici – średnio o 30° dla reszt **C17** i **U18** (Rys. 66A), oraz kątów χ o około 17° w przypadku reszt **C17**, **U18** i **C19** (Rys. 67). Pozostałe kąty torsyjne niewiele się różnią i przyjmują charakterystyczne wartości dla kanonicznej formy A-RNA. Przeprowadzona analiza wskazuje, że wprowadzenie do sekwencji jednej, a nawet dwóch dodatkowych jednostek adenozynowych przyjmujących intrahelikalne konformacje, nie wywołuje globalnych zmian w strukturze dupleksu. Obserwowane zmiany obejmują wybrzuszone reszty oraz reszty z nimi sąsiadujące, a wielkość tych zmian zależy od liczby dodatkowych reszt.



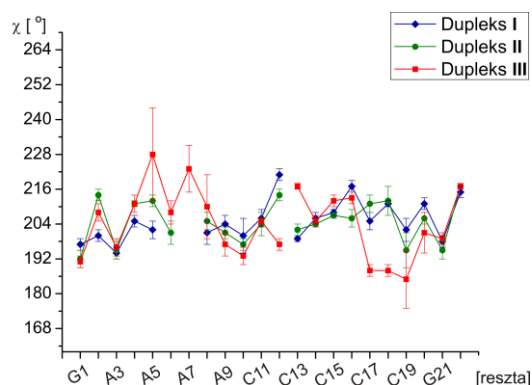
Rys. 64. Graficzna prezentacja średnich wartości kątów torsyjnych α (A) i β (B) wraz z naniesionymi odchyleniami standardowymi dla dupleksów I (linia niebieska), II (linia zielona) oraz III (linia czerwona). Na osi odciętych zachowana została numeracja reszt jak w dupleksie III.



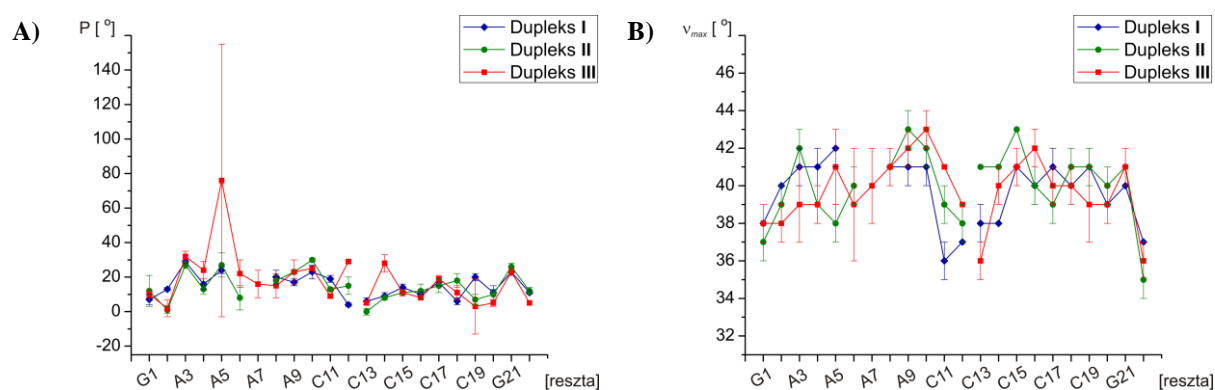
Rys. 65. Graficzna prezentacja średnich wartości kątów torsyjnych γ (A) i δ (B) wraz z naniesionymi odchyleniami standardowymi dla dupleksów I (linia niebieska), II (linia zielona) oraz III (linia czerwona). Na osi odciętych zachowana została numeracja reszt jak w dupleksie III.



Rys. 66. Graficzna prezentacja średnich wartości kątów torsyjnych ϵ (A) i ζ (B) wraz z naniesionymi odchyleniami standardowymi dla dupleksów I (linia niebieska), II (linia zielona) oraz III (linia czerwona). Na osi odciętych zachowana została numeracja reszt jak w dupleksie III.



Rys. 67. Graficzna prezentacja średnich wartości kąta glikozydowego χ wraz z naniesionymi odchyleniami standardowymi dla dupleksów **I** (linia niebieska), **II** (linia zielona) oraz **III** (linia czerwona). Na osi odciętych zachowana została numeracja reszt jak w dupleksie **III**.

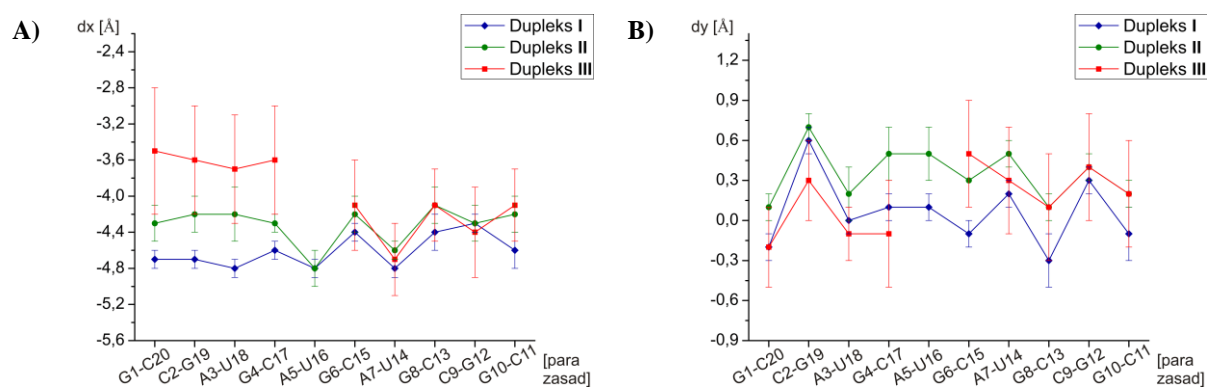


Rys. 68. Graficzna prezentacja średnich wartości kąta fazowego pseudorotacji P (A) i amplitudy pofaldowania v_{max} (B) wraz z naniesionymi odchyleniami standardowymi dla dupleksów **I** (linia niebieska), **II** (linia zielona) oraz **III** (linia czerwona). Na osi odciętych zachowana została numeracja reszt jak w dupleksie **III**.

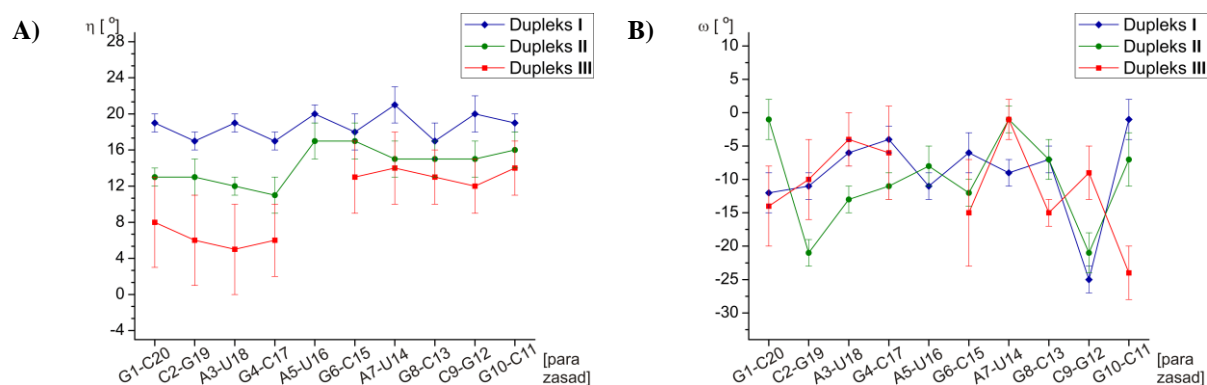
Porównałem również parametry helikalne dupleksów **I**, **II**, **III**, z których najważniejsze zamieściłem na rysunkach 69-72. Zauważyć można, że parametry wyznaczone zarówno dla dupleksu z pojedynczym wybrzuszeniem adenozynowym (dupleks **II**) jak i dla dupleksu, w którym trzy kolejne adenozyny jednej nici wraz z urydyną w nici naprzeciwległej tworzą pętlę wewnętrzną (**III**) są bardzo podobne do tych otrzymanych dla dupleksu referencyjnego (**I**). Wykazują one analogiczną zależność zmian wartości od położenia danej reszty w sekwencji łańcucha. Pomimo, że analiza kątów torsyjnych nie wykazała większych zmian strukturalnych w dupleksach **II** i **III**, jednakże szczegółowe porównanie parametrów helikalnych ukazuje pewne różnice pomiędzy analizowanymi strukturami. Akomodacja niesparowanej reszty adenozynowej **A6** w dupleksie **II** powoduje obniżenie parametru η (*Inclination*) średnio o 4° dla wszystkich par zasad (Rys. 70A). Nachylenie par zasad względem głównej osi helisy w przypadku dupleksu **III** jest jeszcze mniejsze i wynosi

średnio $10 \pm 4^\circ$ (przy $19^\circ \pm 2$ dla dupleksu referencyjnego), przy czym zależność ta bardziej się uwidacznia w przypadku analizy parametru η dla dwuniciowych fragmentów znajdujących się po stronie 5' niesparowanych reszt adenozyln. Ponadto w stosunku do dupleksu referencyjnego obserwowałem niewielkie, lecz systematyczne zredukowanie bezwzględnej wartości parametru x -Displacement (Rys. 69A), średnio o 0.3 \AA (dla dupleksu **II**) i aż o 0.6 \AA dla struktury **III**. Jednak w tym przypadku znaczące zmiany dotyczyły tylko fragmentów dwuniciowych z końców 5' dupleksów. Te dwa parametry ilustrują, w jaki sposób zaburzenie wywołane wprowadzeniem niesparowanych reszt propaguje się na całą strukturę dupleksu, minimalizując zaburzenia w strukturze.

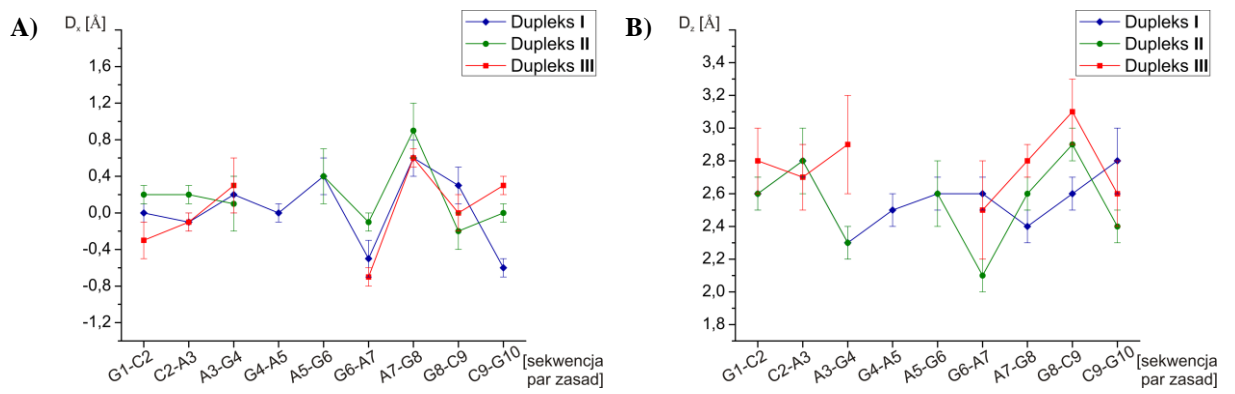
Analiza pozostałych parametrów wskazuje na bardzo dobrą zbieżność między strukturą dupleksu referencyjnego a pozostałymi strukturami **II** i **III**.



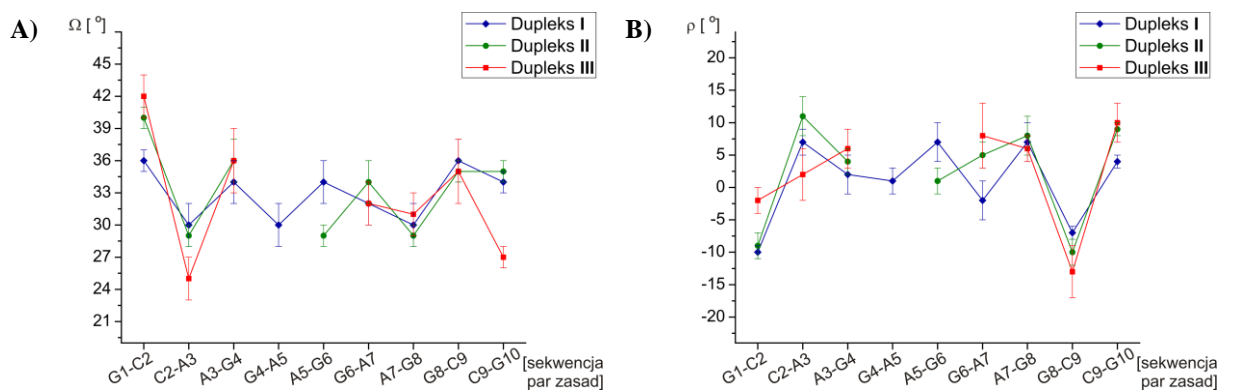
Rys. 69. Graficzna prezentacja średnich wartości parametrów x -Displacement, dx (A) i y -Displacement, dy (B) wraz z naniesionymi odchyleniami standardowymi dla dupleksów **I** (linia niebieska), **II** (linia zielona) i **III** (linia czerwona). Na osi odciętych zachowana została numeracja reszt jak w duplesie referencyjnym.



Rys. 70. Graficzna prezentacja średnich wartości parametrów Inclination, η (A) i Propeller twist, ω (B) wraz z naniesionymi odchyleniami standardowymi dla dupleksów **I** (linia niebieska), **II** (linia zielona) i **III** (linia czerwona). Na osi odciętych zachowana została numeracja reszt jak w duplesie referencyjnym.



Rys. 71. Graficzna prezentacja średnich wartości parametrów *Shift*, D_x (A) i *Rise*, D_z (B) wraz z naniesionymi odchyleniami standardowymi dla dupleksów I (linia niebieska), II (linia zielona) i III (linia czerwona). Na osi odciętych zachowana została numeracja reszt jak w dupleksie referencyjnym.



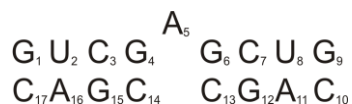
Rys. 72. Graficzna prezentacja średnich wartości parametrów *Twist*, Ω (A) i *Roll*, ρ (B) wraz z naniesionymi odchyleniami standardowymi dla dupleksów I (linia niebieska), II (linia zielona) i III (linia czerwona). Na osi odciętych zachowana została numeracja reszt jak w dupleksie referencyjnym.

3. Badania duplesów RNA zawierających jednonukleotydowe wybrzuszenia (A lub U)

3.1. Badania strukturalne dupleksu V

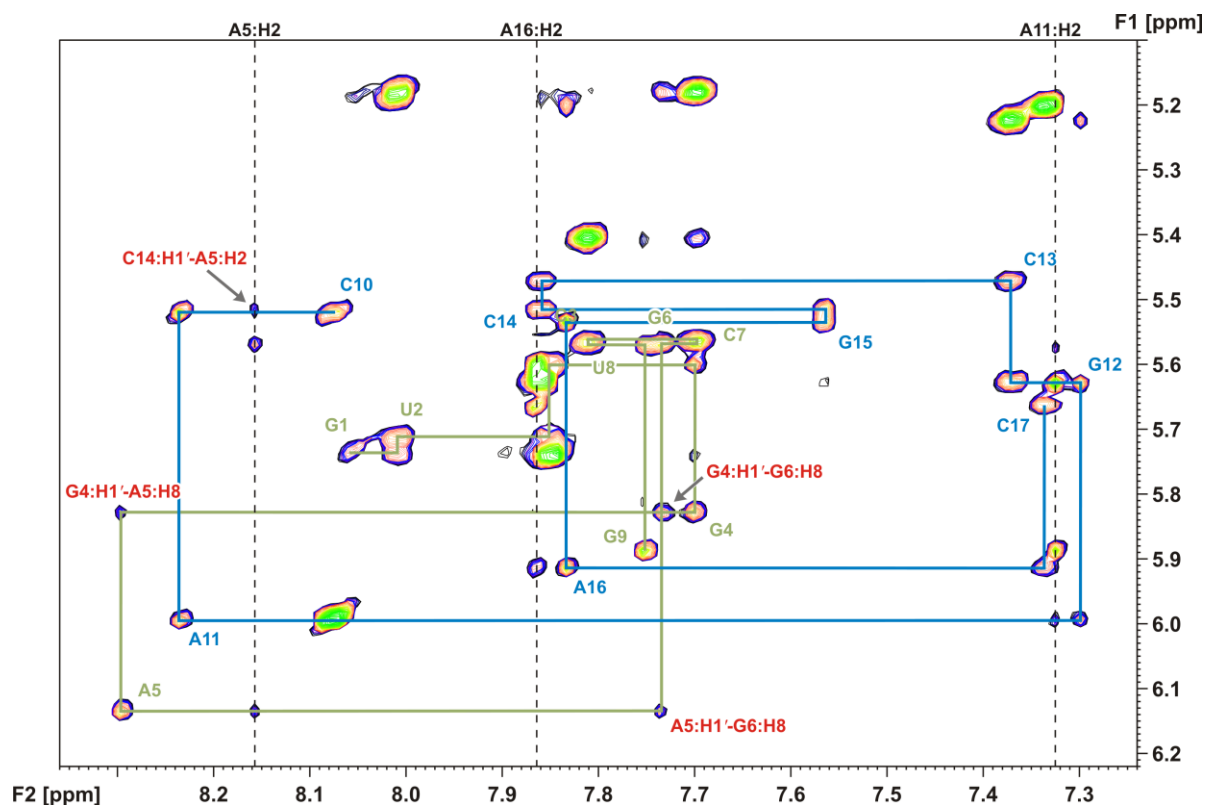
3.1.1. Analiza strukturalna w oparciu o widma NMR (V)

Struktura regionu wybrzuszenia może zależeć nie tylko od typu niesparowanej reszty, ale także od sekwencji otaczających ją par zasad. Przedmiotem moich dalszych badań był dupleks posiadający w centralnej pozycji niesparowaną resztę adenozyiny znajdującą się w sąsiedztwie dwóch par G:C (Rys. 73). Wybór tej sekwencji był podyktowany badaniami prowadzonymi wcześniej w Pracowni Chemii Strukturalnej Kwasów Nukleinowych dotyczącymi dynamiki dupleksów RNA zawierających 2-aminopurynę, jako sondę fluorescencyjną^{215,216}. Wcześniejsze badania prowadzone metodą czasowo-rozdzielczej spektrofluorymetrii oraz za pomocą symulacji dynamiki molekularnej w próżni wskazywały na dwa dobrze zdefiniowane stany konformacyjne 2-aminopuryny. Jeden, w którym wystającą na zewnątrz helisy 2-aminopurynę cechowała duża mobilność, oraz drugi, w którym konformacja reszty 2-aminopuryny wciśniętej pomiędzy sąsiednie pary zasad stabilizowana była oddziaływaniami warstwowymi. Interesującym wydawało mi się sprawdzenie, czy w przypadku zastąpienia 2-aminopuryny resztą adenozyiny również zaobserwuję istnienie różnych form konformacyjnych w równowadze.



Rys. 73. Struktura drugorzędowa dupleksu V.

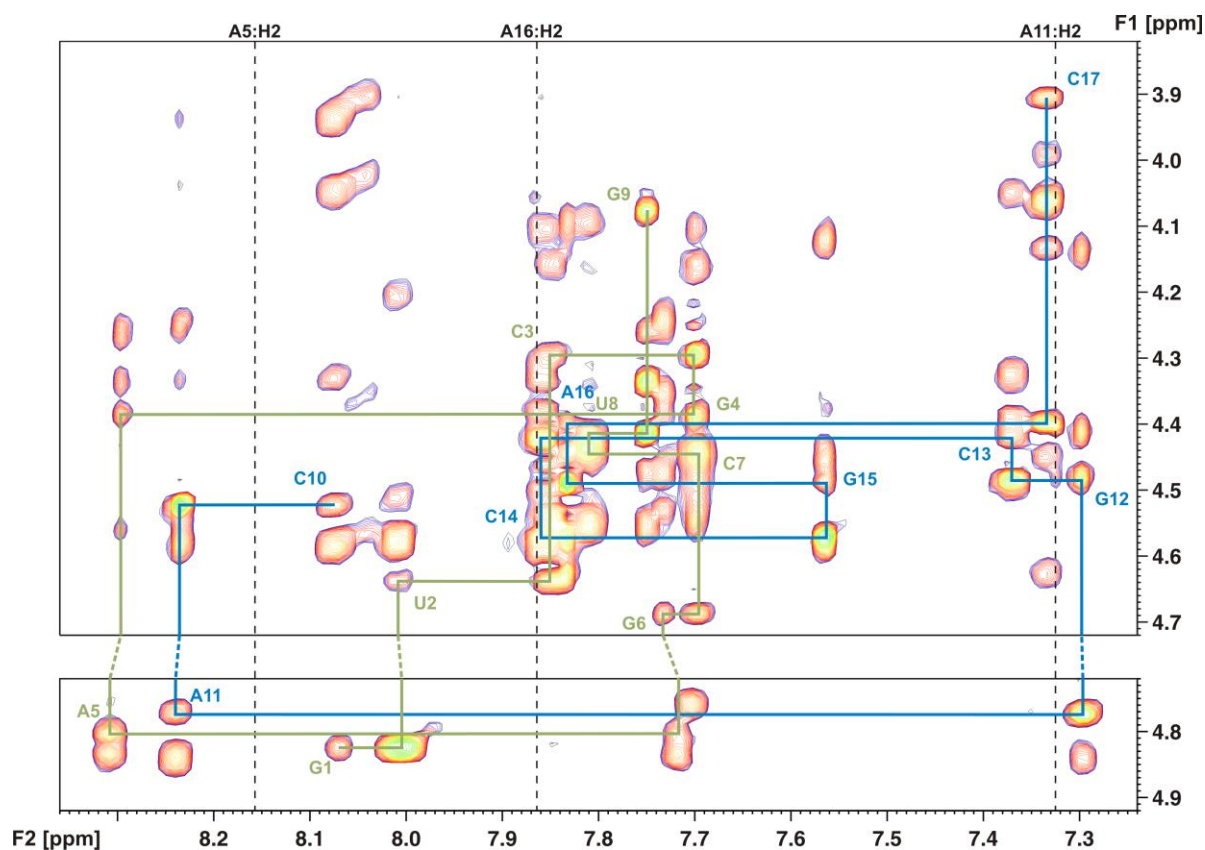
W tym celu przeprowadziłem szereg eksperymentów ¹H (2D NOESY, DQF-COSY) oraz ¹³C i ³¹P NMR (¹H-¹³C HSQC, ¹H-³¹P HSQC), w oparciu o które dokonałem następnie analizy strukturalnej dupleksu V. Przypisania sygnałów rezonansowych protonów H8, H6 i H1' otrzymałem na podstawie analizy ścieżek sekwencyjnych H6/H8_(i)-H1'_(i)-H6/H8_(i+1) w widmach 2D NOESY (Rys. 74) i potwierdziłem poprzez wyszukanie typowych dla struktur A-RNA korelacji w innych regionach widma. Analiza widm korelacyjnych ¹H-¹³C HSQC i ¹H-³¹P HSQC, pomogła w przypisaniu pozostałych sygnałów oraz wyznaczeniu przesunięć chemicznych linii rezonansowych skorelowanych z nimi jąder ¹³C oraz ³¹P (Tabele 18, 19).



Rys. 74. Region sygnałów H2/H6/H8-H5/H1' w widmie 2D NOESY ($\tau_m = 400$ ms) dupletu **V** w D_2O (600 MHz, 25°C). W widmie zaznaczona została sekwencyjna ścieżka H6/H8_(i)-H1'_(i)-H6/H8_(i+1) – kolorem zielonym dla górnej nici, natomiast niebieskim – dla dolnej nici. Przerywane linie wskazują położenie sygnałów H2 reszt adenozyiny.

W widmie 2D NOESY ($\tau_m = 400$ ms) obejmującym obszar H2/H6/H8-H5/H1' możliwe było wyznaczenie nieprzerwanej ścieżki sekwencyjnej (H6/H8_n-H1'_n-H6/H8_{n+1}) także pomiędzy resztami w regionie wybrzuszenia (-G4-A5-G6-), podobnie jak w przypadku omawianego w rozdziale IV.2.2 dupletu **II**, gdzie niesparowana reszta adenozyiny ograniczona była przez pary G:C i A:U. Jednak obserwowane dla tej cząsteczki intranukleotydowe sygnały korelacyjne pomiędzy resztami G4, A5 i G6 mają mniejsze intensywności i są niewidoczne w widmie wykonanym z krótszym czasem mieszania, $\tau_m = 150$ ms. Obecność tych sygnałów w widmie wskazywała na występowanie oddziaływań warstwowych pomiędzy resztą A5 i sąsiadującymi z nią resztami guanozyny G4 i G6. Ponadto, obecne w widmie sygnały pomiędzy sygnałami protonu H2 reszty A5, i protonu anomerycznego H1' reszty C14, pochodzącego z nici naprzeciwległej sugerowały, że wybrzuszona reszta skierowana jest do wnętrza helisy. Również w innych regionach widma obserwowałem charakterystyczne dla tego typu orientacji liczne kontakty NOE niesparowanej reszty A5 z sąsiednimi resztami tej samej nici. Wymienić tu można na przykład obecność oddziaływań między protonami pierścieni zasadowych G4:H8-A5:H8-G6:H8, analogicznie jak w duplesie **II**, a także

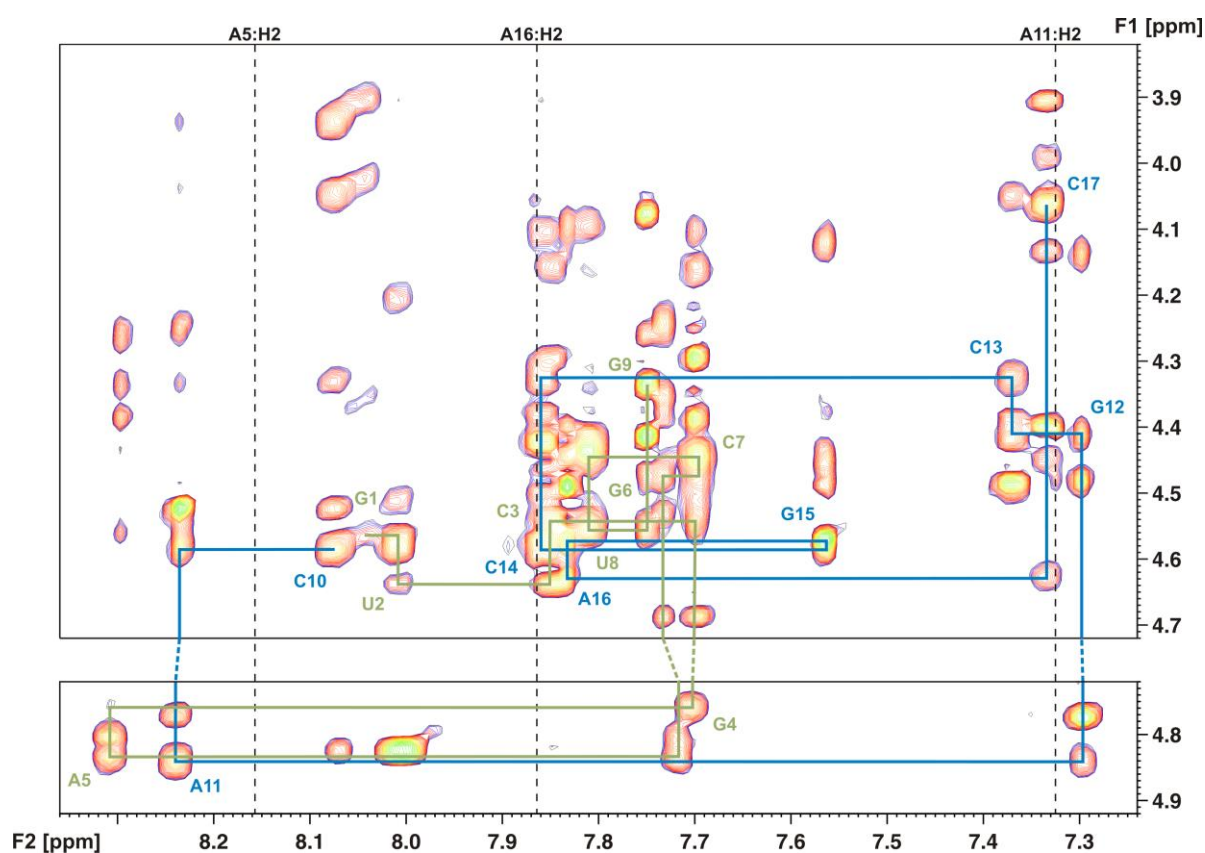
sekwencyjnych sygnałów $H6/H8_n-H2'_n-H6/H8_{n+1}$ (Rys. 75) oraz $H6/H8_n-H3'_n-H6/H8_{n+1}$ (Rys. 76), choć dla tych ostatnich kontakty NOE pomiędzy resztami **G4-A5** i **A5-G6** były słabsze niż analogiczne sygnały obserwowane dla pozostałych fragmentów dupleksu.



Rys. 75. Fragmenty widma 2D NOESY dupleksu **V** (600 MHz, D_2O) wykonane w temperaturze 25°C (górny fragment) i 30°C (dolny) obejmujące region sygnałów $H2/H6/H8-H2'/H3'/H4'/H5'/H5''$. W widmie zaznaczone zostały sekwencyjne ścieżki $H6/H8_{(i)}-H2'_{(i)}-H6/H8_{(i+1)}$ – kolorem zielonym dla górnej nici, natomiast niebieskim – dla dolnej nici. Przerwane linie wskazują położenie sygnałów $H2$ reszt adenozyiny.

Oprócz omówionych sygnałów typowych dla struktury, w której wybrzuszona reszta interkaluje pomiędzy sąsiadujące pary zasad, zaobserwowałem również dodatkowe sygnały świadczące o nietypowej konformacji regionu wybrzuszenia. W regionie aromatyczno-anomerycznym widma pojawił się dodatkowy sygnał, który jednoznacznie mogłem przypisać oddziaływaniu pomiędzy protonem $H1'$ reszty **G4** i protonem $H8$ reszty **G6**. Obecność tego sygnału w widmie była trudna do zinterpretowania. Z jednej strony otrzymane dane wskazywały, że reszta **A5** jest zaangażowana w oddziaływania warstwowe z sąsiadującymi resztami **G4** i **G6** oraz skierowana do wnętrza helisy, z drugiej zaś strony bliskość przestrzenna protonów **G4:H1'** i **G6:H8** pozornie wykluczała taką możliwość. Jednak analizując pozostałe regiony widma 2D NOESY zauważyłem jeszcze jeden, dodatkowy

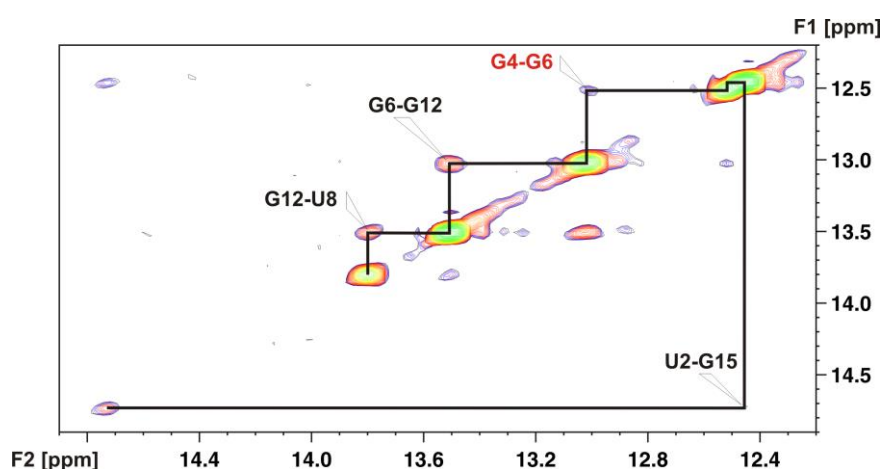
sygnał, którego spodziewałbym się w przypadku, gdy reszta **A5** byłaby wyrzucona na zewnątrz helisy. Obserwacja tego sygnału, pomiędzy protonami **G4:H2'** i **G6:H8** dodatkowo upewniła mnie, że mam do czynienia z nietypową konformacją wybruszenia w badanej cząsteczce, której nie da się scharakteryzować jedynie za pomocą używanych dotąd przeze mnie określeń „*stack-in*” lub „*loop-out*”. Obserwacja dość intensywnego sygnału NOE pomiędzy protonem H1' reszty **G4** i protonem H8 reszty **G6** (Rys. 74), czy korelacji między protonami **G4:H2'** i **G6:H8**, wskazywała na istnienie oddziaływań warstwowych pomiędzy zasadami sąsiadującymi z wybruszeniem i byłaby niemożliwa, gdyby reszta **A5** interkalowała pomiędzy sąsiadujące reszty guanozyny **G4** i **G6**.



Rys. 76. Fragmenty widma 2D NOESY dupletu **V** (600 MHz, D₂O) wykonane w temperaturze 25°C (górny fragment) i 30°C (dolny) obejmujące region sygnałów H2/H6/H8-H2'/H3'/H4'/H5'/H5''. W widmie zaznaczone zostały sekwencyjne ścieżki H6/H8_(i)-H3'_(i)-H6/H8_(i+1) – kolorem zielonym dla górnej nici, natomiast niebieskim – dla dolnej nici. Przerwane linie wskazują położenie sygnałów H2 reszt adenozyne.

Analiza widma NOESY wykonanego w temperaturze 10°C w mieszaninie 90% H₂O/10% D₂O także dostarczyła interesujących obserwacji. W widmie tym sygnały protonów iminowych są stosunkowo dobrze rozdzielone, stąd mogłem je jednoznacznie przypisać. Widocznych w widmie sześć sygnałów pochodzi od protonów iminowych reszt

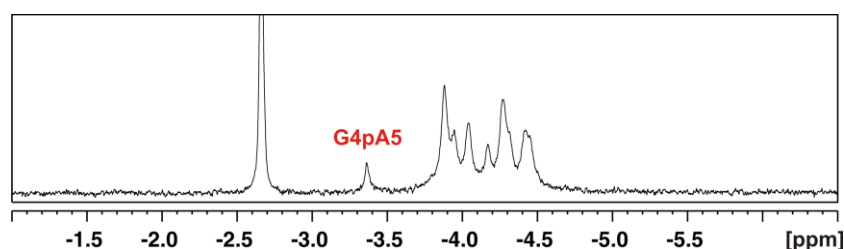
urydyny **U2** i **U8** oraz wszystkich reszt guanozyny, z wyjątkiem pochodzących od terminalnych reszt **G1** oraz **G9**. Obecność sygnałów reszt **G4** i **G6** w typowym dla kanonicznych par zasad zakresie przesunięć chemicznych, oraz widoczne w widmie oddziaływania tych protonów z protonami aminowymi komplementarnych reszt cytydyny dowodzi, iż pary **G4:C14** i **G6:C13** ograniczające wybrzuszenie stanowią klasyczne pary zasad typu Watsona-Cricka. W regionie oddziaływań protonów iminowych mogłem wyznaczyć nieprzerwaną ścieżkę między wszystkimi protonami iminowymi włącznie z oddziaływaniem pomiędzy protonami **G4:H1-G6:H1** (Rys. 77). Fakt ten wyraźnie wskazywał, że wybrzuszona reszta **A5** nie może swobodnie interkalować pomiędzy sąsiadujące reszty, potwierdzając tym samym wcześniejsze obserwacje.



Rys. 77. Fragment iminowo-iminowy widma 2D NOESY dupletu **V** w mieszaninie 90% H₂O/10% D₂O (600 MHz, 10°C).

Zaobserwowałem również, że nietypowa konformacja reszty nukleotydowej **A5** pociąga za sobą zmiany konformacyjne w łańcuchu fosforocukrowym. Ponieważ informację o konformacji pierścieni rybozy uzyskać można na podstawie pomiaru wielkości stałych sprzężenia $^3J_{H1'H2'}$ w widmach typu COSY, stąd przeanalizowałem szczegółowo region występowania sygnałów H1'-H2' w widmie DQF-COSY. W regionie tym łatwo dostrzegalny był bardzo intensywny sygnał należący do reszty **G4**, o wielkości stałej sprzężenia 6 Hz i świadczył o dominującej populacji konformacji C2'-endo tej reszty cukrowej¹⁹⁴. Ponadto obecność na widmie sygnałów H1'-H2' reszt **A5** i **G6** o stałej sprzężenia ~4 Hz wskazywała, że znajdują się one w równowadze konformacyjnej C2'-endo/C3'-endo. Dwa pozostałe sygnały widoczne w regionie H1'-H2' przypisałem do terminalnej reszty **C17**, oraz reszty **G9**.

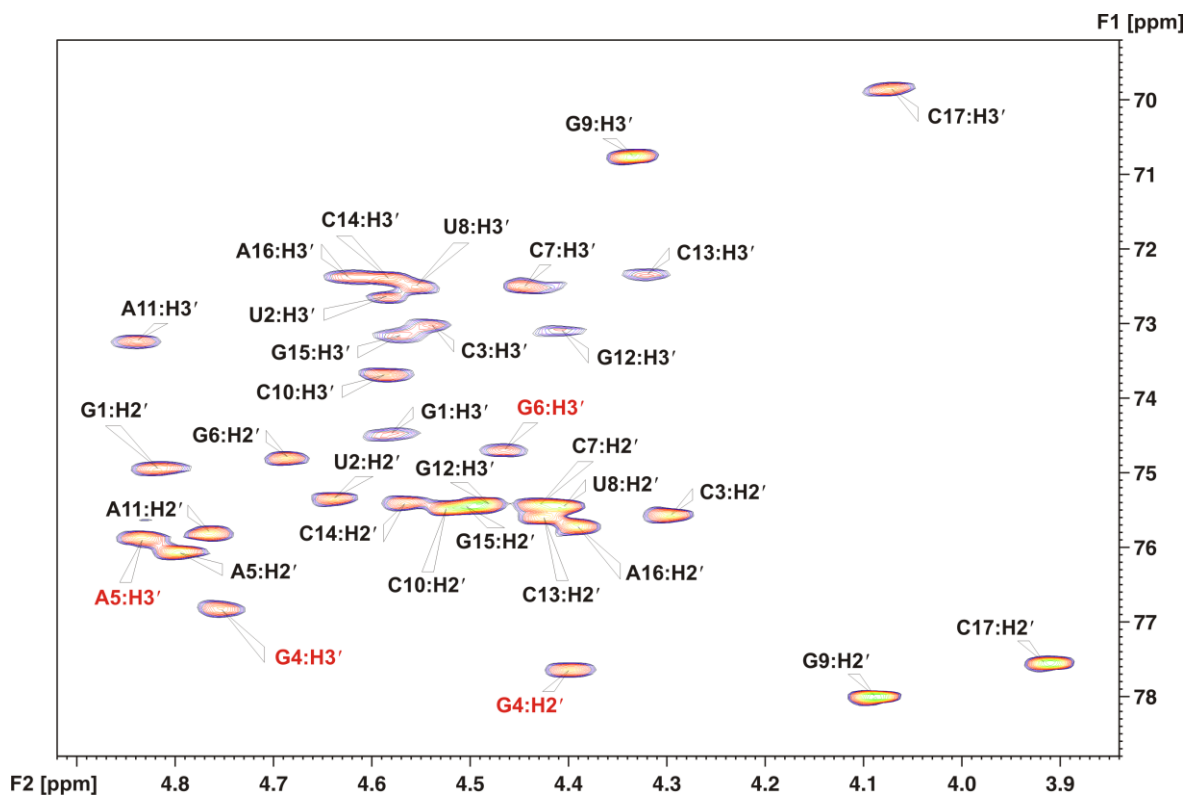
Dla pozostałych reszt nukleotydowych stwierdziłem typową dla formy A-RNA, konformację rybozy C3'-*endo*, czego dowodził brak sygnałów korelacyjnych pomiędzy protonami H1'-H2'. Również analiza widma ^{31}P NMR wskazała na występowanie pewnych zmian konformacyjnych w regionie wybrzuszenia. W widmie tym sygnał rezonansowy pochodzący od grupy fosforanowej znajdującej się pomiędzy resztami **G4** i **A5** jest słabiej ekranowany niż pozostałe sygnały, znajdujące się w typowym dla cząsteczek A-RNA zakresie (Rys. 78). Różnica ta może być spowodowana zmianą kątów α oraz ξ szkieletu fosfodiesterowego i związaną z tym próbą alokacji reszty adenozy w płaszczyźnie pary zasad **G4:C14**, lub wynikać z wpływu jednostki nukleotydowej **A5** na otoczenie chemiczne grupy fosforanowej.



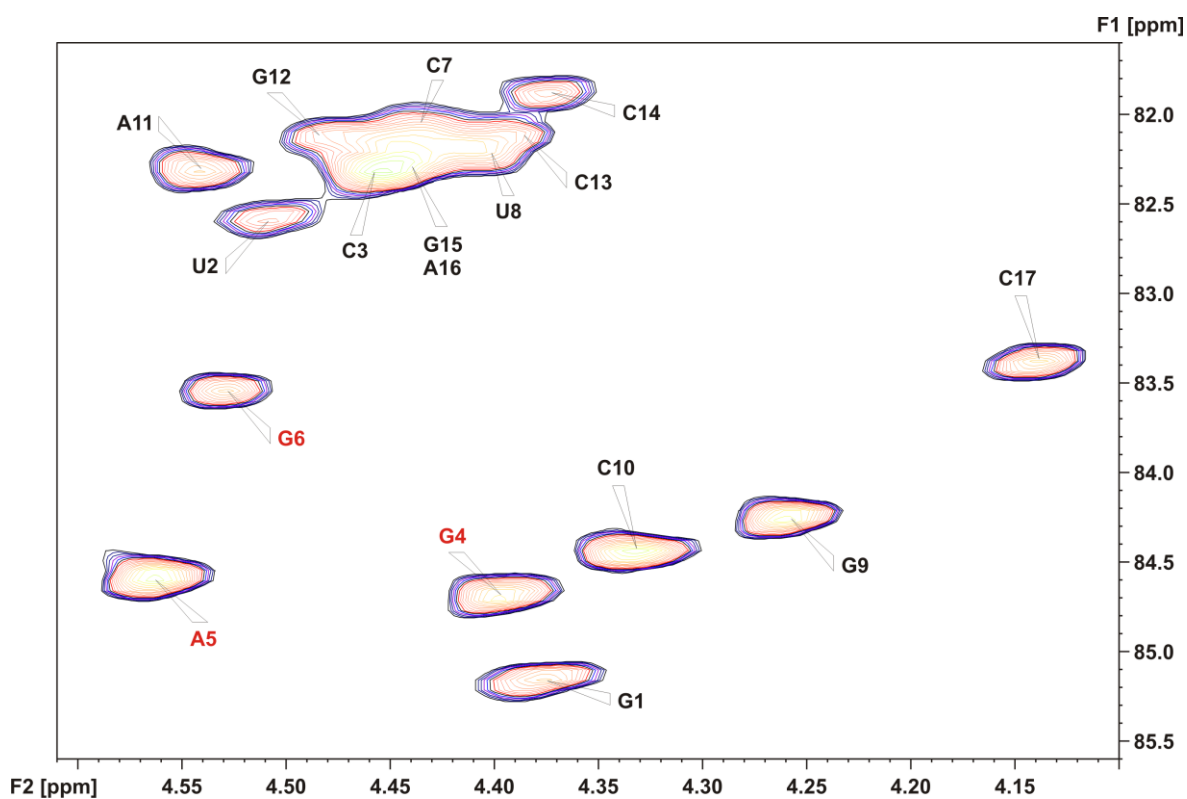
Rys. 78. Widmo ^{31}P NMR dupletu **V** w D_2O (243 MHz, 25°C), z zaznaczonym sygnałem rezonansowym **G4pA5**.

Analiza widm ^1H - ^{13}C HSQC wykazała, że sygnały pochodzące od atomów węgla C2', C3', C4' reszt **G4**, **A5**, **G6** są znacznie słabiej ekranowane niż odpowiadające im sygnały pozostałych reszt (Rys. 79-80). Dodatkowo zauważyłem stosunkowo małe różnice przesunięć chemicznych pomiędzy geminalnymi protonami H5' i H5'' reszt **A5** i **G6**, co również może wynikać ze zmienionej konformacji łańcucha fosfodiesterowego w regionie wybrzuszenia (Tabela 18, Rys. 81).

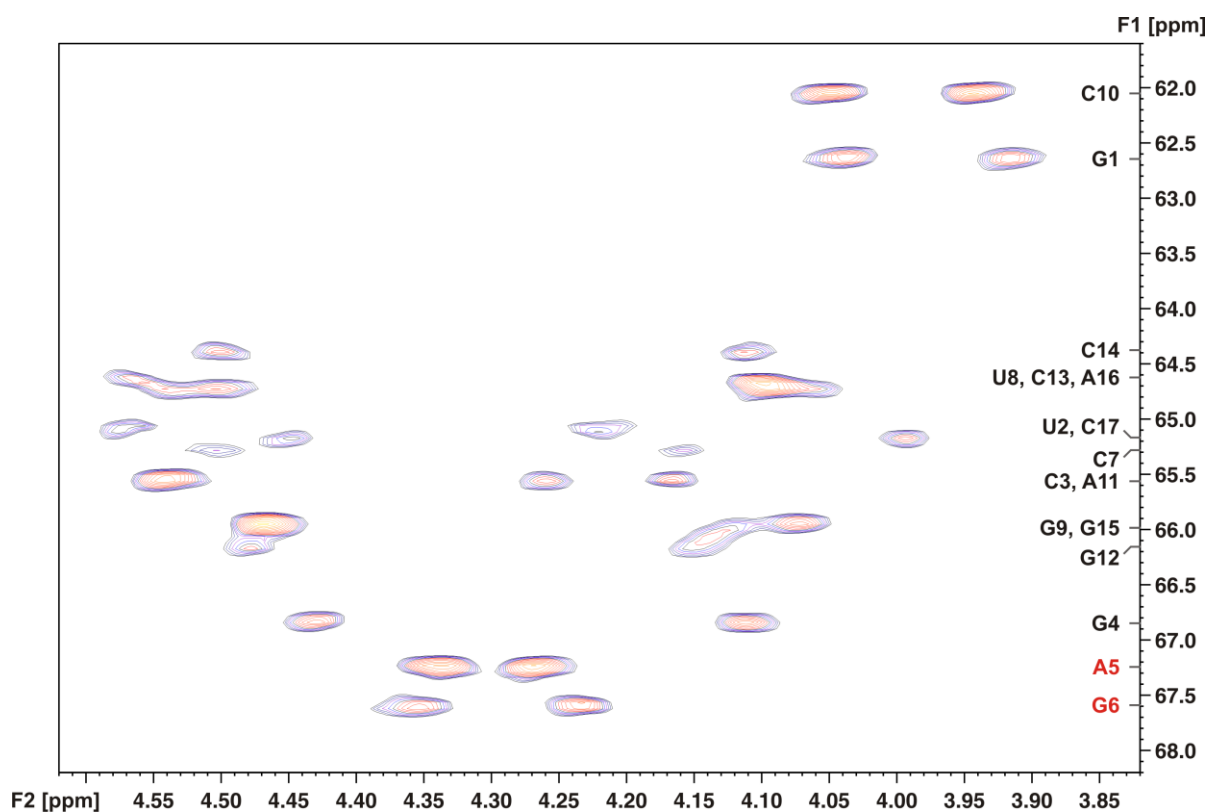
Wartości przesunięć chemicznych sygnałów ^1H , ^{13}C i ^{31}P NMR dupletu **V** zdeponowane zostały w banku BMRB pod identyfikatorem 15780.



Rys. 79. Widmo ^1H - ^{13}C HSQC dupletu V w D_2O (600 MHz, 25°C) – region występowania sygnałów korelacyjnych $\text{C}2'\text{-H}2'$ oraz $\text{C}3'\text{-H}3'$. Na osi F1 zaznaczona została skala przesunięć chemicznych jąder ^{13}C , a na osi F2 – ^1H .



Rys. 80. Widmo ^1H - ^{13}C HSQC dupletu V w D_2O (600 MHz, 25°C) – region występowania sygnałów korelacyjnych $\text{C}4'\text{-H}4'$. Na osi F1 zaznaczona została skala przesunięć chemicznych jąder ^{13}C , a na osi F2 – ^1H .



Rys. 81. Widmo ^1H - ^{13}C HSQC dupletu **V** w D_2O (600 MHz, 25°C) – region występowania sygnałów korelacyjnych $\text{C}5'\text{-H}5'/\text{H}5''$. Na osi F1 zaznaczona została skala przesunięć chemicznych jąder ^{13}C , a na osi F2 – ^1H .

Tabela 18. Wartości przesunięć chemicznych $\delta^1\text{H}$ (ppm) sygnałów dupletu **V** [D_2O , 25°C].

Res.	H6/H8	H2/H5	H1'	H2'	H3'	H4'	H5'/H5''	amino	imino
G1	8.05	–	5.74	4.81	4.57	4.37	4.03/3.91	* / *	*
U2	8.01	5.18	5.71	4.63	4.57	4.51	4.57/4.21	–	14.75
C3	7.85	5.74	5.60	4.29	4.55	4.45	4.50/4.15	6.88/8.28	–
G4	7.70	–	5.82	4.39	4.75	4.38	4.43/4.10	* / *	12.52
A5	8.29	8.15	6.13	4.79	4.83	4.56	4.34/4.26	* / *	–
G6	7.73	–	5.56	4.68	4.47	4.53	4.35/4.23	* / *	13.03
C7	7.69	5.18	5.56	4.44	4.44	4.43	4.53/4.16	6.80/8.48	–
U8	7.81	5.40	5.57	4.42	4.55	4.41	4.54/4.09	–	13.81
G9	7.75	–	5.89	4.08	4.33	4.26	4.47/4.07	* / *	*
C10	8.07	5.99	5.52	4.52	4.58	4.33	4.04/3.94	7.03/8.30	–
A11	8.23	7.32	5.99	4.76	4.84	4.54	4.55/4.25	* / *	–
G12	7.30	–	5.63	4.48	4.41	4.48	4.47/4.14	* / *	13.51
C13	7.37	5.22	5.47	4.43	4.32	4.38	4.50/4.05	6.86/8.21	–
C14	7.86	5.62	5.51	4.57	4.58	4.37	4.49/4.10	6.88/8.39	–
G15	7.56	–	5.53	4.49	4.57	4.44	4.46/4.12	* / *	12.47
A16	7.83	7.86	5.91	4.40	4.62	4.44	4.57/4.09	* / *	–
C17	7.33	5.20	5.66	3.90	4.07	4.14	4.45/3.99	7.04/8.14	–

* Sygnały, które nie zostały przypisane.

Tabela 19. Wartości przesunięć chemicznych δ (ppm) sygnałów ^{13}C oraz ^{31}P NMR dupleksu V [D_2O , 25°C].

Res.	C6/C8	C2/C5	C1'	C2'	C3'	C4'	C5'		^{31}P
G1	139.02	–	92.59	74.94	74.49	85.16	62.64		–
U2	142.74	102.70	93.95	75.35	72.65	82.58	65.10		-4.44
C3	141.29	98.24	94.50	75.58	73.02	82.34	65.28		-4.05
G4	137.44	–	89.30	77.64	76.82	84.68	66.83		-4.32
A5	141.96	155.35	90.78	76.06	75.87	84.58	67.23		-3.36
G6	137.45	–	92.25	74.80	74.70	83.54	67.60		-3.88
C7	141.73	96.97	94.43	75.43	72.50	82.03	65.55		-4.41
U8	141.55	103.83	93.82	75.45	72.51	82.22	64.73		-4.26
G9	137.65	–	91.04	78.00	70.76	84.24	65.95		-4.03
C10	143.05	98.85	93.96	75.47	73.69	84.44	62.04		–
A11	140.07	153.02	92.45	75.82	73.24	82.31	65.56		-3.89
G12	135.69	–	92.63	75.42	73.10	82.12	66.17		-3.95
C13	140.47	97.63	94.35	75.59	72.34	82.10	64.73		-4.28
C14	140.98	98.43	93.69	75.40	72.40	81.87	64.39		-4.45
G15	136.29	–	92.72	75.46	73.16	82.17*	65.98		-3.89
A16	139.37	154.29	93.07	75.72	72.37	82.28*	64.62		-4.26
C17	141.12	97.72	92.67	77.55	69.85	83.38	65.18		-4.16

* Sygnały, które nie zostały jednoznacznie przypisane.

3.1.2. Analiza konformacyjna. Wyznaczenie wiązań strukturalnych (V)

Wiązy na odległości między protonami wyznaczyłem na podstawie pomiaru wielkości efektu NOE sygnałów w widmach 2D NOESY ($\tau_m = 150$ ms) metodą ISPA¹⁰⁰. W oparciu o analizę sygnałów widocznych tylko w widmach 2D NOESY wykonanych z czasem mieszania $\tau_m = 400$ ms wprowadziłem dodatkowe wiązy z zakresem 4.0 – 7.0 Å. Analiza sygnałów wymienialnych protonów w widmach 2D NOESY (90% $\text{H}_2\text{O}/10\%$ D_2O) pozwoliła dodać kolejne restrykcje (1.8 – 6.0 Å) oraz wyprowadzić wiązy na parowanie zasad typu Watsona-Cricka i planarność. Zawiązywanie się par typu Watsona-Cricka obserwowałem dla wszystkich par zasad dupleksu i określiłem na podstawie charakterystycznych wartości przesunięć chemicznych protonów iminowych i aminowych oraz analizy sygnałów NOE pomiędzy protonami **G**:H1-**C**:NH2 i **A**:H2-**U**:H3.

Wiązy na kąty torsyjne pierścieni cukrowych oraz szkieletu fosfodiesterowego zostały otrzymane drogą analizy sprzężeń skalarnych $^3J_{\text{HH}}$ i $^3J_{\text{PH}}$ w widmach DQF-COSY odsprzęganych częstotliwością ^{31}P oraz heterojądrowych widmach korelacyjnych ^1H - ^{31}P HSQC. Konformacja większości pierścieni rybozy dupleksu jest typowa dla formy A-RNA ($\text{C3}'\text{-endo}$), czego dowodem jest brak sygnałów korelacyjnych H1'-H2' w widmach DQF-COSY. Jedyne obserwowane sygnały w omawianym regionie widma należą do guanozyny **G4** (o stałej sprzężenia 6 Hz), reszty **A5** (4.2 Hz) i **G6** (3.4 Hz), oraz terminalnych

reszt **G9** (3.6 Hz) i **C17** (4.6 Hz). W wyniku tych obserwacji wyznaczyłem więzy na kąty torsyjne pierścieni rybozy. Dla reszt cukrowych, których sygnały H1'-H2' nie były obserwowane w widmie zadałem więzy na konformację C3'-*endo*, dla reszty **G4** – więzy na konformację C2'-*endo* (z zakresem tolerancji $\pm 30^\circ$), a dla pozostałych wprowadziłem swobodne więzy, umożliwiające przyjęcie konformacji C2'-*endo* lub C3'-*endo*.

Informacje o zakresach kątów glikozydowych otrzymałem z pomiaru objętości sygnałów korelacyjnych H2/H6/H8-H1'/H2'/H3' w widmach 2D NOESY wykonanych z czasem mieszania $\tau_m = 150$ ms. Analiza widm wykazała obecność jedynie sygnałów charakterystycznych dla konformacji *anti*, dlatego dla wszystkich reszt nukleotydowych wprowadziłem więzy na kąty χ w zakresie $158 \pm 30^\circ$.

Na podstawie analizy przesunięć chemicznych linii rezonansowych ^{31}P NMR, zadałem podczas obliczeń więzy na kąty torsyjne α i ζ wykluczające konformację *trans* ($0 \pm 120^\circ$) wszystkich reszt nukleotydowych z wyjątkiem reszty **G4** (kąt ζ) oraz **A5** (α), dla których sygnał **G4pA5** jest wyraźnie przesunięty w kierunku wyższych częstotliwości w stosunku do pozostałych sygnałów. Na kąty te nie zadawałem żadnych ograniczeń.

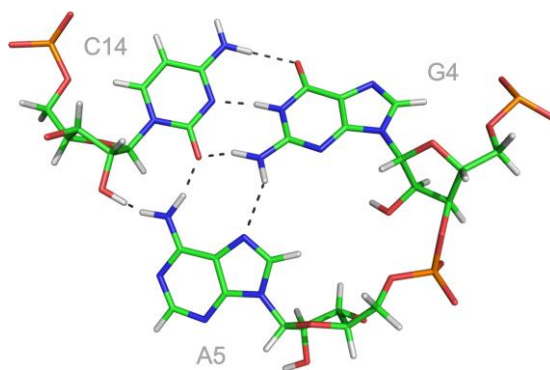
Analiza sprzężeń $^3J_{\text{PH}}$ w widmach ^1H - ^{31}P HSQC dostarczyła informacji o wartościach kątów β oraz ε . Więzy na kąty β dla wszystkich reszt ograniczyłem do wartości $178 \pm 30^\circ$ na podstawie obserwacji jedynie słabych sekwencyjnych sprzężeń między jądrami ^{31}P i protonami H5'/H5". Wartości kątów ε określiłem na podstawie analizy sprzężeń $^3J_{\text{PH3'}}$. Dla większości reszt nukleotydowych przyjąłem zakres $-153 \pm 30^\circ$ oprócz reszty cytydyny **C10**, dla której wartość sprzężenia nie można było analizować z powodu nakładania się sygnałów. Dla tej ostatniej reszty wprowadziłem więzy z zakresem błędu $120 \pm 120^\circ$. Z uwagi na spodziewaną w regionie wybrzuszenia dynamikę, podczas obliczeń zadałem szerszy zakres na kąty ε reszt **G4** i **A5**, obejmujący konformację *gauche*⁻ ($-153 \pm 55^\circ$).

Na kąty torsyjne γ szkieletu fosforocukrowego wprowadziłem więzy o zakresie $54 \pm 30^\circ$ w oparciu o analizę sprzężeń H4'-H5'/H5" wyznaczonych z widma DQF-COSY. Ze względu na niepewność określenia wartości kątów γ z pomiaru sprzężeń $^3J_{\text{H4'H5'}}$ i $^3J_{\text{H4'H5"}}$ nie nałożyłem więzów na te kąty dla reszt **A5** i **G6**. Również na kąty α , β i ξ w regionie wybrzuszenia nie nałożyłem restrykcji.

3.1.3. Restryktywna dynamika molekularna (V)

Trzeciorzędową strukturę dupleksu **V** wyznaczyłem za pomocą programu Xplor-NIH^{205,206}, przy wykorzystaniu metody dynamiki molekularnej w przestrzeni kątów torsyjnych¹⁵² (TAMD). Punktem wyjścia dla obliczeń było 50 liniowych struktur przypadkowych o prawidłowej geometrii. Więzy wykorzystane w obliczeniach podałem w tabeli na rysunku 83. Początkowo podczas obliczeń otrzymywałem struktury, w których reszta adenozyiny wystawała na zewnątrz helisy. Chociaż w strukturach tych nie obserwowałem żadnych pogwałceń więzów odległościowych, jednak ich analiza pokazała, że odległości między niektórymi atomami wodoru były tak niewielkie, że powinienem obserwować pomiędzy nimi efekt NOE. Brak tych sygnałów upoważnił mnie do zastosowania więzów typu uNOE (z zakresem 5 – 20 Å). Otrzymane z użyciem tych więzów struktury charakteryzowały się dużo lepszą zbieżnością. W strukturach tych wybrzuszona reszta adenozyiny **A5** umiejscawiała się w małej bruzdzie i znajdowała się, w przybliżeniu, w płaszczyźnie z sąsiadującą od strony 3' resztą **G4**.

Poszukiwanie czynników, które byłyby odpowiedzialne za taką nietypową konformację niesparowanej reszty doprowadziło mnie do zaproponowania struktury, w której reszta **A5** tworzy tak zwaną platformę dinukleotydową z resztą **G4**. W takiej aranżacji, w regionie wybrzuszenia powstaje trójka oddziałujących zasad, w której para **C14:G4** zawiązuje wiązania wodorowe typu Watsona-Cricka, a reszta **A5** znajduje się w tej samej płaszczyźnie tworząc sieć wiązań wodorowych (Rys. 82).



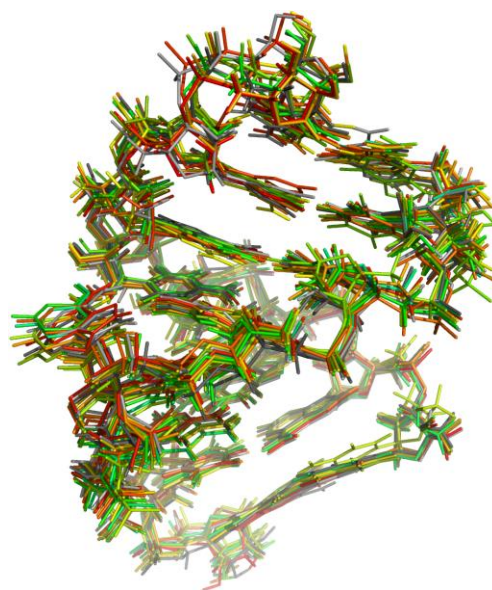
Rys. 82. Trójka oddziałujących zasad w strukturze dupleksu **V** z zaznaczonymi wiązaniami wodorowymi.

W następnym etapie obliczeń wprowadziłem więzy symulujące obecność dodatkowych wiązań wodorowych w platformie. Więzy te dobrałem tak, aby ułatwiały cząsteczce przyjęcie odpowiedniej konformacji, lecz jej nie narzucały. Dla każdej z par **G4-A5** i **A5-C14**

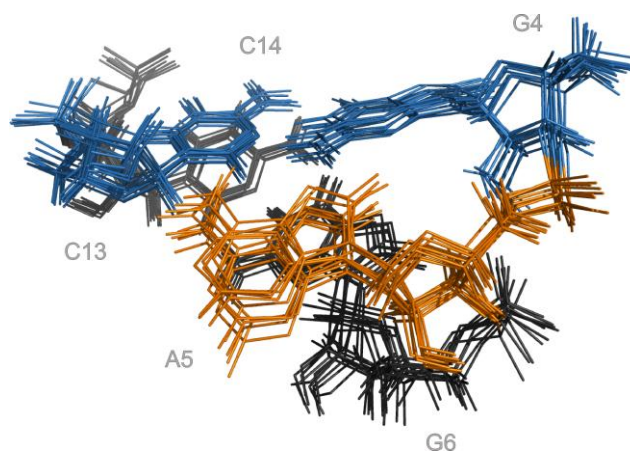
zdefiniowałem dodatkowe, pojedyncze więzy na odległości między atomami G4:N2-A5:N7 i A5:N6-14:O2 o zakresie $2.9 \pm 0.3 \text{ \AA}$. Ponadto, już podczas etapu schładzania w dynamice TAMD wprowadziłem więzy na planarność pomiędzy zasadami w platformie (**G4-A5** i **A5-C14**) oraz na sąsiadujące pary zasad (**G4:C14** i **G6:C13**), z typową dla tych więzyw stałą siłową równą $20 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{\AA}^{-2}$. W trakcie etapu udokładnienia zmniejszyłem o połowę wartość stałej siłowej na planarność zasad **G4-A5** i **A5-C14** oraz nie wprowadziłem potencjałów DELPHIC²⁰⁸ na resztę **A5**. W wyniku obliczeń uzyskałem 38 struktur zgodnych z danymi eksperymentalnymi, spośród których do dalszej analizy wybrałem 10 charakteryzujących się najniższą energią całkowitą. Średnia wartość odchylenia standardowego mierzona dla wszystkich ciężkich atomów końcowej rodziny struktur wynosi $0.71 \pm 0.17 \text{ \AA}$, natomiast dla atomów regionu wybrzuszenia $0.39 \pm 0.11 \text{ \AA}$. Nałożenie 10 struktur o najniższej energii wraz ze statystyką więzyw przedstawia rysunek 83. Region wybrzuszenia ukazano na rysunku 84.

Statystyka więzyw wykorzystanych w obliczeniach.

Całkowita liczba więzyw NOE:	288
intranukleotydowe	180
internukleotydowe	108
Więzy typu uNOE	8
Więzy na wiązania wodorowe	50
Więzy na planarność	10
Więzy na kąty dwuścienne:	171
szkieletu fosfodiesterowego	69
rybozy	85
wiązania glikozydowego	17
Średnia liczba więzyw NOE przypadających na resztę nukleotydową	16.94
Średnia liczba więzyw NOE oraz więzyw na kąty dwuścienne przypadających na resztę nukleotydową	27.00

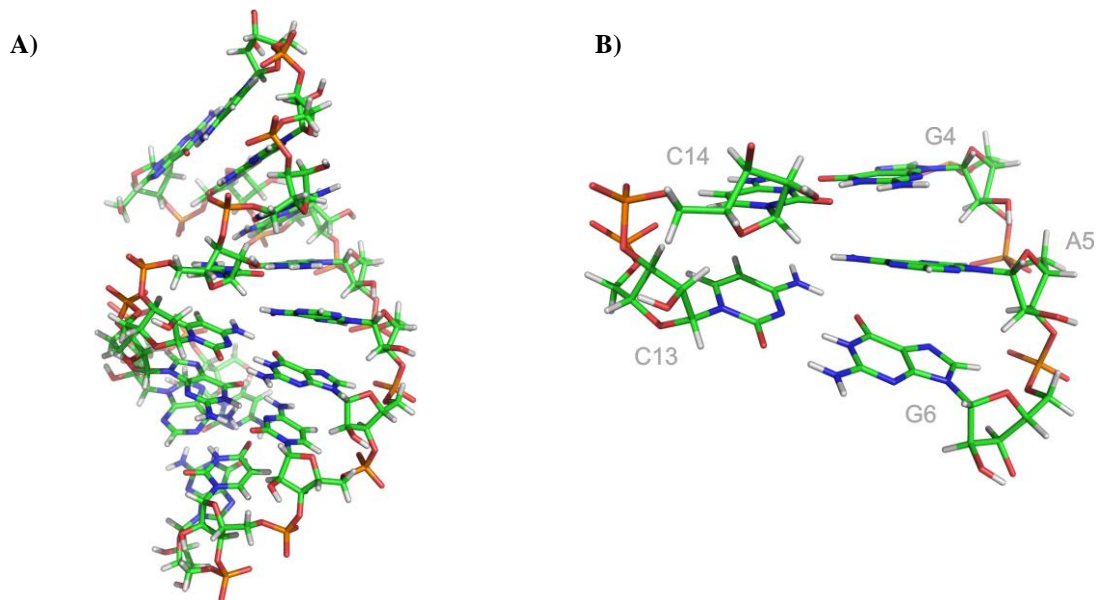


Rys. 83. Superpozycja rodziny 10 struktur przestrzeni konformacyjnej dupletu **V**.



Rys. 84. Region wybrzuszenia dupleksu **V** dla 10 struktur o najniższej energii. Widok od strony małej bruzdy. Kolorem pomarańczowym wyróżniona została reszta adenozyiny **A5**, kolorem niebieskim – para zasad **G4:C14**, natomiast czarnym kolorem zaznaczona została para zasad **G6:C13**.

Warto podkreślić, jak istotne jest aby dokładnie przeanalizować widma i uwzględnić otrzymane informacje w obliczeniach. W przypadku obliczeń, podczas których nie uwzględniłem trzech dodatkowych kontaktów NOE (**G6:H8-G4:H1'/H2'**, oraz **G4:H3-G6:H3**) otrzymałem struktury, których konformacja była bardzo zbliżona do obserwowanej dla dupleksu **II** (Rys. 85).



Rys. 85. Struktura dupleksu **V** (A) oraz jej region wybrzuszenia (B), otrzymana w wyniku obliczeń, w których nie uwzględnione zostały kontakty NOE pomiędzy resztami **G4**, **A5** i **G6**.

Niestety, na podstawie dostępnych danych eksperymentalnych nie mogłem z całą pewnością potwierdzić obecności wiązań wodorowych pomiędzy resztą **A5** a parą **G4:C14**.

W związku z tym dr Ł. Bielecki z Pracowni Chemii Strukturalnej Kwasów Nukleinowych IChB PAN przeprowadził obliczenia stosując metody symulacji dynamiki molekularnej bez eksperymentalnych więzów strukturalnych. Równolegle przeprowadzone zostały dwie 20 ns symulacje dynamiki molekularnej, z których każda wychodziła z tej samej (otrzymanej z danych NMR) struktury początkowej. Początkowy model zneutralizowany został przez 15 jonów Na^+ umieszczonych w pudle (ang. *box*) o okresowych warunkach brzegowych o wymiarach $57 \text{ \AA} \times 54 \text{ \AA} \times 49 \text{ \AA}$. Przestrzeń ta wypełniona była 3931 cząsteczkami wody (model TIP3P²¹⁷) tworzącymi warstwę o grubości 12 \AA . Symulacja przeprowadzona została w stałej temperaturze 300 K i ciśnieniu 1 atm za pomocą programu AMBER 8²¹⁸. Należy nadmienić, że na skutek losowego rozkładu prędkości początkowych atomów, dla każdej z trajektorii, oraz samej specyfiki procesu obliczeniowego, wyniki przeprowadzonych symulacji za każdym razem prowadziły do nieco odmiennych trajektorii, które jednak z punktu widzenia obliczeń dynamiki molekularnej należy traktować jako równoprawne. W pierwszej symulacji struktura platformy była stabilna przez cały okres symulacji. W trakcie drugiej symulacji struktura platformy utrzymywała się przez 14 ns, a pod koniec symulacji wiązania wodorowe zostały zerwane. Reszty **G4** i **A5** przemieściły się i zawiązały się między nimi oddziaływania warstwowe. Obie symulacje udowodniły, że zaproponowana przeze mnie na podstawie danych NMR struktura platformy dinukleotydu, stanowiącej część trójki oddziałujących zasad jest układem stabilnym. Końcowe struktury NMR zamieszczone zostały w rejestrze PDB (*Protein Data Bank*) pod identyfikatorem 2k3z.

3.1.4. Analiza przestrzeni konformacyjnej rodziny struktur (V)

Kończącą analizę parametrów strukturalnych dla rodziny 10 struktur o najniższej energii otrzymanych z rMD przeprowadziłem za pomocą programu Curves^{30,31}, a uśrednione wartości kątów torsyjnych i parametrów pofałdowania pierścieni cukrowych wraz z odchyleniami standardowymi zamieściłem w tabeli 20.

Uśrednione wartości kątów torsyjnych dla całego dupleksu nie odbiegają od tych spotykanych dla formy A-RNA, a odchylenia standardowe są niewielkie. Małe różnice odchylen standardowych wskazują na dużą stabilność struktury.

Tabela 20. Średnie wartości kątów torsyjnych łańcuchów fosfodiesterowych (α , β , γ , δ , ϵ , ζ), kąta glikozydowego (χ) oraz parametrów opisujących konformację pierścieni cukrowych (P, v_{max}) obliczonych dla dupletu V. W nawiasach podane zostały wartości odchylenia standardowego.

Reszta	α	β	γ	δ	ϵ	ζ	χ	P	v_{max}
G1	–	–	63 (12)	84 (1)	197 (7)	300 (7)	194 (12)	17 (8)	38 (1)
U2	281 (15)	182 (13)	61 (12)	84 (3)	210 (4)	294 (5)	202 (3)	22 (7)	37 (2)
C3	295 (14)	161 (8)	63 (19)	78 (2)	195 (7)	283 (2)	196 (4)	36 (2)	42 (2)
G4	292 (6)	179 (6)	74 (8)	137 (5)	186 (5)	246 (5)	227 (5)	156 (8)	37 (1)
A5	245 (15)	219 (3)	15 (10)	75 (2)	220 (9)	289 (19)	215 (14)	43 (5)	43 (1)
G6	317 (24)	137 (17)	78 (13)	78 (1)	208 (13)	275 (6)	180 (5)	28 (8)	42 (1)
C7	294 (10)	171 (5)	59 (6)	83 (1)	200 (4)	293 (4)	195 (5)	11 (2)	40 (0)
U8	298 (3)	195 (3)	40 (3)	86 (1)	219 (7)	285 (6)	209 (7)	10 (2)	37 (1)
G9	301 (4)	168 (9)	49 (10)	82 (2)	–	–	219 (4)	27 (7)	38 (1)
C10	–	–	38 (13)	88 (1)	207 (3)	287 (3)	206 (7)	4 (3)	37 (1)
A11	295 (5)	179 (12)	43 (8)	84 (3)	205 (14)	296 (3)	215 (2)	10 (6)	40 (2)
G12	299 (3)	173 (9)	50 (7)	79 (1)	206 (4)	287 (4)	203 (2)	26 (1)	41 (1)
C13	297 (8)	163 (8)	63 (12)	81 (3)	199 (5)	298 (4)	204 (5)	22 (5)	40 (2)
C14	259 (6)	206 (5)	57 (3)	83 (1)	219 (5)	288 (5)	214 (2)	11 (1)	39 (1)
G15	304 (7)	158 (4)	54 (8)	78 (1)	200 (7)	280 (7)	199 (3)	29 (3)	42 (1)
A16	295 (19)	175 (12)	53 (13)	86 (2)	201 (4)	290 (11)	207 (4)	12 (6)	38 (1)
C17	287 (14)	181 (23)	55 (7)	86 (2)	–	–	213 (4)	13 (6)	37 (1)
Średnia:	292 (12)	176 (13)	55 (9)	83 (3)	205 (8)	289 (7)	205 (11)	19 (9)	39 (2)
A-RNA ^{209,210}	294	186	49	88	202	294	202	18	39

Kąt fazowy pseudorotacji guanozyny **G4** ($156 \pm 8^\circ$) odbiega wyraźnie od pozostałych reszt. Cukier tej jednostki przyjmuje nietypową konformację *C2'-endo*, co przejawia się również zmianą kąta δ ($137 \pm 5^\circ$). Zmiana konformacji tej reszty powoduje rozciągnięcie łańcucha i zwiększenie odległości między grupami fosforanowymi, umożliwiając tym samym przyjęcie odpowiedniej orientacji zasadzie reszty nukleotydowej **A5**. Szczegółowa analiza pozostałych kątów dla poszczególnych reszt wykazuje pewne odstępstwa od wartości średnich. Dla wszystkich analizowanych struktur wartości kątów α i γ reszty **A5** znacznie różnią się od średnich wartości obserwowanych dla całego dupletu i wynoszą odpowiednio $245 \pm 15^\circ$ i $15 \pm 10^\circ$. Nietypowa alokacja reszty **A5** wymusza także zmianę kąta torsyjnego β reszty **A5** ($\sim 219 \pm 3^\circ$), jak również niektórych kątów torsyjnych reszt sąsiadujących z wybrzuszeniem. Pewne różnice zaobserwowałem w przypadku kątów β reszty **G6** oraz ζ reszty **G4**. Kąty te we wszystkich analizowanych strukturach są bardzo podobne i przyjmują odpowiednio wartości $137 \pm 5^\circ$ (β) oraz $246 \pm 5^\circ$ (ζ). Mniejsze odchylenia kątów torsyjnych od wartości typowych dla struktur A-RNA zaobserwowałem także dla kąta γ reszt **G4** ($74 \pm 8^\circ$) i **G6** ($78 \pm 13^\circ$), jak również dla kąta α reszty **C14** ($259 \pm 6^\circ$), uczestniczącej w tworzeniu trójki zasad. Opisane zmiany obserwowane są tylko dla samej trójki zasad **C14:G4-A5** oraz pary zasad **G6:C13** z końca 3'. Dla pozostałych reszt nie zanotowałem znaczących różnic

w stosunku do wartości kątów typowych dla formy kanonicznej, co oznacza, że fragmenty te przyjmują typową konformację A-RNA. Cecha ta dodatkowo uwidacznia się w przypadku analizy parametrów helikalnych, które nie odbiegają od wartości charakterystycznych dla formy kanonicznej (Tabela 21).

Tabela 21. Uśrednione wartości wybranych parametrów helikalnych wraz z odchyleniami standardowymi.

Para zasad	<i>x-Displacement</i> dx (Å)	<i>y-Displacement</i> dy (Å)	<i>Inclination</i> η (°)	<i>Propeller twist</i> ω (°)
G1-C17	-4.0 (0.9)	-1.0 (0.3)	12 (6)	-12 (8)
U2-A16	-4.1 (0.6)	-0.6 (0.4)	12 (7)	-16 (7)
C3-G15	-3.6 (0.8)	-0.7 (0.4)	12 (6)	-9 (8)
G4-C14	-4.6 (0.6)	-0.9 (0.4)	18 (7)	-18 (4)
G6-C13	-4.4 (0.5)	0.2 (0.3)	13 (4)	-2 (5)
C7-G12	-4.6 (0.8)	0.2 (0.4)	16 (4)	-3 (6)
U8-A11	-4.9 (0.4)	-0.2 (0.4)	20 (3)	-9 (7)
G9-C10	-3.9 (0.9)	0.0 (0.5)	25 (4)	-3 (7)
Średnia:	-4.3 (0.4)	-0.4 (0.5)	16 (5)	-9 (6)
A-RNA ¹⁶¹ :	-5.3	0.0	16	-14

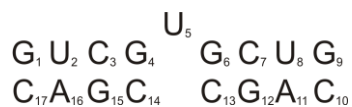
Sekwencja par zasad	<i>Shift</i> D _x (Å)	<i>Rise</i> D _z (Å)	<i>Twist</i> Ω (°)	<i>Roll</i> ρ (°)
G1-U2	0.0 (0.5)	2.8 (0.3)	36 (4)	-1 (4)
U2-C3	0.5 (0.4)	2.8 (0.2)	33 (2)	-1 (3)
C3-G4	-1.0 (0.3)	3.0 (0.4)	30 (2)	9 (4)
G6-C7	-0.2 (0.3)	2.8 (0.2)	34 (2)	-12 (5)
C7-U8	-0.3 (0.4)	2.9 (0.1)	31 (2)	5 (3)
U8-G9	0.9 (0.5)	2.1 (0.2)	29 (2)	5 (3)
Średnia:	0.0 (0.7)	2.7 (0.3)	32 (3)	1 (7)
A-RNA ¹⁶¹ :	0.0	2.6	33	0

3.2. Badania strukturalne dupleksu VI

3.2.1. Analiza strukturalna w oparciu o widma NMR (VI)

Powszechnie uważa się, że w przeciwieństwie do reszt purynowych, pojedyncze wybrzuszenia pirymidynowe charakteryzuje większa swoboda konformacyjna i są one zazwyczaj zorientowane w taki sposób, że wystają na zewnątrz dupleksu. Aby sprawdzić, jaki wpływ na strukturę całego dupleksu oraz na konformację samej reszty będzie miało zastąpienie wybrzuszenia adenozynowego resztą urydyny, przeprowadziłem analizę NMR cząsteczki o sekwencji przedstawionej na rysunku 86. Sekwencja tej cząsteczki różni się od

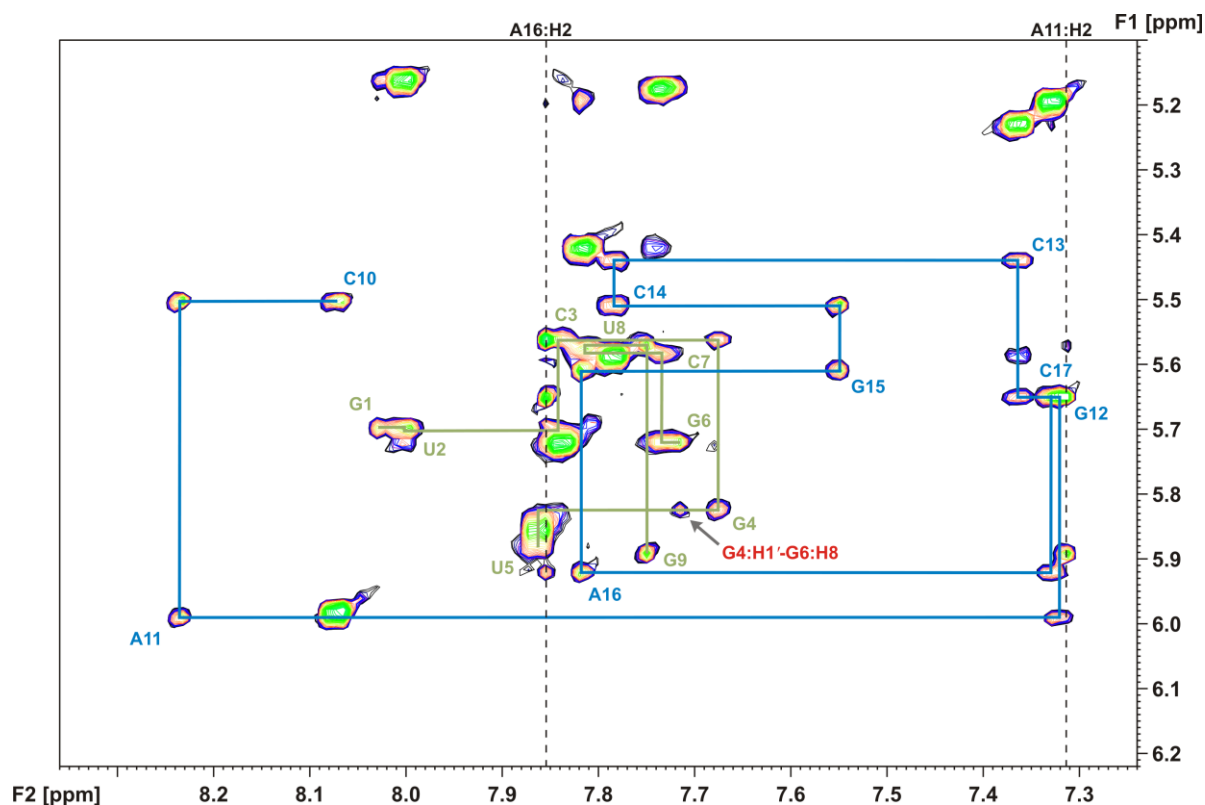
sekwencji dupleksu **V** jedynie typem wybrzuszonej reszty. Badania strukturalne wykonałem w takich samych warunkach, jak w przypadku struktury **V**.



Rys. 86. Struktura drugorzędowa dupleksu **VI**.

Kompletny zestaw przypisań sygnałów niewymienialnych protonów otrzymałem na podstawie analizy dwuwymiarowych widm NMR 2D NOESY, DQF-COSY oraz TOCSY za pomocą metod opisanych uprzednio (rozdział IV.2.1.1). Zastosowanie heterojądrowych technik NMR, takich jak ^1H - ^{13}C HSQC i ^1H - ^{31}P HSQC pozwoliło mi natomiast na przypisanie sygnałów ^{13}C i ^{31}P NMR. Otrzymane wartości przesunięć chemicznych ^1H NMR podane zostały w tabeli 22, natomiast przesunięcia chemiczne wyznaczone dla jąder ^{13}C i ^{31}P zebrałem w tabeli 23.

Układ sygnałów rezonansowych w widmach obu dupleksów (**V** i **VI**) różni się nieznacznie. Jednakże w widmach 2D NOESY wykonanych w D_2O pojawiło się kilka sygnałów wskazujących na zdecydowanie bardziej dynamiczny charakter struktury **VI**, w porównaniu do dupleksu z niesparowaną resztą adeniny. Dla protonów H5 i H1' reszty **U5** zaobserwowałem poszerzenie sygnałów, co wskazywało na koalescencję linii rezonansowych związaną prawdopodobnie z uśrednieniem różnych konformacji wybrzuszonej reszty. Ponadto, w widmie 2D NOESY możliwe było wyznaczenie nieprzerwanej ścieżki sekwencyjnej H6/H8_n-H1'_n-H6/H8_{n+1} jedynie dla dolnej nici. W przypadku nici zawierającej wybrzuszony urydyny ciągłość ścieżki została zaburzona pomiędzy resztami **-G4-U5-G6-**, co pokazane zostało na rysunku 87. Z drugiej strony, podobnie jak w poprzednim przypadku, obserwowałem sygnał korelacyjny pomiędzy protonem H1' reszty **G4**, i protonem H8 reszty **G6**, co wskazywało na dość bliską odległość między tymi resztami. W innych regionach widma także obserwowałem mniejszą liczbę sygnałów korelacyjnych między protonami wybrzuszonej reszty, a protonami sąsiednich reszt guanozyny. W widmie 2D NOESY nie zaobserwowałem żadnych oddziaływań NOE pomiędzy protonem H5 reszty **U5**, a innymi resztami własnej nici czy nici komplementarnej. Stosunkowo słabe intensywności sygnałów NOE protonu **U5:H6** do protonów H2' i H3' reszty **G4** również wskazywały na słabsze oddziaływania między tymi resztami. Pomędzy resztami **U5** i **G6** zarejestrowałem jedynie słaby sygnał NOE protonu **U5:H3'** do **G6:H8**.



Rys. 87. Region sygnałów H2/H6/H8-H5/H1' w widmie 2D NOESY ($\tau_m = 400$ ms) dupletu **VI** w D₂O (600 MHz, 25°C). Na widmie zaznaczona została sekwencyjna ścieżka H6/H8_(i)-H1'_(i)-H6/H8_(i+1) – kolorem zielonym dla górnej nici, natomiast niebieskim – dla dolnej nici. Przerywane linie wskazują położenie sygnałów H2 reszt adenozyliny.

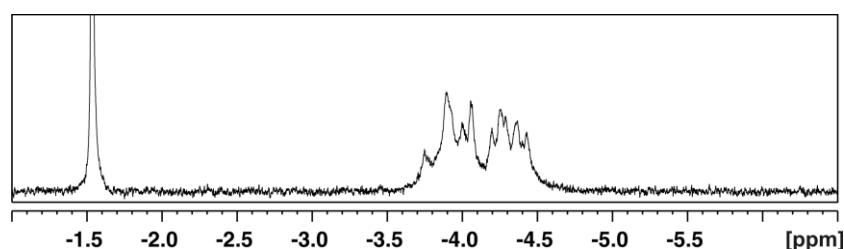
Analiza widma DQF-COSY wykazała, że podobnie jak w przypadku omawianej wcześniej struktury **V**, dla reszty cukrowej jednostki nukleotydowej **G4** zaobserwować można silny sygnał korelacyjny H1'-H2', odpowiadający stałej sprzężenia rzędu 6 – 8 Hz. Również dla reszt **G6** i **U5** oraz terminalnych reszt **G9** i **C17** zaobserwowałem w widmie sygnały H1'-H2', jednak zdecydowanie słabsze niż w przypadku reszty **G4**. Dane te wskazywały, że reszta **G4** przyjmuje formę C2'-endo, natomiast pierścienie cukrowe reszt **U5**, **G6**, **G9** i **C17** występują w równowadze pomiędzy formą C2'-endo i C3'-endo. Pozostałe reszty przyjmują konformację C3'-endo, o czym świadczy brak sygnałów H1'-H2' w widmie DQF COSY.

Sygnały protonów wymienialnych w widmie 2D NOESY wykonanym w mieszaninie 90% H₂O/10% D₂O w 10°C przypisałem w oparciu o kontakty tych protonów z protonami wyznaczonymi ze ścieżki NOE, H6/H8_n-H1'_n-H6/H8_{n+1}, analogicznie jak poprzednio (rozdział IV.2.1.1.2). Przesunięcia chemiczne protonów iminowych reszt urydyny **U2** (14.72 ppm) i **U8** (13.83 ppm) oraz guanozyny (12.55 – 13.57 ppm) przyjmują wartości typowe dla kanonicznych par zasad. Obserwowane korelacje tych protonów z protonami reszt komplementarnych potwierdziły zawiązywanie się par zasad typu Watsona-Cricka.

W żadnym z widm nie zaobserwowałem natomiast sygnału protonu N3-H3 urydyny **U5**, co wynikać może z szybkiej wymiany tego protonu z cząsteczkami wody. Analiza sygnałów korelacyjnych w regionie iminowo-iminowym widma 2D NOESY wykazała obecność sygnału pomiędzy protonami N1-H1 sąsiadujących z wybrzuszeniem reszt **G4** i **G6**. Obserwacja sekwencyjnych kontaktów NOE pomiędzy protonami iminowymi zasad heterocyklicznych **G15**, **G4**, **G6** i **G12** wskazywała, że zachowana została ciągłość oddziaływań warstwowych pomiędzy kolejnymi parami zasad **G15:C3**, **G4:C14**, **G6:C13** i **G12:C7**.

Brak oddziaływań warstwowych między resztą **U5** i sąsiadującą z nią po stronie 3' końca guanozyną **G6**, oraz obecność sygnału NOE pomiędzy protonami **G6:H8** i **G4:H1'** wskazywały na odmienną niż w przypadku dupletu **V** konformację regionu wybrzuszenia. Otrzymane dane sugerowały, że w przeciwieństwie do reszty adeniny **A5** w duplesie **V**, wybrzuszona zasada urydynowa jest wyeksponowana do roztworu, zachowując jedynie słaby kontakt z pierścieniem cukrowym reszty **G4**. Różne konformacje reszt adeniny (**A5**) i urydyny (**U5**) wskazują na różnorodność konformacyjną nawet tak małego elementu strukturalnego, jakim jest wybrzuszenie jednonukleotydowe.

W widmach korelacyjnych ^1H - ^{13}C HSQC, podobnie jak dla dupletu **V**, obserwowałem wyraźne różnice przesunięć chemicznych sygnałów atomów węgla z pierścieni cukrowych reszt **G4**, **U5** i **G6** w stosunku do odpowiadających im sygnałów pozostałych reszt. W przeciwieństwie do poprzedniego przypadku, wszystkie linie rezonansowe ^{31}P , włącznie z sygnałem wybrzuszonyj reszty – **U5** (-3.74 ppm) (Rys. 88), występują w wąskim zakresie -3.7 – -4.5 ppm (względem sygnału TMP).



Rys. 88. Widmo ^{31}P NMR dupletu **VI** w D_2O (243 MHz, 25°C).

Wyznaczone wartości przesunięć chemicznych sygnałów ^1H , ^{13}C oraz ^{31}P NMR dupletu **VI** zdeponowane zostały w banku BMRB pod identyfikatorem 15781.

Przesunięcia chemiczne większości sygnałów rezonansowych dupletów **V** i **VI** różnią się nieznacznie. W przypadku sygnałów ^1H NMR, największe różnice, lecz nie

przekraczające wartości 0.2 ppm obserwowałem jedynie dla reszt sąsiadujących z wybrzuszeniem: **G4** (sygnał H4') oraz **G6** (H1, H1' i H2'). O podobieństwie strukturalnym helikalnych fragmentów dupleksów **V** i **VI** świadczą nie tylko wyniki analizy przesunięć chemicznych ^1H , ale także wyjątkowo małe różnice przesunięć chemicznych ^{13}C oraz ^{31}P NMR. Częstotliwości rezonansowe atomów węgla są niezwykle czułe na efekty pierścieniowe związane z prądami π -elektronowymi, z oddziaływaniami warstwowymi i tworzeniem wiązań wodorowych między zasadami, ze stopniem hydratacji, oddziaływaniami sterycznymi między orbitalami π oraz z innymi czynnikami strukturalnymi. Różnice przesunięć chemicznych ^{13}C odpowiadających poszczególnym resztom zasad heterocyklicznych są mniejsze od 0.3 ppm. Również przesunięcia chemiczne jąder ^{13}C pierścieni cukrowych różnią się nieznacznie. Największe różnice zaobserwowałem dla atomów C3' reszty **G6** (1.80 ppm) oraz atomu C6 reszty **C14** (0.62 ppm). Stosunkowo duże zmiany przesunięć chemicznych reszt **G4**, **G6** i **C14** również wskazywały na różną konformację wybrzuszonej urydyny w porównaniu do dupleksu **V**. Natomiast w przypadku jąder ^{31}P różnicę większą od 0.1 ppm zanotowałem tylko dla reszty **C14** (0.11 ppm), nie uwzględniając reszty **U5**.

Tabela 22. Wartości przesunięć chemicznych $\delta^1\text{H}$ (ppm) sygnałów dupleksu **VI** [D_2O , 25°C].

Res.	H6/H8	H2/H5	H1'	H2'	H3'	H4'	H5'/H5''	amino	imino
G1	8.02	–	5.69	4.78	4.55	4.34	4.02/3.89	* / *	*
U2	8.00	5.16	5.70	4.65	4.56	4.51	4.56/4.19	–	14.72
C3	7.84	5.72	5.56	4.29	4.52	4.46	4.52/4.15	6.92/8.23	–
G4	7.67	–	5.82	4.45	4.74	4.49	4.51/4.15	* / *	12.60
U5	7.86	5.85	5.87	4.31	4.69	4.43	4.32/4.17	* / *	–
G6	7.72	–	5.72	4.79	4.48	4.53	4.30/4.16	* / *	13.19
C7	7.73	5.18	5.58	4.47	4.46	4.46	4.50/4.18	6.80/8.54	–
U8	7.82	5.42	5.57	4.42	4.55	4.42	4.54/4.10	* / *	13.83
G9	7.75	–	5.89	4.07	4.33	4.25	4.48/4.07	* / *	*
C10	8.07	5.98	5.50	4.52	4.58	4.32	4.05/3.93	7.12/8.33	–
A11	8.23	7.31	5.99	4.75	4.84	4.54	4.56/4.24	* / *	–
G12	7.33	–	5.65	4.50	4.41	4.47	4.48/4.14	* / *	13.57
C13	7.36	5.23	5.44	4.41	4.31	4.40	4.48/4.04	6.91/8.36	–
C14	7.78	5.59	5.51	4.52	4.58	4.37	4.52/4.09	6.89/8.41	–
G15	7.55	–	5.61	4.51	4.62	4.46	4.47/4.12	* / *	12.55
A16	7.82	7.85	5.92	4.40	4.62	4.46	4.60/4.10	* / *	–
C17	7.33	5.19	5.65	3.90	4.04	4.13	4.45/3.99	7.07/8.21	–

* Sygnały, które nie zostały przypisane.

Tabela 23. Wartości przesunięć chemicznych δ (ppm) sygnałów ^{13}C oraz ^{31}P NMR dupleksu VI [D_2O , 25°C].

Res.	C6/C8	C2/C5	C1'	C2'	C3'	C4'	C5'		^{31}P
G1	138.99	–	92.52	74.92	74.39	85.10	62.56		–
U2	142.74	102.65	93.92	75.34	72.60	82.54	65.02		-4.46
C3	141.33	98.16	94.42	75.53	73.04	82.42*	65.64		-4.04
G4	137.28	–	89.83	77.61	76.69	84.90	66.73		-4.32
U5	143.97	104.99	92.03	75.78	75.44	84.60	67.03		-3.74
G6	137.64	–	92.59	74.62	73.02	83.75	67.67		-3.89
C7	141.99	96.87	94.48	75.38	72.50	81.97	65.41		-4.32
U8	141.51	103.82	93.83	75.44*	72.49	82.17	64.73		-4.22
G9	137.64	–	91.05	78.02	70.69	84.17	65.89		-4.04
C10	143.01	98.84	93.98	75.46*	73.61	84.38	61.98		–
A11	139.99	153.00	92.43	75.81	73.21	82.27	65.51		-3.92
G12	135.68	–	92.59	75.46*	73.03	82.04	66.04		-3.99
C13	140.22	97.59	94.26	75.49*	72.25	81.98	64.72		-4.27
C14	140.46	98.53	93.78	75.32	72.12	81.80	64.24		-4.34
G15	136.03	–	92.71	75.46*	72.85	82.17*	65.43		-3.88
A16	139.23	154.30	93.10	75.71	72.37	82.24*	64.66		-4.24
C17	141.04	97.70	92.68	77.55	69.79	83.30	65.14		-4.16

* Sygnały, które nie zostały jednoznacznie przypisane.

3.2.2. Analiza konformacyjna. Wyznaczenie więzów strukturalnych (VI)

Na podstawie widm NMR i przypisanych sygnałach rezonansowych wyznaczyłem objętości sygnałów NOE i sprzężenia skalarne $^3J_{\text{HH}}$ i $^3J_{\text{PH}}$ obserwowane w pierścieniach cukrowych i w łańcuchach fosfodiesterowych. W oparciu o te wartości pozyskane zostały więzy strukturalne, które wykorzystałem podczas generowania struktur. Więzy na odległości międzyprotonowe uzyskałem metodą ISPA w oparciu o analizę integracji pozadiagonalnych sygnałów korelacyjnych w widmach 2D NOESY (D_2O) wykonanych z czasem mieszania $\tau_m = 150$ ms w temperaturze 25°C oraz 30°C . Dolnym i górnym granicom więzów przypisałem wartości -15% i +30% obliczonych odległości. Pojedyncze więzy (w granicach 4.0 – 7.0 Å) dodałem w wyniku analizy sygnałów korelacyjnych widm 2D NOESY otrzymanych przy $\tau_m = 400$ ms. Zdefiniowałem także 17 więzów typu uNOE (5.0 – 20.0 Å) między protonami reszty nukleotydowej **U5**, a protonami reszt **G4** i **G6**, dla których efektu NOE w widmach nie rejestrowałem. W oparciu o analizę sygnałów protonów wymieniających w widmie wykonanym w mieszaninie 90% H_2O /10% D_2O , otrzymałem 19 więzów na odległości o granicach 1.8 – 6.0 Å. Analiza widma wykazała również, że wszystkie reszty nukleotydowe w duplekcie (z wyjątkiem reszty **U5**) zaangażowane są w tworzenie

kanonicznych par zasad, co pozwoliło mi wprowadzić więzy na wiązania wodorowe oraz planarność tych par.

Informacje o konformacji pierścieni rybozy uzyskałem na podstawie pomiaru wielkości stałych sprzężenia $^3J_{H1'-H2'}$ w widmach typu DQF-COSY. Więzy na konformację C3'-*endo* wprowadziłem dla wszystkich reszt z wyjątkiem guanozyny **G6**, oraz terminalnych reszt **G9**, **C10**, **C17**, na które z uwagi na wielkość stałej sprzężenia rzędu 4 Hz nałożyłem więzy, umożliwiające przyjęcie zarówno formy C2'-*endo*, jak i C3'-*endo*. Dla reszty **G4**, ze względu na dużą stałą sprzężenia $^3J_{H1'H2'}$ zadałem więzy na konformację C2'-*endo*. Jedynie na kąty torsyjne pierścienia rybozy urydyny **U5** (7.3 Hz) nie wprowadziłem żadnych restrykcji.

W widmach ^{31}P NMR nie obserwowałem żadnych nietypowych przesunięć chemicznych, co pozwoliło mi przyjąć, że w dupleksie **VI** kąty α i ζ mają wartości w zakresie $0 \pm 120^\circ$.

Analiza widm ^1H - ^{31}P HSQC wykazała obecność jedynie bardzo słabych sygnałów korelacyjnych P-H5'/H5'', dlatego założyłem, iż w dupleksie **VI** kąty β przyjmują typowe dla formy A-RNA wartości ($178 \pm 30^\circ$). Również wartości kątów ε znajdują się w charakterystycznym dla cząsteczek A-RNA zakresie ($-153 \pm 30^\circ$), czego dowodziła obecność dużych wicynalnych sprzężeń skalarnych $^3J_{PH3'}$. Z uwagi jednak na obserwowaną dynamikę regionu wybrzuszenia, przyjąłem większy zakres błędu ($-153 \pm 55^\circ$) dla więzów na kąty ε reszt **G4** i **U5**.

Opierając się na analizie stałych sprzężeń $^3J_{H4'H5'}$ oraz $^3J_{H4'H5''}$, wprowadziłem więzy na kąty torsyjne γ o zakresie $54 \pm 30^\circ$ dla wszystkich reszt z wyjątkiem reszty **U5** oraz guanozyny **G6**, dla której wyznaczenie wielkości sprzężenia nie było możliwe z uwagi na silne nakładanie się sygnałów H5'-H5''.

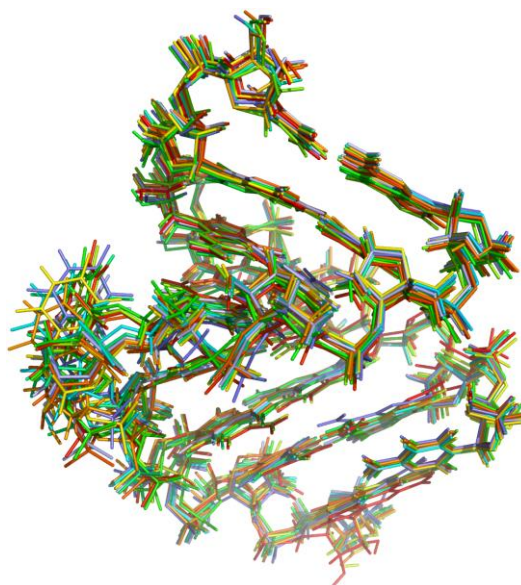
3.2.3. Restryktywna dynamika molekularna (VI)

Wykorzystując metodę dynamiki molekularnej w przestrzeni kątów torsyjnych¹⁵² (TAMD) przeprowadziłem obliczenia strukturalne dla dupleksu **VI**. Analiza widm umożliwiła zgromadzenie 274 eksperymentalnych więzów odległościowych, oraz 165 więzów kątowych. Pełną statystykę więzów podałem w tabeli na rysunku 89. Wprowadziłem także więzy na wiązania wodorowe, a po przeprowadzeniu wstępnych obliczeń i powtórnej analizie widm 2D NOESY dodałem również 17 więzów typu uNOE. Wśród tych ostatnich najwięcej związanych było z kontaktami protonu **U5:H5** do protonów rybozy reszty **G4** oraz protonów

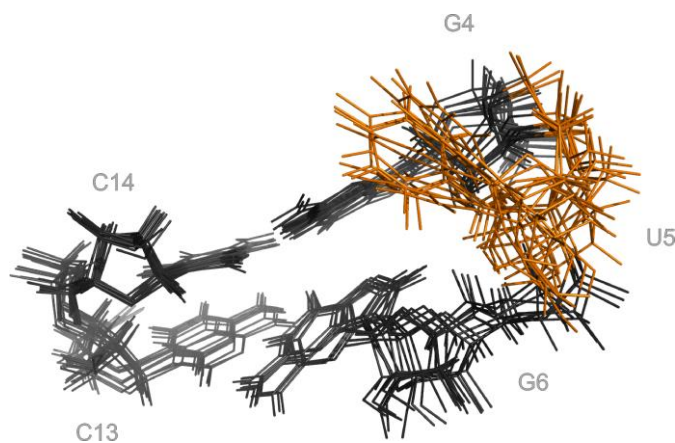
H8 reszt **G4** i **G6**, a także odległością protonu **G6:H8** do protonów pierścienia rybozy reszty **U5**. Ponadto w grupie tej wymienić można również więzy typu uNOE na odległości pomiędzy pierścieniami cukrowymi reszt **G4**, **A5** i **G6**. Podczas etapu udokładnienia wprowadziłem więzy na planarność par zasad, a potencjały DELPHIC²⁰⁸ zadałem dla każdej reszty z wyjątkiem reszty **U5**. W wyniku obliczeń dla 50 liniowych struktur początkowych otrzymałem 36 struktur zgodnych z danymi eksperymentalnymi i posiadających prawidłową geometrię. Więzy uznałem za spełnione, jeśli nie zostały naruszone więcej niż o 0.3 Å (w przypadku więzów NOE) oraz 5° (dla więzów na kąty torsyjne). Do dalszej analizy wybrałem 10 struktur charakteryzujących się najniższą energią cząsteczki. Nałożenie ich ukazane jest na rysunku 89. Obliczone wartości RMSD tych struktur dla wszystkich ciężkich atomów wynoszą 0.68 ± 0.19 Å, natomiast dla ciężkich atomów (przedstawionego na rysunku 90) regionu wybrzuszenia: 0.82 ± 0.29 Å.

Współrzędne końcowych struktur zamieszczone zostały w bazie danych PDB pod identyfikatorem 2k41.

Statystyka więzów wykorzystanych w obliczeniach.	
Całkowita liczba więzów NOE:	274
intranukleotydowe	171
internukleotydowe	103
Więzy typu uNOE	17
Więzy na wiązania wodorowe	48
Więzy na planarność	8
Więzy na kąty dwuścienne:	165
szkieletu fosfodiesterowego	69
rybozy	80
wiązania glikozydowego	16
Średnia liczba więzów NOE przypadających na resztę nukleotydową	16.12
Średnia liczba więzów NOE oraz więzów na kąty dwuścienne przypadających na resztę nukleotydową	25.82



Rys. 89. Superpozycja rodziny 10 struktur przestrzeni konformacyjnej dupletu **VI**.



Rys. 90. Region wybrzuszenia dupleksu **VI** dla 10 struktur o najniższej energii. Widok od strony małej bruzdy. Pomarańczowym kolorem wyróżniona została niesparowana reszta urydyny, czarnym kolorem zaznaczone zostały pary zasad G:C zamykające wybrzuszenie.

3.2.4. Analiza przestrzeni konformacyjnej rodziny struktur (**VI**)

Analizę parametrów helikalnych oraz kątów torsyjnych struktur przestrzeni konformacyjnej, dokonałem za pomocą programu Curves^{30,31}. Średnie wartości tych kątów wraz z odchyleniami standardowymi obliczone dla rodziny 10 struktur o najniższej energii przedstawione zostały w tabeli 24.

Przeprowadzona analiza tych parametrów pozwala zaobserwować dużo większą zmienność, niż w poprzednim przypadku (Rozdział IV.2). Szczególnie dużą dynamiką charakteryzują się kąty torsyjne wybrzuszonej reszty nukleotydowej **U5**, a także kąty α , β i γ reszty **G6**, sąsiadującej z nią po stronie 3'. Jednakże, mimo dużej zmienności tych jednostek nukleotydowych, nie mają one znaczącego wpływu zarówno na strukturę jak i dynamikę reszt znajdujących się w nici komplementarnej.

Tabela 24. Średnie wartości kątów torsyjnych łańcuchów fosfodiesterowych (α , β , γ , δ , ε , ζ), kąta glikozydowego (χ) oraz parametrów opisujących konformację pierścieni cukrowych (P, v_{max}) obliczonych dla dupleksu VI. W nawiasach podane zostały wartości odchylenia standardowego.

Reszta	α	β	γ	δ	ε	ζ	χ	P	v_{max}
G1	–	–	37 (3)	87 (1)	199 (5)	294 (4)	202 (5)	4 (3)	38 (1)
U2	280 (6)	187 (7)	51 (3)	83 (1)	199 (3)	300 (2)	208 (2)	4 (3)	42 (1)
C3	299 (7)	168 (5)	55 (9)	77 (1)	206 (5)	285 (6)	199 (3)	17 (2)	43 (1)
G4	318 (7)	177 (7)	55 (10)	131 (3)	257 (5)	262 (13)	218 (3)	159 (2)	26 (4)
U5	214 (50)	148 (21)	27 (32)	106 (34)	200 (33)	295 (51)	255 (11)	72 (89)	37 (3)
G6	78 (43)	179 (23)	289 (74)	81 (1)	215 (14)	272 (9)	188 (9)	29 (6)	39 (1)
C7	275 (17)	155 (9)	77 (11)	84 (2)	196 (5)	305 (4)	202 (9)	8 (3)	40 (1)
U8	284 (6)	194 (8)	52 (11)	82 (2)	202 (4)	288 (3)	204 (6)	21 (5)	39 (1)
G9	291 (2)	181 (3)	54 (3)	84 (1)	–	–	207 (4)	19 (2)	37 (1)
C10	–	–	35 (8)	89 (1)	213 (11)	296 (10)	212 (4)	0 (3)	38 (1)
A11	295 (5)	166 (10)	52 (6)	78 (1)	200 (4)	302 (2)	196 (1)	21 (3)	43 (1)
G12	294 (1)	206 (4)	25 (2)	79 (1)	207 (10)	283 (8)	215 (4)	15 (2)	42 (1)
C13	305 (8)	160 (18)	51 (11)	80 (1)	205 (7)	288 (8)	209 (4)	14 (2)	42 (1)
C14	309 (11)	182 (18)	35 (3)	84 (3)	213 (9)	289 (8)	208 (2)	9 (7)	40 (1)
G15	307 (6)	168 (14)	44 (7)	78 (1)	206 (2)	287 (4)	195 (4)	21 (3)	42 (1)
A16	301 (4)	183 (9)	40 (6)	82 (1)	207 (4)	282 (3)	198 (1)	17 (3)	40 (1)
C17	301 (3)	170 (3)	48 (4)	86 (1)	–	–	215 (1)	6 (1)	37 (1)
Średnia:	297 (12)	177 (14)	47 (12)	82 (4)	205 (6)	290 (9)	205 (8)	14 (8)	40 (2)
A-RNA ^{209,210}	294	186	49	88	202	294	202	18	39

Największe odchylenie standardowe obserwuje się dla kąta fazowego pseudorotacji P wybrzuszonej reszty **U5**. Związane jest to z obecnością w analizowanych strukturach dwóch przeciwstawnych konformacji pierścienia cukrowego. W przypadku trzech struktur reszta cukrowa znajduje się w konformacji S, ze średnią wartością parametru P wynoszącą $199 \pm 1^\circ$, natomiast w pozostałych – przyjmuje konformację N, z wartością średnią $17 \pm 18^\circ$. Zmiany konformacyjne pierścienia cukrowego powodują odpowiednie zmiany łańcucha fosforocukrowego w najbliższym sąsiedztwie. Szczególnie uwidacznia się to w przypadku kątów α i γ reszt **U5** i **G6**, przy czym warto zwrócić uwagę, iż wartości tych kątów również znacznie odbiegają od uzyskanych dla kanonicznych struktur A-RNA. Dla czterech struktur kąty α i γ reszty **G6** przyjmują odpowiednio wartości $29 \pm 11^\circ$ i $16 \pm 7^\circ$, natomiast w pozostałych sześciu przypadkach wynoszą $111 \pm 2^\circ$ (α) oraz $232 \pm 2^\circ$ (γ). Pewne różnice występują również dla kąta β reszty **U5**, którego wartości wahają się w granicach od 125° do 184° . Warto zauważyć, iż mimo dużej dynamiki wybrzuszenia reszta **G4**, zamykająca wybrzuszenie po stronie 5', jest bardzo stabilna choć przyjmuje nietypową konformację związaną z pofałdowaniem pierścienia cukrowego oraz wartościami kąta ε . Parametry P ($159 \pm 2^\circ$) i δ ($131 \pm 3^\circ$) odpowiadają konformacji C2'-endo, natomiast kąty ε przyjmują wartości $257 \pm 5^\circ$, co wykracza poza typową, obserwowaną dla struktur A-RNA konformację

trans. Natomiast konformacja pozostałych reszt niewiele odbiega od kanonicznej postaci A-RNA, o czym również świadczą zamieszczone w tabeli 25 wyznaczone wartości parametrów helikalnych.

Tabela 25. Uśrednione wartości wybranych parametrów helikalnych dupleksu VI.

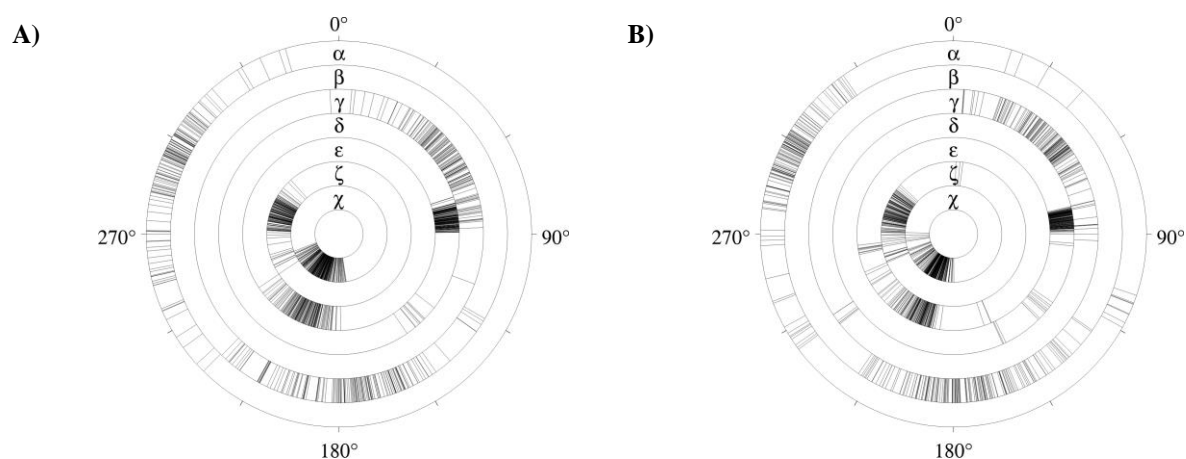
Para zasad	<i>x-Displacement</i> dx (Å)	<i>y-Displacement</i> dy (Å)	<i>Inclination</i> η (°)	<i>Propeller twist</i> ω (°)
G1-C17	-3.9 (0.3)	-1.0 (0.2)	21 (3)	-10 (5)
U2-A16	-4.6 (0.2)	-0.2 (0.2)	15 (3)	-3 (3)
C3-G15	-4.1 (0.2)	-0.4 (0.2)	19 (4)	-24 (3)
G4-C14	-4.7 (0.3)	-1.0 (0.2)	21 (4)	-21 (5)
G6-C13	-4.9 (0.4)	-0.3 (0.3)	16 (4)	13 (8)
C7-G12	-5.3 (0.3)	0.3 (0.5)	22 (4)	-4 (4)
U8-A11	-4.8 (0.2)	-0.4 (0.6)	20 (3)	-15 (3)
G9-C10	-5.4 (0.2)	-0.4 (0.4)	25 (3)	-21 (7)
Średnia:	-4.7 (0.5)	-0.4 (0.4)	20 (3)	-11 (12)
A-RNA ¹⁶¹ :	-5.3	0.0	16	-14

Sekwencja par zasad	<i>Shift</i> D _x (Å)	<i>Rise</i> D _z (Å)	<i>Twist</i> Ω (°)	<i>Roll</i> ρ (°)
G1-U2	-0.6 (0.1)	2.3 (0.1)	37 (1)	-5 (3)
U2-C3	0.5 (0.1)	2.5 (0.1)	34 (2)	-2 (1)
C3-G4	-0.6 (0.2)	3.0 (0.2)	31 (1)	9 (2)
G6-C7	-0.4 (0.6)	2.6 (0.3)	28 (2)	-6 (4)
C7-U8	0.5 (0.3)	2.5 (0.3)	34 (1)	4 (3)
U8-G9	-0.6 (0.2)	2.9 (0.3)	33 (1)	2 (3)
Średnia:	-0.2 (0.5)	2.6 (0.3)	33 (3)	0 (6)
A-RNA ¹⁶¹ :	0.0	2.8	33	0

3.3. Podsumowanie. Analiza kątów torsyjnych, parametrów pofaldowania pierścieni cukrowych oraz parametrów helikalnych struktur V i VI

Obliczone wartości kątów torsyjnych opisujących konformację wszystkich zdeponowanych w banku danych PDB struktur dupleksów V i VI przedstawione są na rysunku 91. Porównanie obu wykresów kołowych pozwala wychwycić pewne różnice, które najbardziej uwidaczniają się w przypadku kątów torsyjnych α , γ , δ i ζ . Obserwowane dla dupleksu VI wartości kątów α z przedziału 15 – 130°, jak również γ ($232 \pm 2^\circ$) nie występują w strukturze V, w której reszta A5 tworzy trójkę zasad z parą G4:C14. Dla cząsteczki VI zanotowałem również większą liczbę reszt nukleotydowych, w których kąt δ znajduje się w zakresie charakterystycznym dla konformacji S. W niektórych otrzymanych strukturach dla

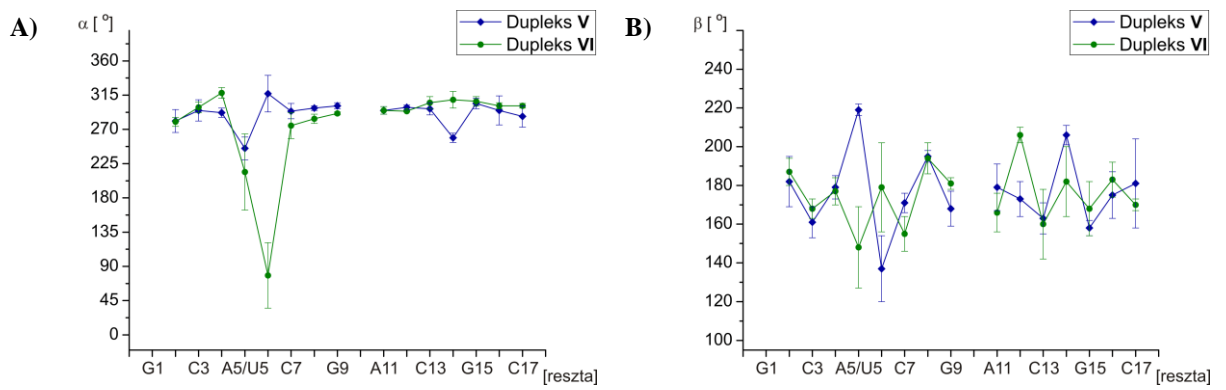
cząsteczki **VI** kąt ζ przyjmuje wartości ($0 - 10^\circ$), nietypowe dla kanonicznych struktur A-RNA. Z porównania dwu dupleksów wynika, że zastąpienie reszty adenozyliny A5 urydyną U5 wywołuje zmiany konformacyjne w duplesie, przy czym wyrzucenie reszty urydyny na zewnątrz duplesu wymaga większych zmian strukturalnych niż utworzenie platformy dinukleotydoj. Analiza wartości RMSD wyznaczonych dla wszystkich ciężkich atomów reszt niesparowanych oraz sąsiednich par zasad, także ukazuje znacznie większą stabilność strukturalną cząsteczki **V** ($\text{RMSD} = 0.39 \pm 0.11 \text{ \AA}$) w porównaniu do cząsteczki **VI** ($0.82 \pm 0.29 \text{ \AA}$).



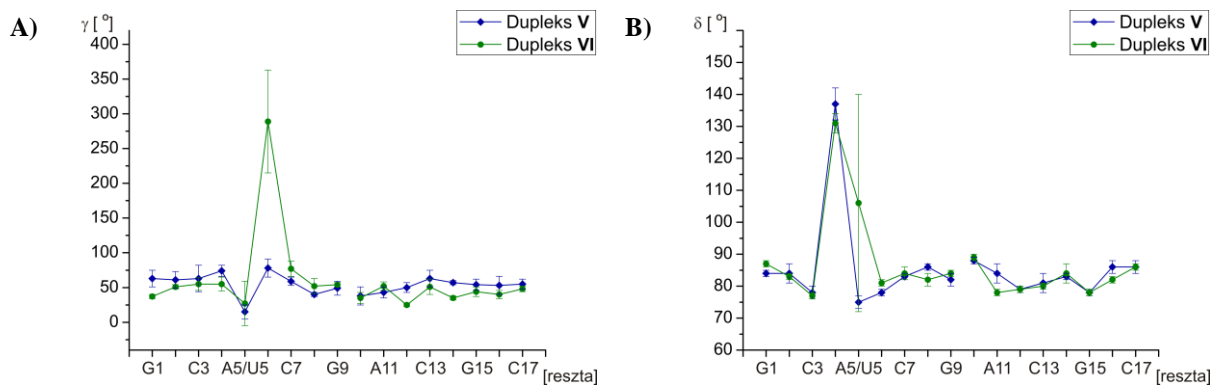
Rys. 91. Porównanie wartości kątów torsyjnych struktur końcowych duplesu **V** (A) i **VI** (B).

Zestawienie średnich wartości kątów torsyjnych dla poszczególnych reszt obliczone ze wszystkich 10 struktur wraz z naniesionymi odchyleniami standardowymi przedstawione jest na wykresach 92-96. Można zauważyć, że z wyjątkiem wybrzuszonych reszt, a także reszt, które z tymi wybrzuszeniami sąsiadują, wartości poszczególnych kątów różnią się niewiele i odpowiadają, w granicach błędu, wartościom typowym dla kanonicznej formy A-RNA. W przypadku obu dupleksów wartości kątów δ reszty **G4** wynoszą około 135° (Rys. 93B) i są charakterystyczne dla konformacji S rybozy. Obliczone dla tych reszt wartości kąta fazowego pseudorotacji ($\sim 160^\circ$) wskazują na konformację *C2'-endo* (Rys. 96A). Jednak reszta cukrowa **G4** duplesu **VI** posiada mniejszą amplitudę pofałdowania niż w duplesie **V**, $v_{max} = 26 \pm 4^\circ$ (Rys. 96B). Na dynamiczny charakter wybrzuszonej reszty **U5** duplesu **VI** wskazuje obserwowana duża zmienność kąta δ i związanego z nim kąta P (Rys. 93B i 96A). Dla 7 struktur konformacja pierścienia cukrowego reszty **U5** przyjmuje formę N, natomiast w pozostałych trzech przypadkach – konformację S (patrz rozdz. IV.3.2.4), podczas gdy w duplesie **V** konformacja rybozy reszty **A5** we wszystkich analizowanych strukturach nie

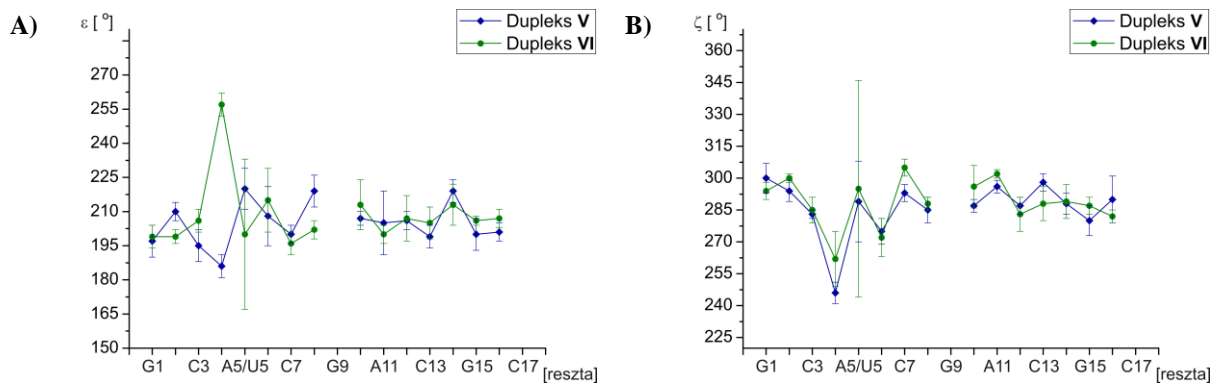
zmienia się i jest typowa dla formy A-RNA. W obu cząsteczkach, kąt pseudorotacji wyznaczony dla reszt o konformacji N waha się w przedziale od 0° do 43° (Rys. 96A), natomiast amplitudy pofałdowania cukru przyjmują typowe wartości (39°) (Rys. 96B). W obu analizowanych strukturach (**V** i **VI**) w regionie wybruszenia można zauważyć niewielkie zmiany w orientacji pierścieni heterocyklicznych reszt względem pierścieni cukrowych. Zmiany te opisane wartościami kątów torsyjnych χ (Rys. 95) dotyczą zarówno wybruszonych reszt jak i sąsiadujących z nimi reszt guanozyny **G4** i **G6**. Obecność wybruszenia, **A5** lub **U5**, wywiera bardzo podobny wpływ na znajdujące się po stronie 5' reszty **G4**. Jediną różnicę obserwuje się dla kąta ε (Rys. 94A), gdzie w duplesie **VI** kąt ε reszty **G4** przyjmuje nietypowe wartości. W strukturze **VI** wyrzucenie na zewnątrz duplesu reszty urydyny wymusza znaczące zmiany kątów α oraz γ , reszty **G6** (Rys. 92A i 93A). Wartości tych kątów wyraźnie odbiegają zarówno od tych obserwowanych dla reszty **G6** w duplesie **V**, jak i od typowej dla formy A konformacji *gauche*⁻. W duplesie **V** orientacja reszty **A5** związanej z parą zasad **G4:C14** nie powoduje istotnych zmian konformacyjnych. Przyjęta orientacja reszty **A5** pociąga również niewielkie zmiany konformacyjne w komplementarnym łańcuchu rybonukleotydowym. Wpływ ten zaobserwować można tylko w przypadku kąta torsyjnego α reszty **C14** (Rys. 92A), uczestniczącej w tworzeniu trójki zasad. Dla reszty adenozyiny **A5** w duplesie **V** wartość kąta ζ nie ulega dużym zmianom i jest charakterystyczna dla formy A-RNA, podczas gdy w duplesie **VI** kąt ξ waha się pomiędzy dwoma rotamerami ze średnimi wartościami $6 \pm 3^\circ$ i $265 \pm 16^\circ$ (Rys. 94B). Pozostałe kąty torsyjne obu struktur różnią się nieznacznie i przyjmują charakterystyczne wartości dla kanonicznej formy A-RNA. Powyższa analiza ukazuje, że konformacja reszty **U5** w duplesie **VI** wywołuje znacznie mocniejsze, choć tylko lokalne zaburzenia strukturalne aniżeli tworząca trójkę zasad reszta **A5** w duplesie **V**. Konformacja reszty **A5** w duplesie **V** jest ponadto zdecydowanie bardziej stabilna, co wynika z zaangażowania tej reszty w tworzenie wiązań wodorowych z parą **G4:C14** i oddziaływań warstwowych z resztą **G6**.



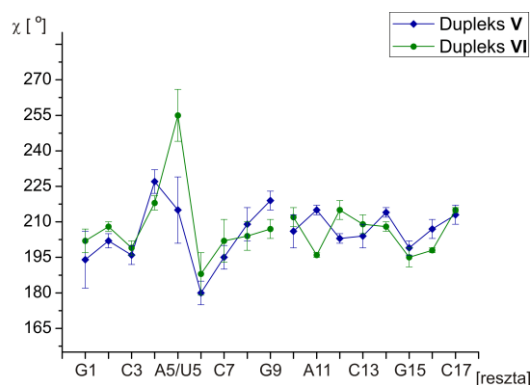
Rys. 92. Graficzna prezentacja średnich wartości kątów torsyjnych α i β wraz z naniesionymi odchyleniami standardowymi dla dupleksów V (linia niebieska) i VI (linia zielona).



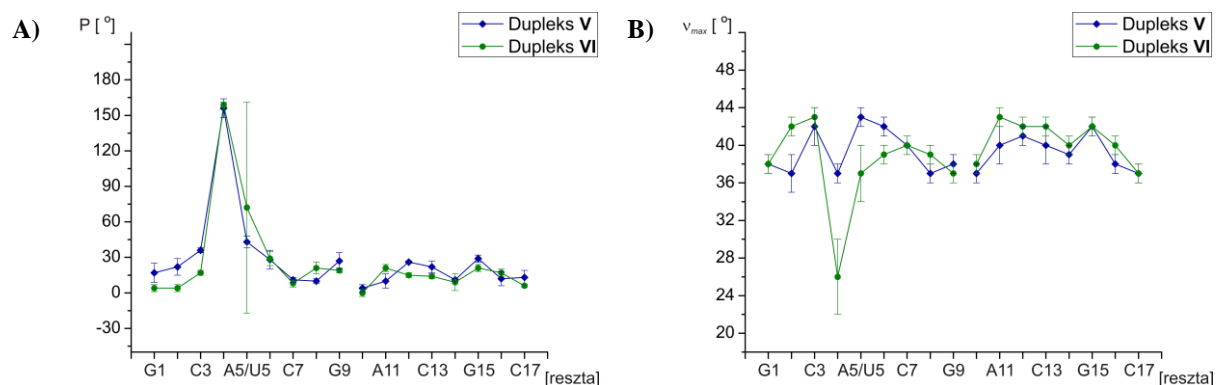
Rys. 93. Graficzna prezentacja średnich wartości kątów torsyjnych γ i δ wraz z naniesionymi odchyleniami standardowymi dla dupleksów V (linia niebieska) i VI (linia zielona).



Rys. 94. Graficzna prezentacja średnich wartości kątów torsyjnych ϵ i ζ wraz z naniesionymi odchyleniami standardowymi dla dupleksów V (linia niebieska) i VI (linia zielona).

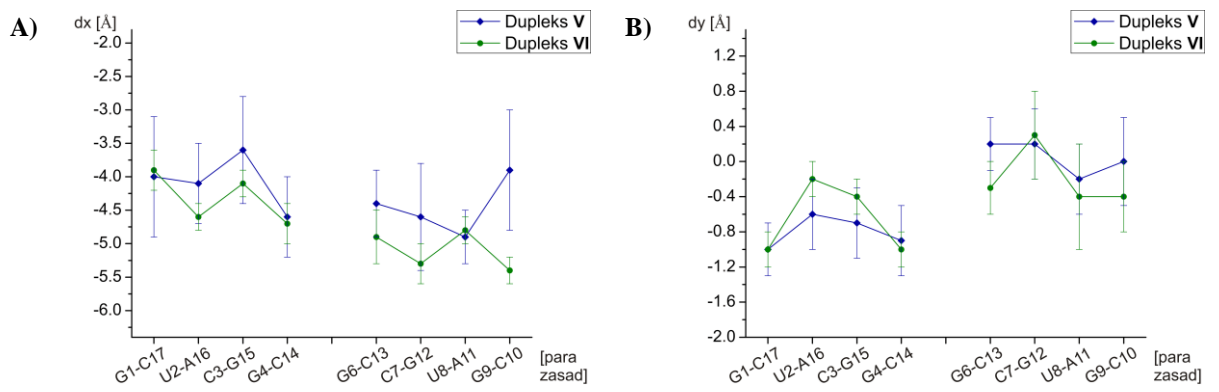


Rys. 95. Graficzna prezentacja średnich wartości kąta glikozydowego χ wraz z naniesionymi odchyleniami standardowymi dla dupleksów **V** (linia niebieska) i **VI** (linia zielona).

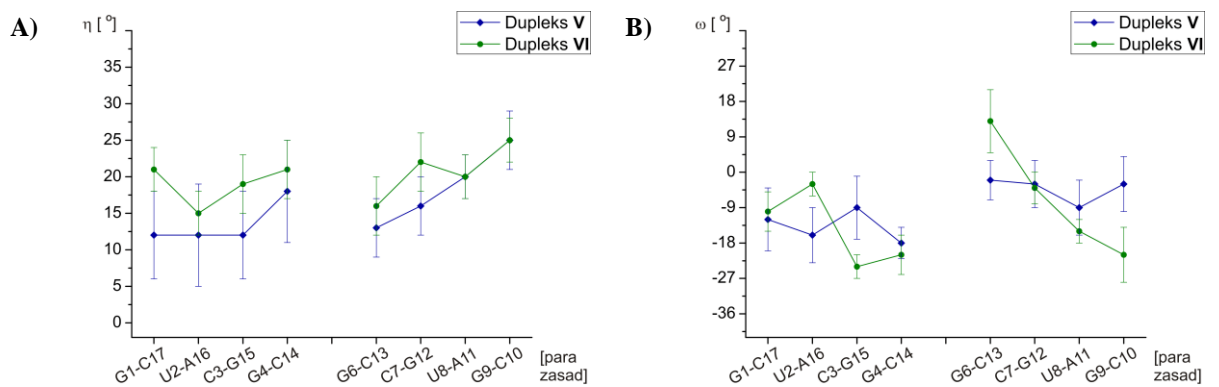


Rys. 96. Graficzna prezentacja średnich wartości kąta fazowego pseudorotacji P i amplitudy pofałdowania v_{max} wraz z naniesionymi odchyleniami standardowymi dla dupleksów **V** (linia niebieska) i **VI** (linia zielona).

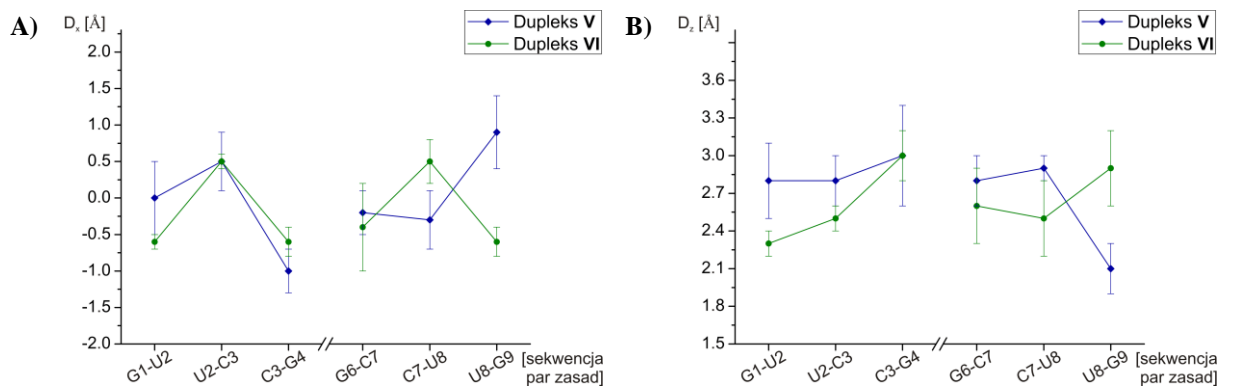
Porównałem również parametry helikalne dla obu dupleksów, a najważniejsze z nich przedstawione zostały na rysunkach 97-100. Parametry te mogłem obliczyć jedynie dla krótkich fragmentów dwuniciowych, które znajdują się po obu stronach wybrzuszenia. Wartości parametrów są porównywalne i odpowiadają strukturze A-RNA. Niewielkie obserwowane różnice mogą wynikać z niedokładności programu Curves podczas wyznaczenia osi helisy (względem której parametry helikalne są wyznaczone) dla bardzo krótkich fragmentów helikalnych. Wyznaczenie parametrów byłoby bardziej precyzyjne dla dłuższych fragmentów dwuniciowych. Mogłyby się wówczas ujawnić pewne cechy badanych struktur, które tutaj są niewidoczne.



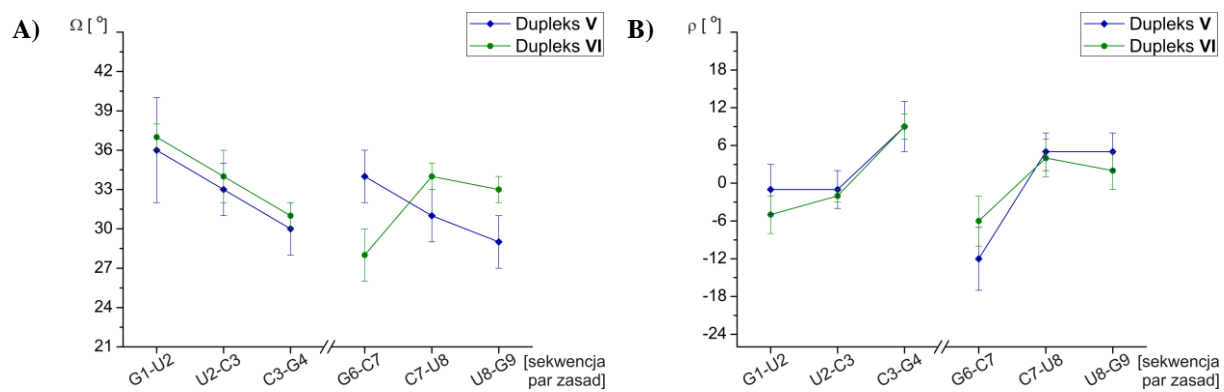
Rys. 97. Graficzna prezentacja średnich wartości parametrów x -Displacement (dx) i y -Displacement (dy) wraz z naniesionymi odchyleniami standardowymi dla dupleksów V (linia niebieska) i VI (linia zielona).



Rys. 98. Graficzna prezentacja średnich wartości parametrów Inclination (η) i Propeller twist (ω) wraz z naniesionymi odchyleniami standardowymi dla dupleksów V (linia niebieska) i VI (linia zielona).



Rys. 99. Graficzna prezentacja średnich wartości parametrów Shift (D_x) i Rise (D_z) wraz z naniesionymi odchyleniami standardowymi dla dupleksów V (linia niebieska) i VI (linia zielona).



Rys. 100. Graficzna prezentacja średnich wartości parametrów *Twist* (Ω) i *Roll* (ρ) wraz z naniesionymi odchyleniami standardowymi dla dupleksów V (linia niebieska) i VI (linia zielona).

V. DYSKUSJA UZYSKANYCH WYNIKÓW

Nasza wiedza na temat struktury przestrzennej cząsteczek RNA stale się poszerza wraz ze wzrostem liczby poznawanych coraz to nowych struktur. W porównaniu do struktur otrzymanych metodami rentgenograficznymi, wciąż stosunkowo mało jest struktur cząsteczek RNA otrzymanych metodami spektroskopii NMR. W badaniach strukturalnych kwasów nukleinowych metodami NMR, źródłem szczególnych trudności są z jednej strony czynniki eksperymentalne (silniejsze niż w przypadku białek nakładanie się sygnałów, trudności z otrzymaniem dostatecznej ilości materiału o zadowalającej czystości), z drugiej zaś znaczna zazwyczaj dynamika strukturalna funkcjonalnie istotnych i tym samym szczególnie interesujących regionów jednoniciowych. Ustalenie struktury takiego fragmentu RNA jest niezwykle trudne, a często wręcz niewykonalne. Do tej pory, dla cząsteczek RNA, nie istnieją żadne programy, które dokonałyby automatycznej analizy widm NMR. Takie algorytmy opracowane zostały już dla białek²¹⁹⁻²²⁷, jednak dla RNA sytuacja jest bardziej skomplikowana, z uwagi na mniejszą różnorodność reszt występujących w kwasach nukleinowych, a co za tym idzie silnym nakładaniem się sygnałów w widmach NMR. Pracownia Chemii Strukturalnej Kwasów Nukleinowych wraz z Pracownią Bioinformatyki kierowaną przez prof. J. Błażewicza zaangażowana jest w opracowywanie takiego algorytmu²²⁸. Niestety, do czasu pełnego zautomatyzowania tego procesu, etap przypisań sygnałów rezonansowych cząsteczek RNA jest żmudny i bardzo czasochłonny, wymagający oznaczenia wielu sygnałów korelacyjnych w widmach NMR, w celu wyznaczenia na ich podstawie więzów strukturalnych. Dużą niedogodność w analizie strukturalnej fragmentów kwasów nukleinowych stanowi również ich szczególna podatność na degradację wywołowaną przez wszechobecne rybonukleazy czy też hydrolizę promowaną jonami metali. Pomimo tych trudności, określenie struktur cząsteczek RNA metodami wysokorozdzielczej spektroskopii NMR ma ogromne znaczenie poznawcze, gdyż pozwala na poznanie struktur występujących w roztworze, w warunkach zbliżonych do fizjologicznych, takich, jakie znajdują się w komórce. Zdarza się, że struktury cząsteczek RNA w kryształach różnią się od tych, jakie występują w roztworze. Wiadomo na przykład, iż przypadku najprostszych motywów strukturalnych, jakimi są wybrzuszenia, będące obiektem moich badań, konformacja występująca w kryształach może być inna od tej obserwowanej w roztworze, nawet dla identycznej sekwencji zasad. Jest to spowodowane tym, że w kryształach wybrzuszone reszty mogą uczestniczyć w oddziaływaniach z innymi cząsteczkami RNA, jonami metali lub też może to być wynikiem sił związanych z upakowaniem molekuł w sieci krystalograficznej.

Takim przykładem jest struktura genomowego RNA bakteriofaga R17, gdzie w roztworze wybrzuszone reszta adenozyliny interkaluje pomiędzy sąsiadujące pary zasad¹⁸. Badania w kryształach ukazały odmienną, wyrzuconą na zewnątrz, konformację wybrzuszenia^{15,55}.

Konformacja pojedynczego wybrzuszenia nukleotydowego może zależeć od typu niesparowanej reszty, par zasad ograniczających wybrzuszenie oraz od długości i sekwencji fragmentów helikalnych, które ograniczają wybrzuszenie. Jak dotąd, nie prowadzono żadnych badań strukturalnych, które pozwoliłyby ustalić, w jaki sposób czynniki te wpływają na konformację wybrzuszonej reszty. Jedynych, bardzo ogólnych informacji na ten temat dostarczają badania termodynamiczne²²⁹⁻²³¹ oraz z zastosowaniem metod symulacji dynamiki molekularnej. Dotychczasowe, nieliczne badania metodami NMR cząsteczek RNA zawierających jednonukleotydowe wybrzuszenia wykazują, że w roztworze wybrzuszenia adenozynowe przejawiają tendencję do przyjmowania konformacji typu *stack-in*²³²⁻²³⁶, w przeciwieństwie do wybrzuszeń urydynowych, które preferują strukturę typu *loop-out*^{62,96,237-239}.

Również analiza konformacyjna metodami symulacji dynamiki molekularnej oparta na analizie energii potencjalnej dowiodła, że uprzywilejowaną konformacją niesparowanej adenozyliny jest taka, w której reszta ta zwrócona jest do wewnątrz helisy²⁴⁰ (konformacja *stack-in*), czyli odpowiadająca strukturze w roztworze. Jednakże badania te również wykazały, że wśród struktur o najniższych energiach pojawiały się konformery, w których niesparowana reszta wraz z parą zasad po stronie 5' tworzyła trójkę oddziałujących zasad.

W celu porównania struktur rozwiązanych w niniejszej pracy z innymi strukturami NMR zawierającymi wybrzuszenia adenozynowe i urydynowe przeszukałem dostępną pod adresem <http://scor.berkeley.edu/> bazę danych SCOR²⁴¹ (*Structural Classification of RNA*). Baza ta dokonuje próby klasyfikacji 579 struktur RNA (ostatnia aktualizacja 15 maja 2004) zdeponowanych w bazach danych PDB oraz NDB²⁴² (*Nucleic Acid Database*; <http://ndbserver.rutgers.edu/>) pod kątem występujących w nich różnych drugo- i trzeciorzędowych motywów strukturalnych. Pomimo dużej liczby elementów strukturalnych sklasyfikowanych w bazie (8270 motywów drugorzędowych, z których 2920 stanowią pętle spinkowe, a 5350 pętle wewnętrzne), to w wielu przypadkach ten sam element danej struktury zaklasyfikowany został do kilku klas. Także niewielka jest liczba motywów odpowiadających strukturze otrzymanym w roztworze. Większość z wymienionych przykładów pochodzi z analizy dwóch dużych struktur krystalograficznych bakteryjnych podjednostek rybosomalnych 30S z *Thermus thermophilus*⁵⁸ oraz 50S z *Haloarcula marisortui*²⁴³, gdzie analizowane cząsteczki RNA wykryzalizowane zostały w kompleksie z białkami

rybosomalnymi. Należy również podkreślić, że baza ta nie jest wolna od błędów. Typowy przykład stanowić może struktura NMR dupleksu z wybrzuszoną resztą adenozyiny, w którym reszta ta interkaluje pomiędzy sąsiadujące pary zasad (PDB: 1K8S). Struktura ta zaklasyfikowana została jedynie jako wzajemnie komplementarny dupleks, a już nie jako wybrzuszenie jednonukleotydowe. Wśród interesujących mnie motywów strukturalnych sklasyfikowanych w bazie jako pojedyncze, niesparowane zasady (A lub U), znajdują się referencje do struktur zdeponowanych w bazie PDB o identyfikatorach: 1NCO, 1D0U (dla wybrzuszeń adenozynowych) i 1NBR, 1P5P (dla wybrzuszeń urydynowych).

Dlatego też dla przeszukania wszystkich znanych struktur RNA wykorzystałem nowo powstałą bazę danych RNA FRABASE²⁴⁴ (FRABASE - *RNA FRAGments search engine & dataBASE*; <http://rnafrabase.ibch.poznan.pl>). Baza ta opracowana została w Pracowni Chemii Strukturalnej Kwasów Nukleinowych w celu szybkiego wyszukiwania wśród struktur zdeponowanych w bazach danych PDB i NDB przestrzennych fragmentów, zdefiniowanych za pomocą notacji dot-bracket²⁴⁵. W pierwszym kroku wyszukałem wszystkie struktury RNA rozwiązane za pomocą metod NMR i zdeponowane w bazie danych PDB, które posiadały pojedynczą wybrzuszoną resztę adenozyiny ograniczoną z każdej strony przynajmniej trzema kanonicznymi parami typu Watsona-Cricka lub G:U. W wyniku przeszukania otrzymałem tylko sześć takich motywów w strukturach o następujących identyfikatorach PDB: 17RA²³⁵, 1LMV²³², 1K8S²³³, 1NCO²³⁴, 1D0U²³⁶, 1SLP²⁴⁶. We wszystkich tych strukturach NMR, z wyjątkiem 1SLP, wybrzuszona reszta adenozyiny interkaluje pomiędzy sąsiadujące z nią pary zasad. W przypadku struktury 1SLP wybrzuszenie jest częścią dziewięcionukleotydowej pętli apikalnej splicingowego lidera RNA i dlatego struktura ta zostanie wyłączona z dalszej dyskusji. Konformacja i dynamika pozostałych jednonukleotydowych wybrzuszeń adenozynowych różni się w zależności od typu zasad ograniczających wybrzuszenie. Kiedy dwie pary G:C lub C:G bezpośrednio sąsiadują z wybrzuszoną resztą adenozyiny, motywy 5'-GAG-3'/5'-CC-3' albo 5'-CAC-3'/5'-GG-3' (PDB: 1K8S, 1NCO, 1D0U), sygnały rezonansowe protonów iminowych sąsiadujących reszt guanozyny są na widmach NMR widoczne i łatwe do identyfikacji ze względu na oddziaływania z protonami komplementarnych reszt cytydyny. Oznacza to, że gdy pary zasad C:G i G:C ograniczają wybrzuszenie to tworzą one kanoniczne pary Watsona-Cricka i są bardzo stabilne. Inna sytuacja występuje wówczas, gdy mamy do czynienia z motywem dwóch sąsiadujących ze sobą reszt adenozyiny w jednym łańcuchu i pojedynczej urydyny w nici komplementarnej. W tym przypadku możliwe są dwie struktury drugorzędowe, jak w analizowanej przeze mnie strukturze cząsteczki **II**. W jednej ze znalezionych struktur (PDB: 1LMV), we fragmencie

o sekwencji 5'-UAAC-3'/5'-GUA-3', obserwowana była niezaburzona struktura helikalna typu A-RNA z dwoma resztami adenozyiny oddziałującymi warstwowo, skierowanymi do wnętrza helisy. Obie reszty adenozyiny tworzyły wiązania wodorowe z naprzeciwległą urydyną. Ponieważ w widmach nie obserwowano oddzielnych sygnałów NOE dla dwóch możliwych struktur drugorzędowych, autorzy sugerowali, że istnieje heterogeniczna dynamiczna konformacja charakteryzująca się szybką wymianą protonów w regionie wybrzuszenia, co poświadczono zostało dodatkowo obserwowanym poszerzeniem sygnałów H2', H3' i H4' obu reszt adenozyinowych. Ta dynamika wskazywała również na możliwość istnienia równowagi pomiędzy strukturą *stack-in* oraz *loop-out*. W strukturze PDB: 17RA z motywem o sekwencji 5'-UAAG-3'/5'-CUA-3', sygnały od protonów wymieniających reszty znajdującej się w regionie wybrzuszenia, w tym również sygnałów iminowych protonów par zasad ograniczających wybrzuszenie były bardzo słabe lub niewidoczne. Uniemożliwiło to autorom jednoznaczne zidentyfikowanie pary A:U w miejscu wybrzuszenia. W strukturze tej obie reszty adenozyiny oddziałują ze sobą warstwowo i są skierowane do wnętrza helisy. Wszystkie dane NMR były zgodne z istnieniem obu możliwych par zasad A:U, jednak nie można było na ich podstawie określić dominującej konformacji. Dodatkowe eksperymenty przeprowadzone w warunkach obniżonego pH, w których reszta adenozyiny ulegała protonacji wskazywały, że główną konformacją jest struktura, w której adenozyina od strony 5' końca tworzy parę z urydyną.

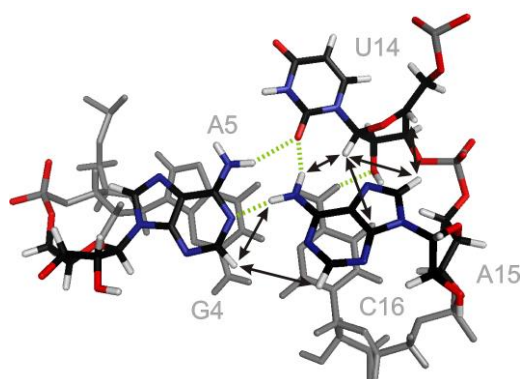
W badanej przeze mnie strukturze z motywem o sekwencji 5'-GAAG-3'/5'-CUC-3' (dupleks II), jednoznacznie wykazałem, w oparciu o pomiar efektu NOE, że niesparowaną resztą jest adenozyina A5. W przeciwieństwie do opisywanej powyżej struktury 17RA, w otrzymanej przeze mnie strukturze dupleksu to reszta adenozyiny od końca 3' tworzy parę z urydyną U17 w nici komplementarnej. Wynik ten jest także zgodny z badaniami termodynamicznymi, które wskazują, że pojedyncze wybrzuszenia nukleotydowe bardziej preferują położenie bliżej końców helisy²⁴⁷.

Porównanie znanych struktur NMR, zawierających pojedynczą wybrzuszona resztę adeniny zamkniętą przez dwie pary zasad Watsona-Cricka lub pary G:U, dostarcza informacji na temat uprzywilejowanej konformacji regionu wybrzuszenia. Kiedy wybrzuszona reszta nie jest identyczna z żadną z sąsiednich reszt, tworzą się stabilne, struktury z dobrze zdefiniowanymi parami zasad, ograniczającymi interkalującą pomiędzy nie resztę adenozyiny. Jeżeli dwie sąsiadujące reszty adenozyiny umiejscowione są naprzeciw jednej urydiny w nici komplementarnej, wówczas możliwe są różne konformacje – każda z dwóch reszt adenozyiny

może tworzyć parę z urydyną, może istnieć równowaga pomiędzy tymi konformacjami, a także możliwa jest równowaga pomiędzy strukturą typu *stack-in* i *loop-out*.

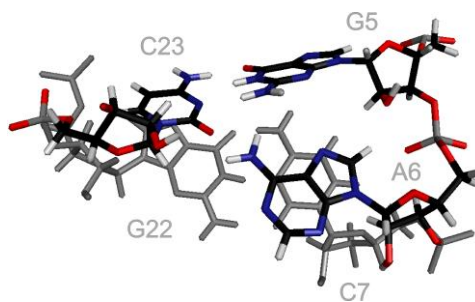
Druga spośród analizowanych przeze mnie struktur z pojedynczą niesparowaną resztą adenozyiny (dupleks o sekwencji **V**) przyjmuje zupełnie inną konformację aniżeli te opisane dotychczas. W cząsteczce tej niesparowana reszta **A5** znajduje się po stronie małej bruzdy tworząc trójkę oddziałujących zasad z sąsiadującą po stronie 5' parą **G4:C14**. Taki motyw w strukturze o sekwencji 5'-GAG-3'/5'-CC-3' był przewidziany wcześniej jedynie poprzez symulacje dynamiki molekularnej^{248,249}. Wyniki symulacji przeprowadzonej przez dr Ł. Bieleckiego potwierdzają tworzenie się stabilnej trójki zasad **C14:G4-A5** w strukturze **V**. W strukturach otrzymanych przeze mnie układ wiązań wodorowych sugerowany przez obliczenia NMR przyczynia się do stabilizacji konformacji tego motywu. Analiza struktur NMR ukazuje, że oddziaływania warstwowe pomiędzy resztą **A5**, a sąsiadującą od strony 3' guanozyną **G6** dodatkowo stabilizują tę nietypową dla małych cząsteczek RNA konformację. W opisywanych poprzednio strukturach z wybrzuszeniem adenozyinowym ograniczonym parami zasad G:C^{233,234}, pojedyncza wybrzuszona reszta interkaluje pomiędzy sąsiadujące pary zasad. Wyniki moich badań potwierdzają, że konformacja wybrzuszony zasady może zależeć nie tylko od otaczających ją reszt, ale również od sekwencji zasad, nie sąsiadujących bezpośrednio z wybruszeniem, jak również od długości fragmentów dwuniciowych ograniczających wybruszenie. Niezwykle interesującym wydaje mi się sprawdzenie, jak zmiana długości fragmentów dwuniciowych i modyfikacja sekwencji zasad nie graniczących z wybrzuszoną resztą **A5** wpłynie na orientację tej reszty. Niestety badania te wykroczyły poza zakres mojej rozprawy doktorskiej.

Według mojej wiedzy istnieją tylko dwie struktury NMR, w których jednonukleotydowe wybruszenie zaangażowane jest w formowanie trójki zasad. W strukturze spinki SL2 sygnału pakowania Ψ RNA wirusa HIV-1, wybrzuszona reszta adenozyinowa, w motywie o sekwencji 5'-UAC-3'/5'-GA-3' tworzy trójkę zasad A-U-A²⁵⁰. W strukturze tej zaangażowanie reszty adenozyiny w tworzenie trójki zasad doprowadziło do rozerwania sąsiadującej od strony końca 5' kanonicznej pary A:U. W tym przypadku konformacja stabilizowana jest również przez kilka niekanonicznych wiązań wodorowych (Rys. 101).



Rys. 101. Fragment struktury PDB: 1ESY przedstawiający trójkę oddziałujących zasad **A5-U14-A15** i sąsiadującą po stronie 3' parę zasad **G4-C16**. Wiązania wodorowe postulowane z danych NMR zaznaczone zostały kolorem zielonym, natomiast czarnymi strzałkami nietypowe kontakty NOE²⁵⁰.

Drugi przykład struktury z platformą adenozynową o sekwencji 5'-GAC-3'/5'-GC-3' znalazłem w strukturze trzonu P4 RNazy P, w której obie pary ograniczające wybrzuszenie adenozynowe są parami Watsona-Cricka, a wybrzuszona reszta tworzy trójkę zasad z sąsiadującą po stronie 5' guanozyną²⁵¹ (Rys. 102). Niestety, w pracy tej nie ma informacji na temat więzów, jakie zostały użyte do otrzymania tej struktury, motyw ten nie jest też szczegółowo dyskutowany. Choć autor nie analizuje dokładnie widm NMR, to zamieszczony w jego publikacji fragment widma 2D NOESY, przedstawiający region aromatyczno-anomeryczny, wykazuje obecność podobnych sygnałów korelacyjnych pochodzących od regionu wybrzuszenia, jakie obserwowałem w moich badaniach dotyczących dupleksu **V**. Analiza zamieszczonego widma ujawniła obecność zarówno nieprzerwanej ścieżki sekwencyjnej H6/H8-H1' dla reszt regionu wybrzuszenia, jak i sygnału pomiędzy protonami **G5:H8** i **C7:H1'**. Ponadto dostrzec można na widmie korelacje protonu **A6:H2** do protonu H1' reszty **C23**. Na zamieszczonym w pracy iminowo-iminowym fragmencie widma 2D NOESY wykonanym w mieszaninie 90% H₂O/10% D₂O autor także obserwuje nieprzerwaną ścieżkę także pomiędzy protonami guanozyn zamykających wybrzuszenie. Obecność opisanych powyżej sygnałów wydaje się być charakterystyczna dla tego motywu strukturalnego. Być może w przyszłości sygnały te stanowią będą swoisty „odcisk palca” dla szybkiej identyfikacji struktur, w których wybrzuszona reszta adenozyiny zaangażowana jest w tworzenie trójki zasad z parą zasad z końca 5'.



Rys. 102. Fragment struktury PDB: 1XSG obejmujący trójkę oddziałujących zasad G5-A6-C23 oraz parę zasad C7:G22.

W bazie danych RNA FRABASE wyszukałem również motywy zawierające pojedynczą niesparowaną resztę urydyny. Wśród znalezionych struktur NMR o motywie 5'-GUG-3'/5'-CC-3', znajdowano się pięć struktur o identyfikatorach: 1JP0²³⁹, 1P5P⁶², 1S34²³⁷, 2IXY²⁵² oraz 1S9S⁹⁶, w których wybrzuszona reszta ograniczona była przez dwie kanoniczne pary zasad po obu stronach. W trzech z nich, reszta urydyny znajduje się po stronie małej bruzdy i oddziałuje z resztą znajdującą się po stronie 5' końca, podobnie jak w badanym przeze mnie dupleksie **VI**. Jest to zgodne z wynikami badań prowadzonych metodami symulacji dynamiki molekularnej²⁴⁹, które pokazują, że mononukleotydowe wybrzuszenia urydynowe umiejscawiają się zazwyczaj w małej bruzdzie. W przypadku struktury PDB: 2IXY konformacja wybrzuszonej reszty nie była ustalona ze względu na dużą dynamikę opisywanego motywu. Natomiast w ostatniej analizowanej strukturze (PDB: 1S9S), urydyna lokuje się w dużej bruzdzie dupleksu.

W przypadku struktur posiadających wybrzuszenia składające się z kilku niesparowanych reszt można spodziewać się dużo większej różnorodności strukturalnej. Ich konformacji nie da się opisać jedynie jako interkalację czy też wyrzucenie wszystkich reszt poza helisę. W jedynej poznanej dotąd strukturze która zawiera dwie wybrzuszone reszty adenozyne (o sekwencji helisy III 5S rRNA z oocytów *Xenopus laevis*) i ustalonej metodami spektroskopii NMR, zaobserwowano istnienie w równowadze kilku różnych form strukturalnych²⁵³.

Przeszukałem także bazę pod kątem struktur, w których obecny byłby motyw trzech reszt adenozytowych umiejscowionych naprzeciw jednej reszty urydyny i ograniczony z obu stron kanonicznymi parami zasad. Jednakże wśród zdeponowanych w bazie danych PDB struktur nie znalazłem ani jednej takiej struktury, która byłaby otrzymana w roztworze. Motyw ten jedynie był obecny w strukturach krystalograficznych, przy czym większość ze znalezionych fragmentów należało do dużych jednostek rybosomalnych. W strukturach tych zawsze jedna

z reszt adenozyliny wurzucona była na zewnątrz helisy, a pozostałe uczestniczyły w tworzeniu trójki zasad.

Powszechnie uważa się, iż mononukleotydowe wybrzuszenia powodują zagięcie helisy. Zagięcie osi helisy wywołane akomodacją niesparowanej reszty pomiędzy pary zasad uznawane jest za jedną z funkcji, jakie pełni ten mały element strukturalny. Ponieważ konformacja niesparowanej reszty nie jest zdeterminowana poprzez oddziaływania wodorowe z zasadą z nici komplementarnej, służyć ona może jako rodzaj giętkiego zawiasu dla szkieletu fosforocukrowego cząsteczek RNA. Zagięcie osi helisy wywołane obecnością wybrzuszeń badano wcześniej wykorzystując elektroforezę na żelu natywnym²⁵⁴⁻²⁵⁷ (PAGE), eksperymenty TEB (ang. *Transient Electric Birefringence*)²⁵⁸ i fluorescencję^{259,260}. Stwierdzono, że wybrzuszenia adenozykowe wywierają silniejszy wpływ na mobilność elektroforetyczną dupleksów RNA niż wybrzuszone reszty urydyny, co sugerowało, że interkalacja wybrzuszonej reszty pomiędzy sąsiadujące pary zasad indukuje zagięcie osi helisy. Pomiar TEB wykazały również, że zagięcie osi helisy zwiększa się wraz ze wzrostem ilości wybruszonych reszt adeniny i wynosiło 0° dla $n = 0$, 15° ($n = 1$), 42° ($n = 2$), 58° ($n = 3$) i 93° ($n = 6$).

W przypadku kwasów nukleinowych, których dwuniciowe regiony przyjmują często wydłużone kształty, na podstawie samej tylko analizy oddziaływań NOE i sprzężeń skalarnych, które mają charakter lokalny, trudno jest wyciągnąć informację o zagięciu osi helisy. Brak informacji o oddziaływaniach dalekiego zasięgu uniemożliwia także ustalenie wzajemnej orientacji odległych części cząsteczki. Podjęta przeze mnie próba oszacowania zagięcia osi helisy otrzymanych struktur nie powiodła się. Program Curves, powszechnie w tym celu używany, dawał niewiarygodne wartości prawdopodobnie z powodu zbyt krótkich fragmentów dwuniciowych obecnych w tych strukturach.

VI. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

W celu określenia konformacji wybrzuszonych reszt nukleotydowych oraz wpływu, jaki ich obecność wywiera na strukturę krótkich dupleksów RNA otrzymano drogą syntezy chemicznej sześć cząsteczek RNA (**I-VI**), które następnie zostały szczegółowo zbadane za pomocą metod biomolekularnej spektroskopii NMR.

Przedstawione w rozprawie główne etapy analizy strukturalnej obejmowały:

- rejestrację widm 1D i 2D NMR,
- analizę widm oraz przypisanie sygnałów rezonansowych ^1H , ^{13}C i ^{31}P NMR,
- wyznaczenie więzów strukturalnych,
- generowanie struktur metodami restryktywnej dynamiki molekularnej oraz ich analizę,
- porównanie otrzymanych struktur i ich wizualizację.

W trakcie wykonywania widm NMR dupleksu zawierającego cztery kolejne reszty adenozyne w jednej z nici oligorybonukleotydowych (**IV**) zauważyłem, że widmo dupleksu ulega zmianie i pojawiają się dodatkowe sygnały wskazujące na degradację próbki. W ciągu kilkudziesięciu godzin nastąpiła całkowita degradacja preparatu, co uniemożliwiło mi wykonanie pełnej serii widm i tym samym wyznaczenie struktury tego dupleksu.

Dla pozostałych pięciu cząsteczek wykonałem serie widm NMR, w oparciu o które dokonałem przypisania sygnałów rezonansowych. Następnie, na podstawie analizy tych sygnałów, określiłem więzy strukturalne, które wykorzystane zostały do obliczeń strukturalnych metodą rMD zaimplementowaną w programie Xplor-NIH. W celu otrzymania struktur przestrzennych zastosowałem metodę dynamiki molekularnej z protokołem symulowanego wyżarzania. W wyniku obliczeń, wychodząc zawsze z 50 przypadkowych struktur liniowych, otrzymałem struktury, które były zgodne z danymi NMR. W ten sposób uzyskałem odpowiednio 40 struktur dla dupleksu referencyjnego (**I**), 36 dla dupleksu z jedną niesparowaną resztą adenozyne (**II**), i 37 dla dupleksu z trzema kolejnymi resztami adenozyne znajdującymi się na przeciw jednej reszty urydyny (**III**). W przypadku dupleksu, w którym reszta adenozyne uczestniczyła w tworzeniu trójki zasad (**V**), w wyniku obliczeń uzyskałem 38 struktur, a dla dupleksu z niesparowaną resztą urydyny (**VI**) – 36 struktur. Wszystkie te struktury zachowywały prawidłową stereochemię oraz nie naruszały odległościowych ($\leq 0.3 \text{ \AA}$) i kątowych ($\leq 5^\circ$) więzów NMR. Do dalszej analizy wybrałem po 10 struktur charakteryzujących się najniższą energią potencjalną. Dla każdej z końcowych struktur dokonałem za pomocą programu Curves analizy kątów torsyjnych, wyznaczyłem

parametry pofałdowania pierścieni rybozy oraz parametry helikalne. W kolejnym kroku porównałem otrzymane struktury dupleksu **II** i **III** z dupleksem referencyjnym **I**. Porównałem także struktury cząsteczek **V** i **VI**. Przeprowadziłem również porównanie otrzymanych przeze mnie struktur z zawierającymi podobne motywy strukturami zdeponowanymi w bazie danych PDB.

Dla cząsteczek **II** i **III** określiłem jednoznacznie schemat parowania się zasad w dupleksach zawierających dwie lub trzy kolejne reszty adenozyne umieszczone naprzeciw jednej, komplementarnej do nich, urydyny. W przypadku dupleksu **II**, z dwoma sąsiadującymi resztami adenozyne, reszta urydyny tworzy parę z resztą znajdującą się bliżej końca 3'. W przypadku dupleksu z trzema kolejnymi resztami adenozyne nie tworzy się wybrzuszenie, lecz pętla wewnętrzna. Wprowadzenie do sekwencji jednej lub dwóch dodatkowych jednostek adenozynowych nie wywołuje globalnych zmian w strukturze dupleksu. Niesparowane reszty adenozyne są zorientowane do wnętrza helisy, a konformacja tego regionu jest stabilizowana poprzez oddziaływania warstwowe. W stosunku do dupleksu referencyjnego zmiany wywołane akomodacją dodatkowych reszt obejmują głównie pary zasad sąsiadujące z wybrzuszeniem. Region ten charakteryzuje się największą dynamiką, przy czym jest ona tym większa, im dłuższy jest ciąg reszt adenozynowych. Można również zauważyć tendencję pokazującą, że w regionach helikalnych znajdujących się po stronie 5' wybrzuszeń wraz ze wzrostem liczby reszt adenozynowych następuje zmniejszenie średnicy kanału biegnącego wzdłuż osi helisy. Im większa jest liczba tych reszt, tym średnica kanału jest mniejsza. Wraz ze zmianą parametru *x-displacement* maleje także nachylenie par zasad względem osi helisy.

Badane przeze mnie dupleksy z wybrzuszeniem jednonukleotydowym A lub U, ograniczonym parami zasad G:C, zdecydowanie różnią się strukturalnie. Wybrzuszona reszta adenozyne tworzy trójkę zasad z kanoniczną parą G:C znajdującą się po stronie 5'. Obecność dodatkowych, niekanonicznych wiązań wodorowych pomiędzy resztą **A5** a parą zasad **G4:C14**, oraz oddziaływań warstwowych pomiędzy resztą **A5** i **G6** stabilizuje ten motyw strukturalny. W przeciwieństwie do struktury **V**, niesparowana urydyna dupleksie **VI** nie oddziałuje z sąsiednimi parami zasad i jest wyrzucona na zewnątrz dupleksu, kierując się w stronę małej bruzdy. Cechą charakterystyczną obu tych dupleksów jest fakt, że pierścień cukrowy reszty poprzedzającej wybrzuszenie znajduje się w nietypowej konformacji S.

Zastosowana przeze mnie metodyka pozwoliła wyznaczyć struktury dupleksów z dokładnością atomową. Współrzędne kartezjańskie dla dupleksów zdeponowane zostały w bazie PDB pod następującymi identyfikatorami: 2JXQ, 2JXS, 2K3Z, 2K41.

Uzyskane widma i wyniki moich badań były również wykorzystane do testowania algorytmu automatycznej analizy widm NMR^{261,262}.

VI. LITERATURA

1. Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E. The Protein Data Bank. *Nucl. Acids Res.* **2000**, *28* (1), 235-242.
2. Westhof, E.; Fritsch, V. RNA folding: beyond Watson-Crick pairs. *Structure* **2000**, *8* (3), R55-R65.
3. Moore, P. B. Structural motifs in RNA. *Annu. Rev. Biochem.* **1999**, *68*, 287-300.
4. Gutell, R. R.; Weisser, B.; Woese, C. R.; Noller, H. F. Comparative anatomy of 16S-like ribosomal RNA. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **1985**, *32*, 155-216.
5. Gutell, R. R.; Cannone, J. J.; Shang, Z.; Du, Y.; Serra, M. J. A story: Unpaired adenosine bases in ribosomal RNAs. *J. Mol. Biol.* **2000**, *304* (3), 335-354.
6. Burkard, M. E.; Turner, D. H.; Tinoco Jr., I. The Interactions that Shape RNA. In *RNA World II*, Gesteland, R., Cech, T., Atkins, J., Eds.; Cold Spring Harbor Press: 1999; pp 233-264.
7. Vicens, Q.; Westhof, E. Crystal structure of geneticin bound to a bacterial 16 S ribosomal RNA A site oligonucleotide. *J. Mol. Biol.* **2003**, *326* (4), 1175-1188.
8. Valegard, K.; Murray, J. B.; Stockley, P. G.; Stonehouse, N. J.; Lijias, L. Crystal structure of an RNA bacteriophage coat protein-operator complex. *Nature* **1994**, *371*, 623-626.
9. Peattie, D. A.; Douthwaite, S.; Garret, R. A.; Noller, H. F. A "bulged" double helix in a RNA-protein contact site. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **1981**, *78*, 7331-7335.
10. Egli, M. Nucleic acid crystallography: current progress. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8* (6), 580-591.
11. Turner, D. H. Bulges in nucleic acids. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1992**, *2*, 334-337.
12. Hermann, T.; Patel, D. J. RNA bulges as architectural and recognition motifs. *Structure* **2000**, *8*, R47-R54.
13. Sudarsanakumar, Ch.; Xiong, M.; Sundaralingam, M. Crystal structure of an adenine bulge in the RNA chain of a DNA-RNA hybrid, d(CTCCTCTTC)-r(gaagagagag). *J. Mol. Biol.* **2000**, *299*, 103-112.
14. Portmann, S.; Grimm, S.; Workman, C.; Usman, N.; Egli, M. Crystal structures of an A-form duplex with single-adenosine bulges and a conformational basis for site-specific RNA self-cleavage. *Chem. Biol.* **1996**, *3* (3), 173-184.
15. Ennifar, E.; Yusupov, M.; Walter, P.; Marquet, R.; Ehresmann, B.; Ehresmann, C.; Dumas, P. The crystal structure of the dimerization initiation site of genomic HIV-1 RNA reveals an extended duplex with two adenine bulges. *Structure* **1999**, *7* (11), 1439-1449.
16. Tereshko, V.; Wallace, S. T.; Usman, N.; Wincot, F. E.; Egli, M. X-ray crystallographic observation of "in-line" and "adjacent" conformations in a bulged self-cleaving RNA/DNA hybrid. *RNA* **2001**, *7*, 405-420.
17. Valegard, K.; Murray, J. B.; Stonehouse, N. J.; van den Worm, S.; Stockley, P. G.; Lijias, L. The three-dimensional structures of two complexes between recombinant MS2 capsids and RNA operator fragments reveal sequence-specific protein-RNA interactions. *J. Mol. Biol.* **1997**, *270*, 724-738.
18. Borer, P. N.; Lin, Y.; Wang, S.; Roggenbuck, M. W.; Gott, J. M.; Uhlenbeck, O. C.; Pelczer, I. Proton NMR and structural features of a 24-nucleotide RNA hairpin. *Biochemistry* **1995**, *34*, 6488-6503.

19. Moine, H.; Cachia, C.; Westhof, E.; Ehresmann, B.; Ehresmann, C. The RNA binding site of S8 ribosomal protein of E.coli; selex and hydroxyl radical probing studies. *RNA* **1997**, *3*, 255-268.
20. Wu, H. N.; Uhlenbeck, O. C. Role of a bulged A residue in a specific RNA-protein interaction. *Biochemistry* **1987**, *26*, 8221-8227.
21. Popenda, M.; Milecki, J.; Adamiak, R. W. High salt solution structure of a left-handed RNA double helix. *Nucl. Acids Res.* **2004**, *32* (13), 4044-4054.
22. Saenger, W. *Principles of Nucleic Acid Structures*; Springer-Verlag: New York, 1984.
23. Carreira, L. A.; Jiang, G. J.; Person, W. B.; Willis, J. N., Jr. Spectroscopic Determination of the Barrier to Planarity in Cyclopentane. *J. Chem. Phys.* **1972**, *56*, 1440-1443.
24. Altona, C.; Sundaralingam, M. Conformational analysis of the sugar ring in nucleosides and nucleotides. New description using the concept of pseudorotation. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94* (23), 8205-8212.
25. Altona, C.; Sundaralingam, M. Conformational analysis of the sugar ring in nucleosides and nucleotides. Improved method for the interpretation of proton magnetic resonance coupling constants. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95* (7), 2333-2344.
26. Brunck, T. K.; Weinhold, F. Quantum-Mechanical Studies on the Origin of Barriers to Internal Rotation about Single Bonds. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 1700-1709.
27. Markley J.L.; Bax, A.; Arata, Y.; Hilbers, C. W.; Kaptein, R.; Sykes, B. D.; Wright, P. E.; Wüthrich, K. Recommendations for the presentation of NMR structures of proteins and nucleic acids. IUPAC-IUBMB-IUPAB Inter-Union Task Group on the Standardization of Data Bases of Protein and Nucleic Acid Structures Determined by NMR Spectroscopy. *J. Biomol. NMR* **1998**, *12* (1), 1-23.
28. Varani, G.; Aboul-ela, F.; Allain, F. H. T. NMR investigation of RNA structure. *Prog. Nucl. Mag. Res. Sp.* **1996**, *29*, 51-127.
29. Placido, D.; Brown, B. A. 2.; Lowenhaupt, K.; Rich, A.; Athanasiadis, A. A left-handed RNA double helix bound by the Z alpha domain of the RNA-editing enzyme ADAR1. *Structure* **2007**, *15* (4), 395-404.
30. Lavery, R.; Sklenar, H. The definition of generalized helicoidal parameters and of axis curvature for irregular nucleic acids. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1988**, *6*, 63-91.
31. Lavery, R.; Sklenar, H. Defining the structure of irregular nucleic acids: conventions and principles. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1989**, *4*, 655-667.
32. Koradi, R.; Billeter, M.; Wüthrich, K. MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J. Mol. Graphics* **1996**, *14*, 51-55.
33. *The RNA World*; 1st ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1993.
34. Ippolito, J. A.; Steitz, T. A. The structure of the HIV-1 RRE high affinity rev binding site at 1.6 Å resolution. *J Mol Biol.* **2000**, *295* (4), 711-717.
35. Witherell, G. W.; Gott, J. M.; Uhlenbeck, O. C. Specific interaction between RNA phage coat proteins and RNA. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **1991**, *40*, 185-220.
36. Hampel, A.; Tritz, R.; Hicks, M.; Cruz, P. 'Hairpin' catalytic RNA model: evidence for helices and sequence requirement for substrate RNA. *Nucl. Acids Res.* **1990**, *18* (2), 299-304.
37. Pan, T.; Uhlenbeck, O. C. A small metalloribozyme with a two-step mechanism. *Nature* **1992**, *358*, 560-563.
38. Murphy, F. L.; Cech, T. R. An independently folding domain of RNA tertiary structure within the Tetrahymena ribozyme. *Biochemistry* **1993**, *32* (20), 5291-5300.
39. Wimberly, B.; Varani, G.; Tinoco, I. J. The conformation of loop E of eukaryotic 5S ribosomal RNA. *Biochemistry* **1993**, *32* (4), 1078-1087.

40. Zhong, X.; Leontis, N.; Qian, S.; Itaya, A.; Qi, Y.; Boris-Lawrie, K.; Ding, B. Tertiary structural and functional analyses of a viroid RNA motif by isostericity matrix and mutagenesis reveal its essential role in replication. *J Virol.* **2006**, *80* (17), 8566-8581.
41. Szewczak, A. A.; Moore, P. B.; Chang, Y. L.; Wool, I. G. The conformation of the sarcin/ricin loop from 28S ribosomal RNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **1993**, *90* (20), 9581-9585.
42. Turek, C.; Gauss, P.; Thermes, C.; Groebe, D. R.; Gayle, M.; Guild, N.; Stormo, G.; Aubenton-Carafa, Y. D.; Uhlenbeck, O. C.; Tinoco Jr, I.; Brody, E. N.; Gold, L. GUUCGG hairpins: extraordinarily stable RNA secondary structures associated with various biochemical processes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 1364-1368.
43. Hendrix, D. K.; Brenner, S. E.; Holbrook, S. R. RNA structural motifs: building blocks of a modular biomolecule. *Q. Rev. Biophys.* **2005**, *38* (3), 221-243.
44. Ziomek, K.; Kierzek, R. Drugorządowe motywy strukturalne RNA. *Postępy Biochemii* **1999**, *45* (2), 80-89.
45. Jucker, F. M.; Heus, H. A.; Yip, P. F.; Moors, E. H.; Pardi, A. A network of heterogeneous hydrogen bonds in GNRA tetraloops. *J. Mol. Biol.* **1996**, *264* (5), 968-980.
46. Wu, H.; Yang, P. K.; Butcher, S. E.; Kang, S.; Chanfreau, G.; Feigon, J. A novel family of RNA tetraloop structure forms the recognition site for *Saccharomyces cerevisiae* RNase III. *Embo J.* **2001**, *20* (24), 7240-7249.
47. Antao, V. P.; Lai, S. Y.; Tinoco, I. Jr. A thermodynamic study of unusually stable RNA and DNA hairpins. *Nucl. Acids Res.* **1991**, *19* (21), 5901-5905.
48. Woese, C. R.; Winker, S.; Gutell, R. R. Architecture of ribosomal RNA: constraints on the sequence of "tetra-loops". *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **1990**, *87* (21), 8467-8471.
49. Sussman, J. L.; Holbrook, S. R.; Warrant, R. W.; Church, G. M.; Kim, S. H. Crystal structure of yeast phenylalanine transfer RNA. I. Crystallographic refinement. *J. Mol. Biol.* **1978**, *123* (4), 607-630.
50. Krasilnikov, A. S.; Yang, X.; Pan, T.; Mondragón, A. Crystal structure of the specificity domain of ribonuclease P. *Nature* **2003**, *421* (6924), 760-764.
51. Kim, C. H.; Kao, C. C.; Tinoco, I. J. RNA motifs that determine specificity between a viral replicase and its promoter. *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 415-423.
52. Chang, K. Y.; Tinoco Jr., I. The structure of an RNA "kissing" hairpin complex of the HIV TAR hairpin loop and its complement. *J. Mol. Biol.* **1997**, *269* (1), 52-66.
53. Batey, R. T.; Rambo, R. P.; Doudna, J. A. Tertiary Motifs in RNA Structure and Folding. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1999**, *38* (16), 2326-2343.
54. Basu, S.; Rambo, R. P.; Strauss-Soukup, J.; Cate, J. H.; Ferré-D'Amaré, A. R.; Strobel, S. A.; Doudna, J. A. A specific monovalent metal ion integral to the AA platform of the RNA tetraloop receptor. *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5* (11), 986-992.
55. Cate, J. H.; Gooding, A. R.; Podell, E.; Zhou, K. H.; Golden, B. L.; Kundrot, C. E.; Cech, T. R.; Doudna, J. A. Crystal structure of a group I ribozyme domain: Principles of RNA packing. *Science* **1996**, *273* (5282), 1678-1685.
56. Zimmermann, G. R.; Jenison, R. D.; Wick, C. L.; Simorre, J. P.; Pardi, A. Interlocking structural motifs mediate molecular discrimination by a theophylline-binding RNA. *Nat. Struct. Biol.* **1997**, *4* (8), 644-649.
57. Costa, M.; Michel, F. Rules for RNA recognition of GNRA tetraloops deduced by in vitro selection: comparison with in vivo evolution. *Embo J.* **1997**, *16* (11), 3289-3302.
58. Wimberly, B. T.; Brodersen, D. E.; Clemons, W. M.; Morgan-Warren, R. J.; Carter, A. P.; Vornheim, C.; Hartsch, T.; Ramakrishnan, V. Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature* **2000**, *407* (6802), 327-339.

59. Ogle, J. M.; Murphy, F. V.; Tarry, M. J.; Ramakrishnan, V. Selection of tRNA by the ribosome requires a transition from an open to a closed form. *Cell* **2002**, *111*, 721-732.
60. Hansen, J. L.; Ippolito, J. A.; Ban, N.; Nissen, P.; Moore, P. B.; Steitz, T. A. The structures of four macrolide antibiotics bound to the large ribosomal subunit. *Mol. Cell* **2002**, *10*, 117-128.
61. Tishchenko, S.; Nikulin, A.; Fomenkova, N.; Nevskaya, N.; Nikonov, O.; Dumas, P.; Moine, H.; Ehresmann, B.; Ehresmann, C.; Piendl, W.; Lamzin, V.; Garber, M.; Nikonov, S. Detailed analysis of RNA-protein interactions within the ribosomal protein S8-rRNA complex from the archaeon *Methanococcus jannaschii*. *J. Mol. Biol.* **2001**, *311* (2), 311-324.
62. Lukavsky, P. J.; Kim, I.; Otto, G. A.; Puglisi, J. D. Structure of HCV IRES domain II determined by NMR. *Nat. Struct. Biol.* **2003**, *10* (12), 1033-1038.
63. Blake, R. D.; Massoulié, J.; Fresco, J. R. Polynucleotides. 8. A spectral approach to the equilibria between polyriboadenylate and polyribouridylate and their complexes. *J. Mol. Biol.* **1967**, *30* (2), 291-308.
64. Massoulié, J. Associations de poly A et poly U en milieu acide. Phénomènes irréversibles. *Eur. J. Biochem.* **1968**, *3* (4), 439-447.
65. Klinck, R.; Guittet, E.; Liquier, J.; Taillandier, E.; Gouyette, C.; Huynh-Dinh, T. Spectroscopic evidence for an intramolecular RNA triple helix. *FEBS Lett.* **1994**, *355*, 297-300.
66. Klinck, R.; Liquier, J.; Taillandier, E.; Gouyette, C.; Huynh-Dinh, T.; Guittet, E. Structural characterization of an intramolecular RNA triple helix by NMR spectroscopy. *Eur. J. Biochem.* **1995**, *233* (2), 544-553.
67. Kim, S. H.; Suddath, F. L.; Quigley, G. J.; McPherson, A.; Sussman, J. L.; Wang, A. H.; Seeman, N. C.; Rich, A. Three-dimensional tertiary structure of yeast phenylalanine transfer RNA. *Science* **1974**, *185* (149), 435-440.
68. Robertus, J. D.; Ladner, J. E.; Finch, J. T.; Rhodes, D.; Brown, R. S.; Clark, B. F.; Klug, A. Structure of yeast phenylalanine tRNA at 3 Å resolution. *Nature* **1974**, *250* (467), 546-551.
69. Jack, A.; Lander, J. E.; Klug, A. Crystallographic refinement of yeast phenylalanine transfer RNA at 2.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **1976**, *108*, 619-649.
70. Puglisi, J. D.; Williamson, J. R. RNA interaction with small ligands and peptides. In *RNA World II*, Cech, T., Gesteland, R., Eds.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: NY, 1999; pp 403-425.
71. Lilley, D. M. Folding of branched RNA species. *Biopolymers* **1998**, *48* (2-3), 101-112.
72. Lilley, D. M. Structures of helical junctions in nucleic acids. *Q. Rev. Biophys.* **2000**, *33*, 109-159.
73. Lescoute, A.; Westhof, E. Topology of three-way junctions in folded RNAs. *RNA* **2006**, *12*, 83-93.
74. Scott, W. G.; Finch, J. T.; Klug, A. The crystal structure of an all-RNA hammerhead ribozyme: a proposed mechanism for RNA catalytic cleavage. *Cell* **1995**, *81* (7), 991-1002.
75. Kieft, J. S.; Zhou, K.; Grech, A.; Jubin, R.; Doudna, J. A. Crystal structure of an RNA tertiary domain essential to HCV IRES-mediated translation initiation. *Nat. Struct. Biol.* **2002**, *9* (5), 370-374.
76. Amiri, K. M.; Hagerman, P. J. Global conformation of a self-cleaving hammerhead RNA. *Biochemistry* **1994**, *33* (45), 13172-13177.
77. Tuschl, T.; Gohlke, C.; Jovin, T. M.; Westhof, E.; Eckstein, F. A three-dimensional model for the hammerhead ribozyme based on fluorescence measurements. *Science* **1994**, *266* (5186), 785-789.

78. Bassi, G. S.; Mollegaard, N. E.; Murchie, A. I.; von Kitzing, E.; Lilley, D. M. J. Ionic interactions and the global conformations of the hammerhead ribozyme. *Nature Struct. Biol.* **1995**, *2*, 45-55.
79. Bassi, G. S.; Murchie, A. I.; Lilley, D. M. J. The ion-induced folding of the hammerhead ribozyme: core sequence changes that perturb folding into the active conformation. *RNA* **1996**, *2*, 756-768.
80. Rastogi, T.; Beattie, T. L.; Olive, J. E.; Collins, R. A. A long-range pseudoknot is required for activity of the Neurospora VS ribozyme. *Embo J.* **1996**, *15* (11), 2820-2825.
81. Ke, A.; Zhou, K.; Ding, F.; Cate, J. H.; Doudna, J. A. A conformational switch controls hepatitis delta virus ribozyme catalysis. *Nature* **2004**, *429* (6988), 201-205.
82. Adams, P. L.; Stahley, M. R.; Kosek, A. B.; Wang, J.; Strobel, S. A. Crystal structure of a self-splicing group I intron with both exons. *Nature* **2004**, *430* (6995), 45-50.
83. Theimer, C.; Blois, C.; Feigon, J. Structure of the human telomerase RNA pseudoknot reveals conserved tertiary interactions essential for function. *Mol. Cell* **2005**, *17* (5), 671-682.
84. Chen, J. L.; Greider, C. W. Functional analysis of the pseudoknot structure in human telomerase RNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **2005**, *102* (23), 8080-8085.
85. Adams, P. L.; Stahley, M. R.; Kosek, A. B.; Wang, J.; Strobel, S. A. Crystal structure of a group I intron splicing intermediate. *RNA* **2004**, *10*, 1867-1887.
86. Kuo, M. Y.; Sharmeen, L.; Dinter-Gottlieb, G.; Taylor, J. Characterization of self-cleaving RNA sequences on the genome and antigenome of human hepatitis delta virus. *J. Virol.* **1998**, *62*, 4439-4444.
87. Staple, D. W.; Butcher, S. E. Pseudoknots: RNA structures with diverse functions. *PLoS Biol.* **2005**, *3* (6), e213.
88. Shen, L. X.; Tinoco, I. J. The structure of an RNA pseudoknot that causes efficient frameshifting in mouse mammary tumor virus. *J. Mol. Biol.* **1995**, *247*, 963-978.
89. Nixon, P. L.; Rangan, A.; Kim, Y. G.; Rich, A.; Hoffman, D. W.; Hennig, M.; Giedroc, D. P. Solution structure of a luteoviral P1-P2 frameshifting mRNA pseudoknot. *J. Mol. Biol.* **2002**, *322*, 621-633.
90. Michiels, P. J.; Versleijen, A. A.; Verlaan, P. W.; Pleij, C. W.; Hilbers, C. W.; Heus, H. A. Solution structure of the pseudoknot of SRV-1 RNA, involved in ribosomal frameshifting. *J. Mol. Biol.* **2001**, *310* (5), 1109-1123.
91. Egli, M.; Minasov, G.; Su, L.; Rich, A. Metal ions and flexibility in a viral RNA pseudoknot at atomic resolution. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 4302-4307.
92. Doudna, J. A.; Cech, T. R. The chemical repertoire of natural ribozymes. *Nature* **2002**, *418* (6894), 222-228.
93. Wilson, D. S.; Szostak, J. W. In vitro selection of functional nucleic acids. *Annu. Rev. Biochem.* **1999**, *68*, 611-647.
94. Ferre-d'Amare, A. R.; Zhou, K.; Doudna, J. A. Crystal structure of a hepatitis delta virus ribozyme. *Nature* **1998**, *395* (6702), 567-574.
95. Gdaniec, Z. Spektroskopia NMR w badaniach strukturalnych kwasów nukleinowych. Część I. *Wiadomości Chemiczne* **2005**, *59*, 47-65.
96. D'Souza, V.; Dey, A.; Habib, D.; Summers, M. F. NMR structure of the 101-nucleotide core encapsidation signal of the Moloney murine leukemia virus. *J. Mol. Biol.* **2004**, *337*, 427-442.
97. Flinders, J.; Dieckmann, T. NMR spectroscopy of ribonucleic acids. *Prog. Nucl. Mag. Res. Sp.* **2006**, *48* (2-3), 137-159.
98. Ejchart, A.; Gryff-Keller, A. *NMR w cieczach. Zarys teorii i metodologii*; Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej: Warszawa, 2004.

99. Noggle, J. H.; Schirmer R.E. *The Nuclear Overhauser Effect: Chemical Applications.*; Academic Press: New York, 1971.
100. Neuhaus, D.; Williamson, M. P. *The nuclear Overhauser effect in structural and conformational analysis*; Second ed.; Wiley-VCH: New York, 2000.
101. Hoogstraten, C. G.; Pardi, A. Improved distance analysis in RNA using network-editing techniques for overcoming errors due to spin diffusion. *J. Biomol. NMR* **1998**, *11* (1), 85-95.
102. James, T. L. Relaxation matrix analysis of twodimensional nuclear Overhauser effect spectra. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1991**, *1* (6), 1042-1053.
103. Karplus, M. Contact Electron-Spin Coupling of Nuclear Magnetic Moments. *J. Chem. Phys.* **1959**, *30*, 11-15.
104. Marino, J. P.; Schwalbe, H.; Griesinger, C. *J*-coupling restraints in RNA structure determination. *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 614-623.
105. Gorenstein, D. G. *Phosphorus-31 NMR: Principles and applications*; Academic Press: Orlando, FL, 1984.
106. Latham, M. P.; Brown, D. J.; McCallum, S. A.; Pardi, A. NMR methods for studying the structure and dynamics of RNA. *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1492-1505.
107. Zhou, H.; Vermeulen, A.; Jucker, F. M.; , P. A. Incorporating residual dipolar couplings into NMR solution structure determinations of nucleic acids. *Biopolymers* **1999**, *52*, 168-180.
108. Lukavsky, P. J.; Puglisi, J. D. Structure determination of large biological RNAs. *Methods Enzymol.* **2005**, *394*, 399-416.
109. Ottiger, M.; Bax, A. Bicelle-based liquid crystals for NMR-measurement of dipolar couplings at acidic and basic pH values. *J. Biomol. NMR* **1999**, *13* (2), 187-191.
110. Clore, G. M.; Starich, M. R.; Gronenborn, A. M. Measurement of residual dipolar couplings of macromolecules aligned in the nematic phase of a colloidal suspension of rod-shaped viruses. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10571-10572.
111. Hansen, M. R.; Hanson, P.; Pardi, A. Filamentous bacteriophage for aligning RNA, DNA, and proteins for measurement of nuclear magnetic resonance dipolar coupling interactions. *Meth. Enzymology* **2000**, *317*, 220-240.
112. Hansen, M. R.; Hanson, P.; Pardi, A. Pf1 filamentous phage as an alignment tool for generating local and global structural information in nucleic acids. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2000**, *S2*, 365-369.
113. Koenig, B. W.; Hu, J.-S.; Ottiger, M.; Bose, S.; Hendler, R. W.; Bax, A. NMR measurements of dipolar couplings in proteins aligned by transient binding to purple membrane fragments. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1385-1386.
114. Sass, J.; Cordier, F.; Hoffmann, A.; Cousin, A.; Omichinski, J. G.; Lowen, H.; Grzesiek, S. Purple membrane induced alignment of biological macromolecules in the magnetic field. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121* (10), 2047-2055.
115. Sass, J.; Musco, G.; Stahl, S. J.; Wingfield, P.; Grzesiek, S. Solution NMR of proteins within polyacrylamide gels: diffusional properties and residual alignment by mechanical stress or embedding of oriented purple membrane. *J. Biomol. NMR* **2000**, *18*, 303-309.
116. Tycko, R.; Blanco, F. J.; Ishii, Y. Alignment of Biopolymers in Strained Gels: A New Way to Create Detectable Dipole-Dipole Couplings in High-Resolution Biomolecular NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9340-9341.
117. Gayathri, C.; Bothner-By, A. A.; van Zijl, P. C. M.; MacLean, C. Dipolar magnetic-field effects in NMR-spectra of liquids. *Chem. Phys. Lett.* **1982**, *87*, 192-196.

118. Clore, G. M.; Gronenborn, A. M.; Tjandra, N. Direct refinement against residual dipolar couplings in the presence of rhombicity of unknown magnitude. *J. Magn. Reson.* **1998**, *131*, 159-162.
119. Tjandra, N.; Tate, S.; Ono, A.; Kainosho, M.; Bax, A. The NMR structure of a DNA dodecamer in an aqueous dilute liquid crystalline phase. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 6190-6200.
120. Alkorta, I.; Elguero, J.; Denisov, G. S. A review with comprehensive data on experimental indirect scalar NMR spin-spin coupling constants across hydrogen bonds. *Magn. Reson. Chem.* **2008**, *46*, 599-624.
121. Zdek L.V.; Stefl R.; Sklenar V.V. NMR methodology for the study of nucleic acids. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2001**, *11* (3), 275-281.
122. Clore, G. M.; Kuszewski, J. Improving the accuracy of NMR structures of RNA by means of conformational database potentials of mean force as assessed by complete dipolar coupling cross-validation. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (6), 1518-1525.
123. Cromsig, J. A.; Hilbers, C. W.; Wijmenga, S. S. Prediction of proton chemical shifts in RNA. Their use in structure refinement and validation. *J. Biomol. NMR* **2001**, *21* (1), 11-29.
124. Güntert, P. Structure calculation of biological macromolecules from NMR data. *Q. Rev. Biophys.* **1998**, *31*, 145-237.
125. Blumenthal, L. M. *Theory and Applications of Distance Geometry*; Oxford University Press: 1953.
126. Crippen, G. M.; Havel, T. F. *Distance Geometry and Molecular Conformation.*; Research Studies Press: Taunton, UK, 1988.
127. Blumenthal, L. M. *Theory and applications of distance geometry.*; Oxford University Press: 1953.
128. Crippen, G. M. A novel approach to the calculation of conformation: Distance Geometry. *J. Comp. Phys.* **1977**, *24*, 96-107.
129. Powell, M. J. D. Restart procedures for the conjugate gradient method. *Math. Programming* **1977**, *12*, 241-254.
130. Hockney, R. W. The potential calculation and some applications. *Meth. Comput. Phys.* **1970**, *9*, 136-211.
131. Verlet, L. Computer "experiments" on classical fluids. I. Thermodynamical properties of Lennard-Jones molecules. *Phys. Rev.* **1967**, *159*, 98-103.
132. Beeman, D. Some multistep methods for use in molecular dynamics calculations. *J. Comput. Phys.* **1976**, *20*, 130-139.
133. Ryckaert, J. P.; Cicotti, G.; Berensden, H. J. C. Numerical integration of the Cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of *n*-alkanes. *J. Comput. Phys.* **1977**, *23*, 327-341.
134. Brunger, A. T. *X-Plor Version 3.1: System for X-ray Crystallography and NMR*; Yale University Press: New Haven, 1992.
135. Weiner, S. J.; Kollman, P. A.; Nguyen, D. T.; Case, D. A. An all atom force field for simulations of proteins and nucleic acids. *J. Comput. Chem.* **1986**, *7* (2), 230-252.
136. Cornell, W. D.; Cieplak, P.; Bayly, C. I.; Gould, I. R.; Merz, K. M.; Ferguson, D. M.; Spellmeyer, D. C.; Fox, T.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A. A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117* (19), 5179-5197.
137. Duan, Y.; Wu, C.; Chowdhury, S.; Lee, M. C.; Xiong, G.; Zhang, W.; Yang, R.; Cieplak, P.; Luo, R.; Lee, T.; Caldwell, J.; Wang, J.; Kollman, P. A point-charge force field for molecular mechanics simulations of proteins based on condensed-phase quantum mechanical calculations. *J. Comp. Chem.* **2003**, *24* (16), 1999-2012.

138. Brooks, B. R.; Bruccoleri, R. E.; Olafson, D. J.; States, D. J.; Swaminathan, S.; Karplus, M. CHARMM: A Program for Macromolecular Energy, Minimization, and Dynamics Calculations. *J. Comp. Chem.* **1983**, *4*, 187-217.
139. Dauber-Osguthorpe, P.; Roberts, V. A.; Osguthorpe, D. J.; Wolff, J.; Genest, M.; Hagler, A. T. Structure and energetics of ligand binding to proteins: Escherichia coli dihydrofolate reductase-trimethoprim, a drug-receptor system. *Proteins* **1988**, *4* (1), 31-47.
140. Hermans, J.; Berendsen, H. J. C.; van Gunsteren, W. F.; Postma, J. P. M. A consistent empirical potential for water-protein interactions. *Biopolymers* **1984**, *23*, 1513-1518.
141. Pranata, J.; Wierschke, S. G.; Jorgensen, W. L. OPLS potential functions for nucleotide bases. Relative association constants of hydrogen-bonded base pairs in chloroform. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113* (8), 2810-2819.
142. Arnold, V. I. *Mathematical methods of classical mechanics*; Springer-Verlag: New York and Berlin, 1978.
143. Bae, D. S.; Haug, E. J. A recursive formulation for constrained mechanical system dynamics: Part I. Open loop systems. *Mech. Struct. Mach.* **1987**, *15* (3), 359-382.
144. Güntert, P.; Mumenthaler, C.; Wüthrich, K. Torsion angle dynamics for NMR structure calculation with the new program DYANA. *J. Mol. Biol.* **1997**, *273*, 283-298.
145. Jain, A.; Vaidehi, N.; Rodriguez, G. A fast recursive algorithm for molecular dynamics simulation. *J. Comput. Phys.* **1993**, *106* (2), 258-268.
146. Kirkpatrick, S.; Gelatt Jr., C. D.; Vecchi, M. P. Optimization by Simulated Annealing. *Science* **1983**, *220* (4598), 671-680.
147. Nilges, M.; Clore, G. M.; Gronenborn, A. M. Determination of three-dimensional structures of proteins from interproton distance data by hybrid distance geometry-dynamical simulated annealing calculations. *FEBS Lett.* **1988**, *229* (2), 317-324.
148. Brünger, A. T.; Adams, P. D.; Rice, L. M. New applications of simulated annealing in X-ray crystallography and solution NMR. *Structure* **1997**, *5* (3), 325-336.
149. Kozerski, L.; Mazurek, A. P.; Kawecki, R.; Bocian, W.; Krajewski, P.; Bednarek, E.; Sitkowski, J.; Williamson, M. P.; Moir, A. J. G.; Hansen, P. E. A nicked duplex decamer DNA with a PEG₆ tether. *Nucl. Acids Res.* **2001**, *29* (5), 1132-1143.
150. Bocian, W.; Sitkowski, J.; Bednarek, E.; Tarnowska, A.; Kawecki, R.; Kozerski, L. Structure of human insulin monomer in water/acetonitrile solution. *J. Biomol. NMR* **2008**, *40* (1), 55-64.
151. Schmitz, M.; Steger, G. Description of RNA folding by "simulated annealing". *J. Mol. Biol.* **1996**, *255* (1), 254-266.
152. Stein, E. G.; Rice, L. M.; Brunger, A. T. Torsion-angle molecular dynamics as a new efficient tool for NMR structure calculation. *J. Magn. Reson.* **1997**, *124* (1), 154-164.
153. Rife, J. P.; Stallings, S. C.; Correll, C. C.; Dallas, A.; Steitz, T. A.; Moore, P. B. Comparison of the Crystal and Solution Structures of Two RNA Oligonucleotides. *Biophys. J.* **1999**, *76* (1), 65-75.
154. Gonzalez, C.; Rullmann, J. A. C.; Bonvin, A. M. J. J.; Boelens, R.; Kaptein, R. Toward an NMR R factor. *J. Magn. Reson.* **1991**, *91* (3), 659-664.
155. Brunger, A. T.; Clore, G. M.; Gronenborn, A. M.; Saffrich, R.; Nilges, M. Assessing the quality of solution nuclear magnetic resonance structures by complete cross-validation. *Science* **1993**, *261* (5119), 328-331.
156. Boelens, R.; Koning, T. M. G.; Kaptein, R. Determination of biomolecular structures from proton-proton NOE's using a relaxation matrix approach. *J. Mol. Struct.* **1988**, *173*, 299-311.

157. Thomas, P. D.; Basus, V. J.; James, T. L. Protein solution structure determination using distances from 2D NOE experiments: effect of approximations on the accuracy of derived structures. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 1237-1241.
158. Withka, J. M.; Srinivasan, J.; Bolton, P. H. Problems with, and alternatives to, the NMR *R* factor. *J. Magn. Reson.* **1992**, *98*, 611-617.
159. Pfeiffer, S.; Karimi-Nejad, Y.; Rüterjans, H. Limits of NMR structure determination using variable target function calculations: ribonuclease T1, a case study. *J. Mol. Biol.* **1997**, *266* (2), 400-423.
160. Nabuurs, S. B.; Spronk, C. A. E. M.; Vriend, G.; Vuister, G. W. Concepts and tools for NMR restraint analysis and validation. *Concepts Magn Reson* **2004**, *22A* (2), 90-105.
161. *Oxford Handbook of Nucleic Acid Structure*; Oxford University Press: 1999.
162. Definitions and nomenclature of nucleic acid structure parameters. *Embo J.* **1989**, *8* (1), 1-4.
163. Dickerson, R. E. Definitions and nomenclature of nucleic acid structure parameters. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1989**, *6* (4), 627-634.
164. El Hassan, M. A.; Calladine, C. R. The Assessment of the Geometry of Dinucleotide Steps in Double-Helical DNA: A New Local Calculation Scheme. *J. Mol. Biol.* **1995**, *251*, 648-664.
165. Gorin, A. A.; Zhurkin, V. B.; Olson, W. K. B-DNA Twisting Correlates with Base-pair Morphology. *J. Mol. Biol.* **1995**, *247*, 34-48.
166. Kosikov, K. M.; Gorin, A. A.; Zhurkin, V. B.; Olson, W. K. DNA Stretching and Compression: Large-scale Simulations of Double Helical Structures. *J. Mol. Biol.* **1999**, *289*, 1301-1326.
167. Dickerson, R. E. DNA Bending: The Prevalence of Kinkiness and the Virtues of Normality. *Nucl. Acids Res.* **1998**, *26*, 1906-1926.
168. Pednault, E. P. D.; Babcock, M. S.; Olson, W. K. Nucleic Acids Structure Analysis: A Users Guide to a Collection of New Analysis Programs. *J. Biomol. Struct. Dynam.* **1993**, *11*, 597-628.
169. Dickerson, R. E. DNA bending: the prevalence of kinkiness and the virtues of normality. *Nucl. Acids Res.* **1998**, *26* (8), 1906-1926.
170. Lu, X. J.; Olson, W. K. 3DNA: a software package for the analysis, rebuilding and visualization of three-dimensional nucleic acid structures. *Nucl. Acids Res.* **2003**, *31* (17), 5108-5121.
171. Usman, N.; Ogilvie, K. K.; Jiang, M.-Y.; Cedergren, R. J. Automated chemical synthesis of long oligoribonucleotides using 2'-O-silylated ribonucleoside 3'-O-phosphoramidites on a controlled-pore glass support: synthesis of a 43-nucleotide sequence similar to the 3' half of an E. coli formylmethionine tRNA. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 7845-7854.
172. Puglisi, J. D.; Tinoco, I. Absorbency melting curves of RNA. *Methods Enzymol.* **1989**, *180*, 304-325.
173. Piotto, M.; Saudek, V.; Sklenar, V. Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *J. Biomol. NMR* **1992**, *2*, 661-665.
174. Jeener, J.; Meier, B. H.; Bachmann, P.; Ernst, R. R. Investigation of exchange processes by two-dimensional NMR spectroscopy. *J. Chem. Phys.* **1979**, *71* (11), 4546-4553.
175. Marion, D.; Ikura, M.; Tschudin, R.; Bax, A. Rapid recording of 2D NMR spectra without phase cycling. Application to the study of hydrogen exchange in proteins. *J. Magn. Reson.* **1989**, *85* (2), 393-399.

176. Hore, J. P. Nuclear magnetic resonance. Solvent suppression. *Methods Enzymol.* **1989**, *176*, 64-77.
177. Guéron, M.; Plateau, P.; Decors, M. Solvent signal suppression in NMR. *Prog. NMR Spectrosc.* **1991**, *23*, 135-209.
178. Barkhuijsen, H.; de Beer, R.; Bovée, W. M. M. J.; van Ormondt, D. Retrieval of frequencies, amplitudes, damping factors, and phases from time-domain signals using a linear least-squares procedure. *J. Magn. Reson.* **2007**, *61* (3), 465-481.
179. Sklenar, V.; Piotta, M.; Leppik, R.; Saudek, V. Gradient-Tailored Water Suppression for ^1H - ^{15}N HSQC Experiments Optimized to Retain Full Sensitivity. *J. Magn. Reson. Ser. A* **1993**, *102*, 241-245.
180. Marion, D.; Wüthrich, K. Application of phase sensitive two-dimensional correlated spectroscopy (COSY) for measurements of ^1H - ^1H spin-spin coupling constants in proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1983**, *113* (3), 967-974.
181. Derome, A.; Williamson, M. 2D homonuclear shift correlation phase sensitive using TPPI with double quantum filter phasecycle. *J. Magn. Reson.* **1990**, *88*, 177-185.
182. Shaka, A. J.; Barker, P. B.; Freeman, R. Computer-optimized decoupling scheme for wideband applications and low-level operation. *J. Magn. Reson.* **1985**, *64*, 547-552.
183. Griesinger, C.; Otting, G.; Wüthrich, K.; Ernst, R. R. Clean TOCSY for proton spin system identification in macromolecules. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110* (23), 7870-7872.
184. Bax, A.; Davis, D. G. MLEV-17-based two-dimensional homonuclear magnetization transfer spectroscopy. *J. Magn. Reson.* **1985**, *65* (2), 355-360.
185. Palmer III, A. G.; Cavanagh, J.; Wright, P. E.; Rance, M. Sensitivity improvement in proton detected heteronuclear correlation experiments. *J. Magn. Reson.* **1991**, *93*, 151-170.
186. Kay, L. E.; Keifer, P.; Saarinen, T. Pure absorption gradient enhanced heteronuclear single quantum correlation spectroscopy with improved sensitivity. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10663-10665.
187. Schleucher J.; Schwendinger M.; Sattler M.; Schmidt P.; Schedletzky O.; Glaser S.J.; Sorensen O.W.; Griesinger C. A general enhancement scheme in heteronuclear multidimensional NMR employing pulsed field gradients. *J. Biomol. NMR* **1994**, *4*, 301-306.
188. Sklenar, V.; Miyashiro, H.; Zon, G.; Miles, T.; Bax, A. Assignment of the 31P Resonances in Oligonucleotides by Two-dimensional NMR Spectroscopy. *FEBS Lett.* **1986**, *208*, 94.
189. Williamson, D.; Bax, A. Resolution enhanced correlation of ^1H and ^{31}P chemical shifts. *J. Magn. Reson.* **1988**, *76*, 174-177.
190. Wishart, D. S.; Bigam, C. G.; Ya, J.; Abildgaard, F.; Dyson, H. J.; Oldfield, E.; Markley, J. L.; Sykes, B. D. ^1H , ^{13}C and ^{15}N chemical shift referencing in biomolecular NMR. *J. Biomol. NMR* **1995**, *6* (2), 135-140.
191. Fürtig, B.; Richter, C.; Wöhnert, J.; Schwalbe, H. NMR spectroscopy of RNA. *ChemBioChem* **2003**, *4* (10), 936-962.
192. Wüthrich, K. *NMR of Proteins and Nucleic Acids*; Wiley: New York, 1986.
193. Westerink, H. P.; van der Marel, G. A.; van Boom, J. H.; Haasnoot, C. A. Conformational analysis of r(CGCGCG) in aqueous solution: an A-type double helical conformation studied by two-dimensional nuclear Overhauser effect spectroscopy. *Nucl. Acids Res.* **1984**, *12* (10), 4323-4338.
194. Altona, C. Conformational analysis of nucleic acids. Determination of backbone geometry of single-helical RNA and DNA in aqueous solution. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas.* **1982**, *101*, 413-433.

195. Varani, G.; Tinoco, I. Jr. RNA structure and NMR spectroscopy. *Q. Rev. Biophys.* **1991**, *24*, 479-532.
196. Ulrich, E. L.; Akutsu, H.; Doreleijers, J. F.; Harano, Y.; Ioannidis, Y. E.; Lin, J.; Livny, M.; Mading, S.; Maziuk, D.; Miller, Z.; Nakatani, E.; Schulte, C. F.; Tolmie, D. E.; Wenger, R. K.; Yao, H.; Markley, J. L. BioMagResBank. *Nucl. Acids Res.* **2008**, *36*, D402-D408.
197. Wijmenga, S. S.; van Buuren, B. N. M. The use of NMR methods for conformational studies of nucleic acids. *Prog. Nucl. Mag. Res. Sp.* **1998**, *32*, 287-387.
198. Podlasek, C. A.; Stripe, W. A.; Carmichael, I.; Shang, M.; Basu, B.; Serianni, A. S. ¹³C-¹H spin-coupling constants in the beta-D-ribofuransoyl ring: effect of ring conformation on coupling magnitudes. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118* (6), 1413-1425.
199. Duchardt, E.; Richter, C.; Reif, B.; Glaser, S. J.; Engels, J. W.; Griesinger, C.; Schwalbe, H. Measurement of ²J(H,C) and ³J(H,C) Coupling Constants in the a/b selective HC(C)H-TOCSY. *J. Biomol. NMR* **2001**, *21*, 117-126.
200. Hines, J. V.; Landry, S. M.; Varani, G.; Tinoco, I. Carbon-Proton Scalar Couplings in RNA: 3D Heteronuclear and 2D Isotope-Edited NMR of a ¹³C-Labeled Extra-stable Hairpin. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116* (13), 5823-5831.
201. Popenda, M. Zastosowanie metod magnetycznego rezonansu jądrowego oraz modelowania molekularnego w analizie strukturalnej RNA. IChB PAN, 1998.
202. Kline, P. C.; Serianni, A. S. ¹³C-Enriched ribonucleosides: synthesis and application of ¹³C-¹H and ¹³C-¹³C spin-coupling constants to assess furanose and N-glycoside bond conformations. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112* (20), 7373-7381.
203. Schwalbe, H.; Marino, J. P.; King, G. C.; Wechselberger, R.; Bermel, W.; Griesinger, C. Determination of a complete set of coupling constants in ¹³C-labeled oligonucleotides. *J. Biomol. NMR* **1994**, *4* (5), 631-644.
204. Nair, V.; Young, D. A. Conformational correlation of purine nucleosides by high-field carbon-13 NMR data. *Magn. Reson. Chem.* **1987**, *25* (11), 937-940.
205. Schwieters, C. D.; Kuszewski, J. J.; Tjandra, N.; Clore, G. M. The Xplor-NIH NMR molecular structure determination package. *J. Magn. Reson.* **2003**, *160* (1), 65-73.
206. Schwieters, C. D.; Kuszewski, J. J.; Clore, G. M. Using Xplor-NIH for NMR molecular structure determination. *Prog. Nucl. Mag. Res. Sp.* **2006**, *48* (1), 47-62.
207. Parkinson, G.; Vojtechovsky, J.; Clowney, L.; Brunger, A. T.; Berman, H. M. New parameters for the refinement of nucleic acid-containing structures. *Acta Cryst. D* **1996**, *52*, 57-64.
208. Kuszewski, J.; Schwieters, C.; Clore, G. M. Improving the accuracy of NMR structures of DNA by means of a database potential of mean force describing base-base positional interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (17), 3903-3918.
209. Arnott, S.; Hukins, D. W.; Dover, S. D.; Fuller, W.; Hodgson, A. R. Structures of synthetic polynucleotides in the A-RNA and A'-RNA conformations: x-ray diffraction analyses of the molecular conformations of polyadenylic acid-polyuridylic acid and polyinosinic acid-polycytidylic acid. *J. Mol. Biol.* **1973**, *81*, 107-122.
210. Chandrasekaran, R.; Arnott, S. The structures of DNA and RNA helices in oriented fibers. *Landolt-Börnstein: Numerical Data and Functional Relationships in Science and Technology* **1989**, *VII/Ib*, 31-170.
211. Plateau, P.; Gueron, M. Exchangeable proton NMR without base-line distortion, using new strong-pulse sequences. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 7310-7311.
212. Yang, H.; Jossinet, F.; Leontis, N.; Chen, L.; Westbrook, J.; Berman, H. M.; Westhof, E. Tools for the automatic identification and classification of RNA base pairs. *Nucl. Acids Res.* **2003**, *31* (13), 3450-3460.

213. Wedekind, J. E.; McKay, D. B. Crystallographic structures of the hammerhead ribozyme: relationship to ribozyme folding and catalysis. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1998**, *27*, 475-502.
214. Feng, Z.; Westbrook, J.; Berman, H. M. Nucleic Acid Database. *Report NDB-407* **1998**.
215. Zagórska, I.; Adamiak, R. W. 2-Aminopurine labelled RNA bulge loops. Synthesis and thermodynamics. *Biochimie* **1966**, *78*, 123-130.
216. Kulinski, T.; Bielecki, L.; Adamiak, R. W. Structure and dynamics of adenosine loops in RNA bulge duplexes as revealed by linked application of thermodynamics, spectrofluorimetry and simulation of molecular dynamics. *Nucl. Acids Res. Suppl. 1* **2001**, 139-140.
217. Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* **1983**, *79* (2), 926-935.
218. Case, D. A.; Cheatham, T. E. 3.; Darden, T. A.; Gohlke, H.; Luo, R.; Merz K.M.Jr; Onufriev, A.; Simmerling, C.; Wang, B.; Woods, R. J. The Amber biomolecular simulation programs. *J. Comput. Chem.* **2005**, *26* (16), 1668-1688.
219. Bartels, C.; Güntert, P.; Billeter, M.; Wüthrich, K. GARANT - a General Algorithm for Resonance Assignment of Multidimensional Nuclear Magnetic Resonance Spectra. *J. Comp. Chem.* **1997**, *18*, 139-149.
220. Baran, M. C.; Huang, Y. J.; Moseley, H. N.; Montelione, G. T. Automated analysis of protein NMR assignments and structures. *Chem. Rev.* **2004**, *104* (8), 3541-3556.
221. Chen, Z. Z.; Lin, G.; Rizzi, R.; Wen, J.; Xu, D.; Xu, Y.; Jiang, T. More reliable protein NMR peak assignment via improved 2-interval scheduling. *J. Comput. Biol.* **2005**, *12* (2), 129-146.
222. Atreya, H. S.; Chary, K. V. R.; Govil, G. Automated NMR assignments of proteins for high throughput structure determination: TATAPRO II. *Current Science* **2002**, *83* (11), 1372-1375.
223. Duggan, B. M.; Legge, G. B.; Dyson, H. J.; Wright, P. E. SANE (Structure Assisted NOE Evaluation): An automated model-based approach for NOE assignment. *J. Biomol. NMR* **2001**, *19* (4), 321-329.
224. Güntert, P.; Salzmann, M.; Braun, D.; Wüthrich, K. Sequence-specific NMR assignment of proteins by global fragment mapping with the program Mapper. *J. Biomol. NMR* **2000**, *18* (2), 129-137.
225. Herrmann, T.; Güntert, P.; Wüthrich, K. Protein NMR structure determination with automated NOE assignment using the new software CANDID and the torsion angle dynamics algorithm DYANA. *J. Mol. Biol.* **2002**, *319* (1), 209-227.
226. Hitchens, T. K.; Lukin, J. A.; Zhan, Y.; McCallum, S. A.; Rule, G. S. MONTE: An automated Monte Carlo based approach to nuclear magnetic resonance assignment of proteins. *J. Biomol. NMR* **2003**, *25*, 1-9.
227. Kamisetty, H.; Bailey-Kellogg, C.; Pandurangan, G. An efficient randomized algorithm for contact-based NMR backbone resonance assignment. *Bioinformatics* **2006**, *22*, 172-180.
228. Adamiak, R. W.; Blazewicz, J.; Formanowicz, P.; Gdaniec, Z.; Kasprzak, M.; Popena, M.; Szachniuk, M. An algorithm for an automatic NOE pathways analysis of 2D NMR spectra of RNA duplexes. *J. Comput. Biol.* **2004**, *11* (1), 163-179.
229. Longfellow, C. E.; Kierzek, R.; Turner, D. H. Thermodynamic and spectroscopic study of bulge loops in oligoribonucleotides. *Biochemistry* **1990**, *29*, 278-285.
230. Znosko, B. M.; Silvestri, S.; Volkman, H.; Boswell, B.; Serra, M. J. Thermodynamic parameters for an expanded nearest-neighbor model for the formation of RNA duplexes with single nucleotide bulges. *Biochemistry* **2002**, *41*, 10406-10417.

231. Blose, J. M.; Manni, M. L.; Klappec, K. A.; Stranger-Jones, Y.; Zyra, A. C.; Sim, V.; Griffith, C. A.; Long, J. D.; Serra, M. J. Non-nearest-neighbor dependence of the stability for RNA bulge loops based on the complete set of group I single-nucleotide bulge loops. *Biochemistry* **2007**, *46*, 15123-15135.
232. Newby, M. I.; Greenbaum, N. L. Sculpting of the spliceosomal branch site recognition motif by a conserved pseudouridine. *Nat. Struct. Biol.* **2002**, *9* (12), 958-965.
233. Thivyanathan, V.; Guliaev, A. B.; Leontis, N. B.; Gorenstein, D. G. Solution conformation of a bulged adenosine base in an RNA duplex by relaxation matrix refinement. *J. Mol. Biol.* **2000**, *300* (5), 1143-1154.
234. Sashital, D. G.; Allmann, A. M.; Van Doren, S. R.; Butcher, S. E. Structural basis for a lethal mutation in U6 RNA. *Biochemistry* **2003**, *42* (6), 1470-1477.
235. Smith, J. S.; Nikonowicz, E. P. NMR structure and dynamics of an RNA motif common to the spliceosome branch-point helix and the RNA-binding site for phage GA coat protein. *Biochemistry* **1998**, *37* (39), 13486-13498.
236. Smith, J. S.; Nikonowicz, E. P. Phosphorothioate substitution can substantially alter RNA conformation. *Biochemistry* **2000**, *39* (19), 5642-5652.
237. Cabello-Villegas, J.; Giles, K. E.; Soto, A. M.; Yu, P.; Mougin, A.; Beemon, K. L.; Wang, Y. X. Solution structure of the pseudo-5' splice site of a retroviral splicing suppressor. *RNA* **2004**, *10* (9), 1388-1398.
238. Finger, L. D.; Trantirek, L.; Johansson, C.; Feigon, J. Solution Structures of Stem-loop RNAs that Bind the Two N-terminal RNA-binding Domains of Nucleolin. *Nucl. Acids Res.* **2003**, *31* (22), 6461-6472.
239. Leeper, T. C.; Martin, M. B.; Kim, H.; Cox, S.; Semenchenko, V.; Schmidt, F. J.; Van Doren, S. R. Structure of the UGAGAU hexaloop that braces Bacillus RNase P for action. *Nat. Struct. Biol.* **2002**, *9* (5), 397-403.
240. Zacharias, M.; Sklenar, H. Conformational analysis of single-base bulges in A-form DNA and RNA using hierarchical approach and energetic evaluation with a continuum solvent model. *J. Mol. Biol.* **1999**, *289*, 261-275.
241. Klosterman, P. S.; Tamura, M.; Holbrook, S. R.; Brenner, S. E. SCOR: A Structural Classification of RNA database. *Nucl. Acids Res.* **2002**, *30* (1), 392-394.
242. Berman, H. M.; Olson, W. K.; Beveridge, D. L.; Westbrook, G. L.; Gelbin, A.; Demeny, T.; Hsieh, S. H.; Srinivasan, A. R.; Schneider, B. The Nucleic Acid Database: A Comprehensive Relational Database of Three-Dimensional Structures of Nucleic Acids. *Biophys. J.* **1992**, *63*, 751-759.
243. Ban, N.; Nissen, P.; Hansen, J.; Moore, P. B.; Steitz, T. A. The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 angstrom resolution. *Science* **2000**, *289* (5481), 905-920.
244. Popenda, M.; Blazewicz, M.; Szachniuk, M.; Adamiak, R. W. RNA FRABASE version 1.0: an engine with a database to search for the three-dimensional fragments within RNA structures. *Nucl. Acids Res.* **2008**, *36*, D386-D391.
245. Hofacker, I. L.; Fontana, W.; Stadler, P. F.; Bonhoeffer, S. L.; Tacker, M.; Schuster, P. Fast folding and comparison of RNA secondary structures. *Monatshefte f. Chemie* **1994**, *125*, 167-188.
246. Greenbaum, N. L.; Radhakrishnan, I.; Patel, D. J.; Hirsh, D. Solution structure of the donor site of a trans-splicing RNA. *Structure* **1996**, *4* (6), 725-733.
247. Serra, M. J.; Silvestri, S. B. Thermodynamic parameters for RNA bulge loop formation. *Biochemistry* **2002**, *41* (28), 91.
248. Barthel, A.; Zacharias, M. Conformational transitions in RNA single uridine and adenosine bulge structures: A molecular dynamics free energy simulation study. *Biophys. J.* **2006**, *90* (7), 2450-2462.

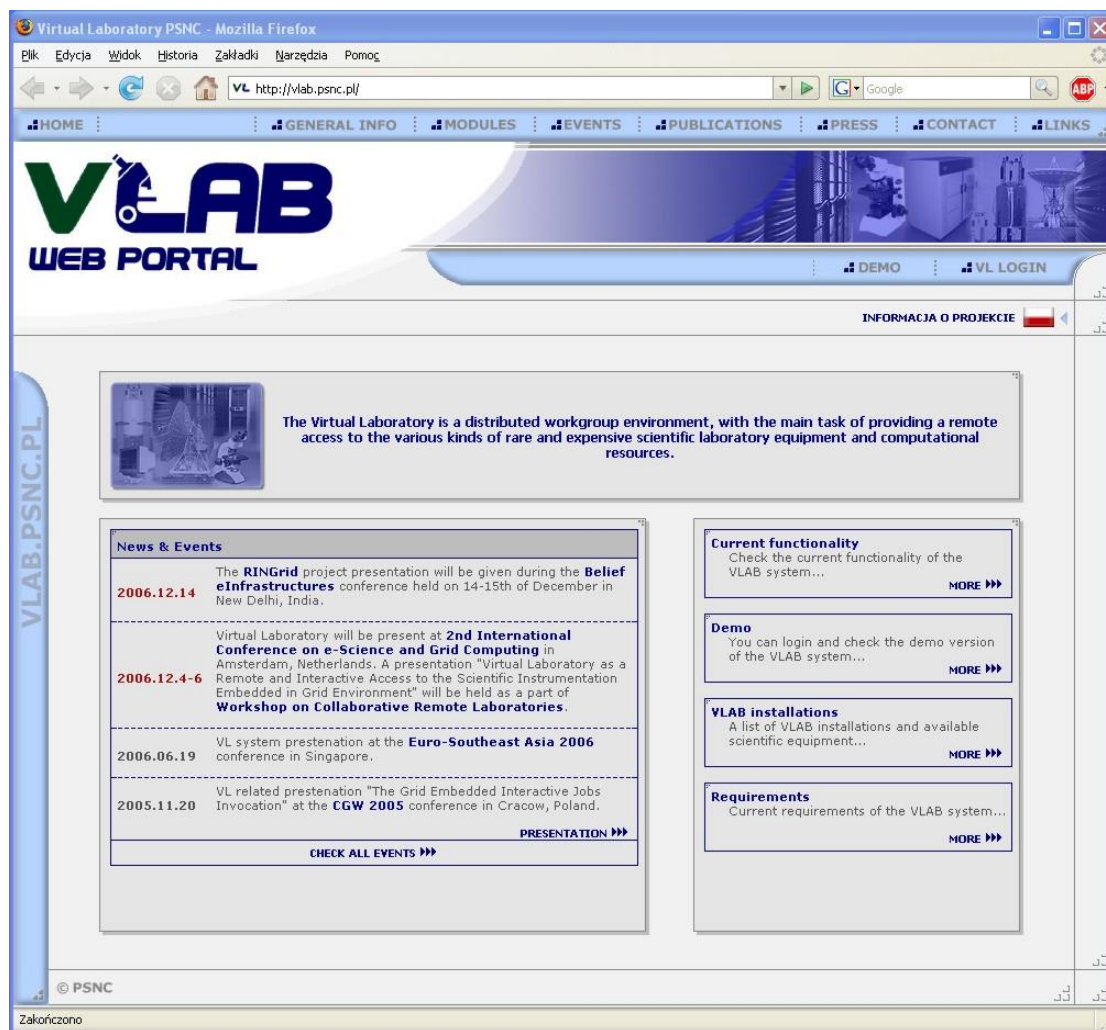
249. Hastings, W. A.; Yingling, Y. G.; Chirikjian, G. S.; Shapiro, B. A. Structural and dynamical classification of RNA single-base bulges for nanostructure design. *J. Comput. Theor. Nanosci.* **2006**, *3* (1), 63-77.
250. Amarasinghe, G. K.; De Guzman, R. N.; Turner, R. B.; Summers, M. F. NMR Structure for Stem Loop SL2 of the HIV-1 Ψ RNA Packaging Signal Reveals a Novel A-U-A Base Triple Platform. *J. Mol. Biol.* **2000**, *299*, 145-156.
251. Schmitz, M. Change of RNase P RNA function by single base mutation correlates with perturbation of metal ion binding in P4 as determined by NMR spectroscopy. *Nucl. Acids Res.* **2004**, *32* (21), 6358-6366.
252. Flodell, S.; Petersen, M.; Girard, F.; Zdunek, J.; Kidd-Ljunggren, K.; Schleucher, J.; Wijmenga, S. Solution structure of the apical stem-loop of the human hepatitis B virus encapsidation signal. *Nucl. Acids Res.* **2006**, *34* (16), 4449-4457.
253. Huber, P. W.; Rife, J. P.; Moore, P. B. The structure of helix III in *Xenopus* oocyte 5 S rRNA: An RNA stem containing a two-nucleotide bulge. *J. Mol. Biol.* **2001**, *312* (4), 823-832.
254. Bhattacharyya, A.; Lilley, D. M. The contrasting structures of mismatched DNA sequences containing looped-out bases (bulges) and multiple mismatches (bubbles). *Nucl. Acids Res.* **1989**, *17*, 6821-6841.
255. Hsieh, C.-H.; Griffith, J. D. Deletions of bases in one strand of duplex DNA, in contrast to single-base mismatches, produce highly kinked molecules: possible relevance to the folding of single-stranded nucleic acids. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 4833-4837.
256. Luebke, K. J.; Tinoco, I. Jr. Sequence effect on RNA Bulge-Induced helix bending in a conserved five-nucleotide bulge from the Group I Introns. *Biochemistry* **1996**, *35*, 11677-11684.
257. Wang, Y.-H.; Griffith, J. D. Effects of bulge composition and flanking sequence on the kinking of DNA by bulged bases. *Biochemistry* **1991**, *30*, 1358-1363.
258. Zacharias, M.; Hagerman, P. J. Bulge-induced bends in RNA: quantification by transient electric birefringence. *J. Mol. Biol.* **1995**, *247*, 486-500.
259. Gohlke, C.; Murchie, A. I.; Lilley, D. M.; Clegg, R. M. Kinking of DNA and RNA helices by bulged nucleotides observed by fluorescence resonance energy transfer. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 11660-11664.
260. Lilley, D. M. Kinking of DNA and RNA by base bulges. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 7140-7142.
261. Szachniuk, M.; Popena, L.; Gdaniec, Z.; Adamiak, R. W.; Blazewicz, J. NMR analysis of RNA bulged structures: tabu search application in NOE signal assignment. *Proc. IEEE CIBCB 2005* **2005**, 172-178.
262. Szachniuk, M.; Popena, M.; Popena, L. Strategies of signal assignment in NMR spectra of RNAs with different structural motifs. *Ifl Technical Report Series* **2007**, *Ifl-07-03*, 12-14.

Aneks 1. Oznaczenie wybranych, stosowanych w pracy skrótów

A	adenozyna
BMRB	ang. <i>Biological Magnetic Resonance Data Bank</i>
C	cytydina
COSY	ang. <i>COrrrelation SpectroscopY</i>
DG	ang. <i>Distance Geometry</i>
DNA	kwas deoksyrybonukleinowy
DQF-COSY	ang. <i>Double Quantum Filtered COrrrelation SpectroscopY</i>
DSS	ang. <i>4,4-Dimethyl 4-silapentane sodium sulfonate</i>
FID	ang. <i>Free Induction Decay</i>
G	guanozyna
GARP	ang. <i>Globally optimized Alternating phase Rectangular Pulse</i>
HSQC	ang. <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
ISPA	ang. <i>Isolated Spin Pair Approximation</i>
LP	ang. <i>Linear Prediction</i>
MALDI	ang. <i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i>
MD	ang. <i>Molecular Dynamics</i>
NDB	ang. <i>Nucleic Acid Database</i>
NMR	ang. <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NOE	ang. <i>Nuclear Overhauser Effect</i>
NOESY	ang. <i>Nuclear Overhauser Enhancement SpectroscopY</i>
PDB	ang. <i>Protein Data Bank</i>
rMD	ang. <i>restrained Molecular Dynamics</i>
RMSD	ang. <i>Root Mean Square Deviation</i>
RNA	kwas rybonukleinowy
SA	ang. <i>Simulated Annealing</i>
SCOR	ang. <i>Structural Classification of RNA database</i>
TAMD	ang. <i>Torsion Angle Molecular Dynamics</i>
TMP	ang. <i>Tetramethylsilane</i>
TOCSY	ang. <i>Total COrrrelation SpectroscopY</i>
U	urydina

Aneks 2. Laboratorium Wirtualne Spektroskopii Magnetycznego Rezonansu Jądrowego

System Laboratorium Wirtualnego Spektroskopii Magnetycznego Rezonansu Jądrowego opracowany został we współpracy z Poznańskim Centrum Superkomputerowo Sieciowym i dostępny jest pod adresem <http://vlab.psnc.pl>. Strona główna portalu przedstawiona została na poniższym rysunku.



Strona główna portalu Laboratorium Wirtualnego

Pod definicją Laboratorium Wirtualnego należy rozumieć heterogeniczne, rozproszone środowisko, umożliwiające grupie naukowców znajdujących się w różnych miejscach na świecie wspólną pracę nad realizacją łączących ich projektów. Nieodłącznym elementem każdego Laboratorium jest zdalny dostęp do kosztownych i tym samym unikalnych urządzeń.

W ramach projektu prowadzonego przez Pracownię Chemii Strukturalnej Kwasów Nukleinowych i PCSS współuczestniczyłem w badaniach dotyczących możliwości zdalnego udostępnienia i korzystania ze spektrometrów (Varian Unity 300 i Bruker Avance 600), oraz w opracowaniu ogólnego, uniwersalnego modelu architektury dla laboratorium wirtualnego. Opracowany system typu GRID charakteryzuje się budową modułową, która pozwala na

szybkie dostosowanie go do nowych zastosowań i urządzeń, a bezproblemowy dostęp do Laboratorium poprzez Internet, realizowany za pomocą portalu, znacznie ułatwia pracę tym, którzy z różnych względów nie mogą mieć fizycznego dostępu do często bardzo drogiej aparatury laboratoryjnej. Opracowany system umożliwia także kontynuację prac i obserwację wyników osobom, które czasowo przebywają poza swoim miejscem pracy (np. wyjazd na konferencję, staż na innej uczelni). Architektura systemu uwzględnia także moduł do przesyłania informacji (np. wyników eksperymentów) na bieżąco czy też magazynowania ich w celu późniejszego zaprezentowania ich użytkownikowi. W czasie prac badawczych opracowane zostały ponadto scenariusze pomiarowe definiujące eksperymenty wykonywane w ramach Laboratorium Wirtualnego. Wyróżnić tu można eksperymenty rzeczywiste (np. wykonywane na spektrometrze NMR pomiary) oraz eksperymenty obliczeniowe (np. analiza widm, obliczenia metodami rMD). Zagadnienie to podjęte zostało w celu poprawy efektywności pracy w środowisku rozproszonym jakim niewątpliwie jest każde Laboratorium Wirtualne.

Wyniki z moim udziałem w tym projekcie znalazły odzwierciedlenie w zamieszczonych w Aneksie 3 publikacjach i komunikatach.

Aneks 3. Wykaz publikacji i komunikatów konferencyjnych

Publikacje i artykuły w materiałach konferencyjnych:

1. Popenda Ł., Utrecht R., Ślósarek G., Hołderna-Natkaniec K., Wąsicki J., "¹H NMR Relaxation and spectroscopy of kinetin", *Molecular Physics Reports*, 2001, Vol. 33, pp. 114-117.
2. Adamiak R. W., Gdaniec Z., Lawenda M., Meyer N., Popenda Ł., Stroiński M., Zieliński K., "Virtual Laboratory in Grid environment", *Materiały PIONIEER 2003*, 9-11.4.2003, Poznań, pp. 155-166.
3. Lawenda M., Meyer N., Rajtar T., Okoń M., Stokłosa D., Stroiński M., Popenda Ł., Gdaniec Z., Adamiak R. W., "General Conception of the Virtual Laboratory", *Lecture Notes in Computer Science*, Vol. 3038, pp. 1013-1016.
4. Rek P., Kopeć M., Gdaniec Z., Popenda Ł., Adamiak R. W., Wolski M., Lawenda M., Meyer N., Stroiński M., "Naukowa Biblioteka Cyfrowa dla Spektroskopii Magnetycznego Rezonansu Jądrowego", *Materiały XII Konferencja Sieci i Systemy Informatyczne*, 21-22.10.2004, Łódź, pp. 179-187.
5. Rek P., Kopeć M., Gdaniec Z., Popenda Ł., Adamiak R. W., Wolski M., Lawenda M., Meyer N., Stroiński M., "Digital Science Library for Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy", *Materiały 4th Cracow Grid Workshop*, 12-15.12.2004, Kraków, pp. 404-411.
6. Rek P., Władyszewski K., Popenda Ł., Wolski M., Lawenda M., "Naukowa Biblioteka Cyfrowa NMR - od wymagań do projektu" *Pro Dialog*, 2005, Vol. 19, pp. 89-116.
7. Szachniuk M., Popenda Ł., Gdaniec Z., Adamiak R. W., Błażewicz J., "NMR analysis of RNA bulged structures: tabu search application in NOE signal assignment", *Materiały 2005 IEEE Symposium on Computational Intelligence in Bioinformatics and Computational Biology*, 14-15.11.2005, San Diego, USA, pp. 172-178.
8. Paczkowski W., Milawski M., Popenda Ł., Szachniuk M., "A new tool for fundamental analysis of NMR spectra", *TU Clausthal Technical Report Series IfI-07-03*, 2007, pp. 8-11.
9. Szachniuk M., Popenda M., Popenda Ł., "Strategies of signal assignment in NMR spectra of RNAs with different structural motifs", *TU Clausthal Technical Report Series IfI-07-03*, 2007, pp. 12-14.
10. Popenda Ł., Adamiak R.W., Gdaniec Z., "Bulged adenosine influence on the RNA duplex conformation in solution", *Biochemistry* vol. 47 no. 18, 2008, pp. 5059-5067.
11. Popenda Ł., Bielecki Ł., Gdaniec Z., Adamiak R.W., "Structure and dynamics of adenosine bulged RNA duplex reveals formation of the dinucleotide platform in the C:G-A triple", *Arkivoc* 2008 – praca przyjęta do druku.

Komunikaty na konferencjach:

1. Popenda Ł., Utrecht R., Ślósarek G., Wąsicki J., "Molecular dynamics in the crystals of kinetin", *XXXI Congress AMPERE*, 14-19.07.2002, Poznań
2. Adamiak R. W., Gdaniec Z., Lawenda M., Meyer N., Popenda Ł., Stroiński M., Zieliński K., "Virtual Laboratory in Grid environment", *PIONIER 2003*, 09-11.04.2003, Poznań

3. Popena Ł., Gdaniec Z., "Analiza strukturalna dupleksu RNA z wybrzuszeniem adenozynowym", Seminarium doktorantów organizowane przez Sekcję NMR przy PTChem, 16.05.2003, Łódź
4. Gdaniec Z., Popena Ł., Dominiak G., Milecki J., Adamiak R. W., "Spectral analysis of RNA duplexes containing unpaired adenosine residues", XLVI Zjazd PTChem i SITPChem, 15-18.09.2003, Lublin
5. Popena Ł., Gdaniec Z., Dominiak G., Milecki J., Adamiak R. W., "Structural analysis of RNA duplexes containing adenosine bulges by NMR spectroscopy", XXXVI Ogólnopolskie Seminarium na Temat Magnetycznego Rezonansu Jądrowego i Jego Zastosowań, 01-02.12.2003, Kraków
6. Lawenda M., Popena Ł., Meyer N., Stroiński M., Gdaniec Z., Adamiak R. W., "Virtual Laboratory of NMR spectroscopy", XXXVI Ogólnopolskie Seminarium na Temat Magnetycznego Rezonansu Jądrowego i Jego Zastosowań, 01-02.12.2003, Kraków
7. Lawenda M., Meyer N., Okoń M., Rajtar T., Stokłosa D., Kaliszan D., Stroiński M., Popena Ł., Gdaniec Z., Adamiak R. W., "Tasks flow management on the virtual laboratory with use of the dynamic measurements scenarios", PIONIER 2004, 19-20.05.2004, Poznań
8. Stokłosa D., Lawenda M., Meyer N., Rajtar T., Okoń M., Stroiński M., Popena Ł., Gdaniec Z., Adamiak R. W., "The Virtual Laboratory of NMR spectroscopy", AMPERE XII Nuclear Magnetic Resonance School, 06-09.06.2004, Zakopane
9. Okoń M., Lawenda M., Meyer N., Rajtar T., Stokłosa D., Kaliszan D., Mierzyński P., Stroiński M., Popena Ł., Gdaniec Z., Adamiak R. W., "General conception of the Virtual Laboratory", International Conference on Computational Science, 06-11.06.2004, Kraków
10. Meyer N., Lawenda M., Okoń M., Rajtar T., Stokłosa D., Stroiński M., Adamiak R. W., Gdaniec Z., Popena Ł., "The effective integration of scientific instruments in the Grid", TERENA 2004, 07-10.06.2004, Rodos, Grecja
11. Popena Ł., Gdaniec Z., "NMR structure of RNA duplex with adenine bulge", International Conference on Structure and Spectroscopy, 23-26.09.2004, Wilno, Litwa
12. Rek P., Kopeć M., Gdaniec Z., Popena Ł., Adamiak R. W., Wolski M., Lawenda M., Meyer N., Stroiński M., "Digital Science Library for Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy", 12th conference on Computer Networks and Information Systems, 21-22.10.2004, Łódź
13. Rek P., Kopeć M., Gdaniec Z., Popena Ł., Adamiak R. W., Wolski M., Lawenda M., Meyer N., Stroiński M., "Digital Science Library for Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy", 4th Cracow Grid Workshop, 12-15.12.2004, Kraków
14. Popena Ł., Gdaniec Z., "Wpływ obecności niesparowanej reszty adeniny na strukturę dupleksów RNA. Badania NMR", XLVIII Zjazd PTChem i SITPChem, 18-22.09.2005, Poznań
15. Szachniuk M., Popena Ł., "Zastosowanie algorytmu tabu search do analizy widm NMR wybrzuszonych dupleksów RNA", Third Workshop on Bioinformatics, 14-15.10.2005, Będlewo
16. Szachniuk M., Popena Ł., Gdaniec Z., Adamiak R. W., Błażewicz J., "NMR analysis of RNA bulged structures: tabu search application in NOE signal assignment", IEEE Symposium on Computational Intelligence in Bioinformatics and Computational Biology, 14-15.11.2005, San Diego, USA
17. Popena Ł., Gdaniec Z., "Zmiany strukturalne dupleksu RNA wywołane obecnością niesparowanej reszty adenozynowej. Badania NMR", XXXVIII Ogólnopolskie

Seminarium na Temat Magnetycznego Rezonansu Jądrowego i Jego Zastosowań, 01-02.12.2005, Kraków

18. Popena Ł., Bielecki Ł., Gdaniec Z., Adamiak R. W., "Badania metodami spektroskopii NMR oraz symulacji dynamiki molekularnej dupletu RNA z wybrzuszeniem", XXXVIII Ogólnopolskie Seminarium na Temat Magnetycznego Rezonansu Jądrowego i Jego Zastosowań, 01-02.12.2005, Kraków
19. Szachniuk M., Popena Ł., Gdaniec Z., Adamiak R. W., Błażewicz J., "Zastosowanie algorytmu tabu search do konstruowania ścieżek NOE na widmach 2D NOESY wybrzuszonych dupletów RNA", XXXVIII Ogólnopolskie Seminarium na Temat Magnetycznego Rezonansu Jądrowego i Jego Zastosowań, 01-02.12.2005, Kraków
20. Lawenda M., Popena Ł., Meyer N., Stroiński M., Gdaniec Z., Adamiak R. W., "Spektroskopia NMR w środowisku gridowym", XXXVIII Ogólnopolskie Seminarium na Temat Magnetycznego Rezonansu Jądrowego i Jego Zastosowań, 01-02.12.2005, Kraków
21. Pasternak K., Popena Ł., Kierzek R., Gdaniec Z., "Preliminary NMR and thermodynamic studies of 2'-O-MeRNA-LNA/RNA duplexes", 2nd NMR Workshop & Bruker NMR Users Meeting, 27-28.06.2006, Wrocław
22. Popena Ł., Gdaniec Z., "Atypical Conformation of Bulged Duplex Revealed by NMR Spectroscopy", IInd Symposium on: Nuclear Magnetic Resonance in Chemistry, Biology and Medicine, 11-13.09.2006, Warszawa
23. Szachniuk M., Popena M., Popena Ł., Gdaniec Z., Błażewicz J., Adamiak R. W., "Algorithmic Approach to NOE Pathway Reconstruction in 2D-NOESY Spectra of RNA Molecules", IInd Symposium on: Nuclear Magnetic Resonance in Chemistry, Biology and Medicine, 11-13.09.2006, Warszawa
24. Pasternak K., Popena Ł., Kierzek R., Gdaniec Z., "Preliminary thermodynamic and NMR studies of 2'-O-MeRNA-LNA/RNA duplexes containing LNA uridine", RNA Chemistry meets Biology, 29-30.09.2006, Lund, Szwecja
25. Paczkowski W., Milawski M., Popena Ł., Szachniuk M., "A new tool for fundamental analysis of NMR spectra", ICOLE'07: Bioinformatics, Operations Research and Machine Learning: Recent Trends and Developments, 27.05-03.06.2007, Lessach, Austria
26. Szachniuk M., Popena M., Popena Ł., "Strategies of signal assignment in NMR spectra of RNAs with different structural motifs", ICOLE'07: Bioinformatics, Operations Research and Machine Learning: Recent Trends and Developments, 27.05-03.06.2007, Lessach, Austria
27. Szachniuk M., Popena Ł., Miławski M., Paczkowski W., "Structural information retrieval from NMR spectra of RNA molecules", EURO XXII: 22nd European Congress on Operational Research, 08-11.07.2007, Praga, Czechy
28. Popena Ł., Gdaniec Z., "Different conformations of single-base bulges found in NMR structures of RNA duplexes", Nuclear Magnetic Resonance in Condensed Matter; 4th Meeting 'NMR in Life Sciences', 09-13.07.2007, Sankt Petersburg, Rosja
29. Pasternak K., Popena Ł., Pasternak A., Kierzek R., Gdaniec Z., "NMR and thermodynamic studies of 2'-O-MeRNA-LNA/RNA duplexes", Nuclear Magnetic Resonance in Condensed Matter; 4th Meeting 'NMR in Life Sciences', 09-13.07.2007, Sankt Petersburg, Rosja
30. Popena Ł., Gdaniec Z., "NMR structural studies of RNA duplex with dinucleotide AA bulge", IIIrd Symposium on: Nuclear Magnetic Resonance in Chemistry, Biology and Medicine, 20-22.09.2007, Warszawa
31. Pasternak K., Popena Ł., Pasternak A., Kierzek R., Gdaniec Z., "NMR studies of 2'-O-MeRNA-LNA/RNA and 2'-O-MeRNA-RNA/RNA duplexes containing LNA

- uridine", IIIrd Symposium on: Nuclear Magnetic Resonance in Chemistry, Biology and Medicine, 20-22.09.2007, Warszawa
32. Kaliszan D., Popena Ł., Lawenda M., Gdaniec Z., Meyer N., Stroiński M., Adamiak R. W., "Digital Science Library as contemporary tool in remote instrumentation systems", IIIrd Symposium on: Nuclear Magnetic Resonance in Chemistry, Biology and Medicine, 20-22.09.2007, Warszawa
 33. Szachniuk M., Popena M., Popena Ł., Błażewicz J., "Constructing transfer pathways in multidimensional NMR spectra of RNAs" RECOMB'08: The 12th Annual International Conference on Research in Computational Molecular Biology, 30.03-02.04.2008, Singapur
 34. Szachniuk M., Popena M., Popena Ł., Błażewicz J., "An analysis of transfer pathway reconstruction problem in multidimensional NMR spectra", Bioinformatics 2008, 24-27.04.2008, Warszawa

Aneks 4. Więzy NOE wykorzystane podczas obliczeń strukturalnych

Tabela A1. Minimalne (D_d) oraz maksymalne (D_g) odległości międzyprotonowe otrzymane metodą ISPA z pomiaru objętości sygnałów korelacyjnych widm 2D NOESY dupleksu I. Wartości te stanowiły odpowiednio dolne i górne granice wiązków odległościowych wykorzystanych podczas obliczeń strukturalnych dupleksu referencyjnego.

Atom 1	Atom 2	D_d [Å]	D_g [Å]	Atom 1	Atom 2	D_d [Å]	D_g [Å]
G1:H1'	G1:H5'#	3.60	5.51	A3:H2	A3:H2'	4.01	6.00
G1:H1'	G1:H5'#	3.95	6.00	A3:H2	G19:H8	3.98	6.00
G1:H1'	G1:H8	2.87	4.39	A3:H2'	A3:H1'	2.38	3.65
G1:H1'	C2:H6	2.96	4.52	A3:H2'	A3:H3'	1.77	2.70
G1:H1'	C2:H5	3.95	6.00	A3:H2'	A3:H8	3.23	4.95
G1:H2'	G1:H5'#	3.36	5.14	A3:H2'	G4:H1'	3.39	5.18
G1:H2'	G1:H1'	2.50	3.83	A3:H4'	A3:H1'	3.15	4.82
G1:H2'	G1:H3'	2.13	3.25	A3:H5'#	A3:H1'	4.30	6.00
G1:H2'	G1:H4'	3.46	5.30	A3:H5'#	A3:H3'	2.40	3.67
G1:H2'	G1:H8	2.99	4.57	A3:H5'#	A3:H8	2.73	4.18
G1:H2'	C2:H5'#	3.36	4.86	A3:H5'#	A3:H8	3.03	4.64
G1:H2'	C2:H1'	3.55	5.43	A3:H8	C2:H3'	2.51	3.84
G1:H2'	C2:H5	3.11	4.75	A3:H8	C2:H6	3.46	5.29
G1:H3'	G1:H1'	3.06	4.69	A3:H8	A3:H3'	2.51	3.83
G1:H3'	G1:H8	2.69	4.11	G4:H1'	A3:H2	2.79	4.27
G1:H3'	C2:H5	3.16	4.83	G4:H1'	G4:H2'	2.44	3.73
G1:H3'	C2:H6	2.39	3.65	G4:H1'	G4:H4'	2.69	4.12
G1:H4'	G1:H1'	2.59	3.97	G4:H1'	G4:H5'#	4.19	6.00
G1:H4'	G1:H8	3.43	5.25	G4:H1'	G4:H8	3.16	4.84
G1:H5'	G1:H5''	1.59	2.43	G4:H1'	A5:H8	3.26	4.99
G1:H5'#	G1:H3'	2.36	3.61	G4:H2'	G4:H8	3.11	4.75
G1:H5'#	G1:H4'	1.97	3.02	G4:H2'	A5:H8	2.10	3.21
G1:H5'#	G1:H8	2.53	3.87	G4:H3'	G4:H1'	2.67	4.09
G1:H5'#	G1:H8	2.77	4.24	G4:H3'	G4:H8	2.33	3.57
C2:H1'	C2:H2'	2.27	3.47	G4:H3'	A5:H8	2.41	3.68
C2:H1'	C2:H4'	2.71	4.14	G4:H5'#	G4:H8	2.70	4.13
C2:H1'	C2:H5	3.78	5.79	G4:H8	A3:H3'	2.80	4.28
C2:H1'	C2:H6	2.97	4.54	G4:H8	A3:H8	3.73	5.70
C2:H1'	A3:H8	3.34	5.11	G4:H8	A5:H8	4.10	6.00
C2:H2'	C2:H5	3.91	5.97	A5:H1'	G4:H2'	3.19	4.89
C2:H2'	A3:H1'	3.79	5.79	A5:H1'	A5:H2'	2.39	3.65
C2:H2'	A3:H8	2.11	3.23	A5:H1'	A5:H8	3.00	4.58
C2:H3'	C2:H1'	2.91	4.46	A5:H1'	G6:H8	3.48	5.33
C2:H3'	C2:H6	2.45	3.75	A5:H2	A5:H1'	3.63	5.55
C2:H5	G1:H8	3.48	5.33	A5:H2	A5:H2'	3.84	5.87
C2:H5	C2:H3'	3.49	5.33	A5:H2'	A5:H8	3.05	4.66
C2:H5	C2:H6	2.12	3.24	A5:H2'	G6:H1'	3.29	5.03
C2:H5'#	C2:H1'	3.98	6.00	A5:H3'	G6:H8	2.37	3.63
C2:H5'#	C2:H6	2.61	3.99	A5:H4'	A5:H1'	2.61	4.00
C2:H6	G1:H4'	4.40	6.00	A5:H4'	A5:H8	3.12	4.77
C2:H6	G1:H8	3.84	5.88	A5:H5'#	A5:H8	2.88	4.40
C2:H6	C2:H4'	3.09	4.73	A5:H8	A5:H3'	2.49	3.81
A3:H1'	A3:H3'	3.06	4.68	A5:H8	A5:H5'#	2.92	4.46
A3:H1'	A3:H5'#	4.54	6.00	G6:H1'	A5:H2	2.64	4.04
A3:H1'	A3:H8	3.01	4.61	G6:H1'	G6:H2'	2.19	3.34
A3:H1'	G4:H8	3.72	5.68	G6:H1'	G6:H8	3.15	4.81
A3:H2	A3:H1'	3.58	5.47	G6:H1'	A7:H8	3.41	5.22

Atom 1	Atom 2	D _a [Å]	D _g [Å]	Atom 1	Atom 2	D _a [Å]	D _g [Å]
G6:H2'	G6:H8	3.14	4.80	C9:H6	G10:H8	3.43	5.24
G6:H2'	A7:H1'	3.36	5.14	G10:H1'	G10:H5#	3.53	5.40
G6:H3'	G6:H8	2.34	3.59	G10:H1'	G10:H5#	4.02	6.00
G6:H3'	A7:H8	2.42	3.70	G10:H1'	G10:H8	2.65	4.05
G6:H5#	G6:H8	2.68	4.09	G10:H2'	G10:H8	2.47	3.78
G6:H8	A5:H8	3.60	5.51	G10:H2'	G10:H1'	2.33	3.56
A7:H1'	A7:H2	4.26	6.00	G10:H2'	G10:H3'	1.74	2.66
A7:H1'	A7:H3'	2.99	4.56	G10:H3'	G10:H1'	2.95	4.50
A7:H1'	A7:H4'	2.71	4.14	G10:H3'	G10:H8	2.29	3.51
A7:H1'	A7:H5#	4.64	6.00	G10:H4'	G10:H3'	1.89	2.88
A7:H1'	A7:H8	2.90	4.44	G10:H4'	G10:H1'	2.61	3.98
A7:H1'	G8:H8	3.38	5.17	G10:H4'	G10:H8	3.46	5.29
A7:H2	A7:H2'	4.04	6.00	G10:H5#	G10:H3'	2.24	3.43
A7:H2	G8:H8	3.57	5.45	G10:H5#	G10:H4'	1.88	2.87
A7:H2	C15:H6	4.14	6.00	G10:H5#	G10:H8	2.88	4.40
A7:H2'	A7:H1'	2.23	3.41	G10:H8	C9:H5	4.11	6.00
A7:H5#	A7:H1'	4.56	6.00	C11:H1'	C11:H5	4.14	6.00
A7:H5#	A7:H8	2.92	4.46	C11:H1'	C11:H5#	3.89	5.95
A7:H5#	A7:H8	2.75	3.97	C11:H1'	C11:H5#	4.53	6.00
A7:H8	G6:H2'	2.13	3.26	C11:H1'	C11:H6	2.71	4.14
A7:H8	G6:H8	3.73	5.71	C11:H1'	G12:H8	3.17	4.85
A7:H8	A7:H2'	2.75	4.20	C11:H2'	C11:H6	2.53	3.87
A7:H8	A7:H3'	2.38	3.64	C11:H2'	C11:H1'	2.27	3.46
G8:H1'	A7:H2	2.66	4.07	C11:H2'	G12:H8	2.02	3.09
G8:H1'	G8:H5#	3.67	5.61	C11:H3'	C11:H1'	3.03	4.64
G8:H1'	G8:H8	3.01	4.61	C11:H3'	C11:H6	2.14	3.27
G8:H1'	C9:H6	3.67	5.61	C11:H3'	G12:H8	2.37	3.62
G8:H2'	G8:H1'	2.17	3.32	C11:H4'	C11:H1'	2.61	3.98
G8:H2'	C9:H5	3.10	4.74	C11:H4'	C11:H6	3.02	4.62
G8:H2'	C9:H6	2.05	3.14	C11:H5	C11:H3'	3.88	5.93
G8:H3'	G8:H1'	2.82	4.31	C11:H5	C11:H5#	3.91	5.98
G8:H3'	G8:H8	2.41	3.69	C11:H5	C11:H6	2.04	3.12
G8:H5#	G8:H8	2.67	4.08	C11:H5'	C11:H5"	1.34	2.04
G8:H8	A7:H3'	2.31	3.54	C11:H5#	C11:H3'	2.23	3.42
G8:H8	A7:H8	3.66	5.59	C11:H5#	C11:H4'	1.90	2.90
C9:H1'	G8:H2'	3.42	5.23	C11:H5#	C11:H6	2.30	3.52
C9:H1'	C9:H2'	2.22	3.40	C11:H5#	C11:H6	2.69	4.11
C9:H1'	C9:H5	3.93	6.00	G12:H1'	G12:H5#	3.57	5.46
C9:H1'	C9:H5#	3.72	5.69	G12:H1'	G12:H8	3.00	4.59
C9:H1'	C9:H6	2.92	4.47	G12:H1'	C13:H6	2.94	4.49
C9:H2'	C9:H6	2.91	4.46	G12:H2'	G12:H1'	2.50	3.83
C9:H2'	G10:H1'	3.71	5.68	G12:H2'	G12:H8	2.74	4.19
C9:H2'	G10:H8	2.19	3.35	G12:H2'	C13:H1'	3.58	5.47
C9:H3'	C9:H1'	2.89	4.43	G12:H2'	C13:H5	2.94	4.49
C9:H3'	G10:H8	2.42	3.70	G12:H3'	G12:H1'	3.24	4.96
C9:H4'	C9:H1'	2.64	4.04	G12:H3'	G12:H8	2.78	4.24
C9:H5	G8:H3'	3.04	4.65	G12:H3'	C13:H6	2.85	4.36
C9:H5	G8:H8	3.32	5.08	G12:H5#	G12:H8	2.65	4.06
C9:H5	C9:H5#	4.63	6.00	G12:H8	C11:H6	3.32	5.07
C9:H5	C9:H6	2.10	3.21	C13:H1'	C13:H3'	3.12	4.77
C9:H5#	C9:H6	2.78	4.25	C13:H1'	C13:H5	3.52	5.37
C9:H5#	C9:H6	3.83	5.85	C13:H1'	C13:H6	2.92	4.47
C9:H6	G8:H3'	2.22	3.39	C13:H1'	U14:H6	3.30	5.04
C9:H6	C9:H3'	2.38	3.65	C13:H2'	C13:H1'	2.28	3.48

Atom 1	Atom 2	D _a [Å]	D _g [Å]	Atom 1	Atom 2	D _a [Å]	D _g [Å]
C13:H2'	C13:H6	2.84	4.34	U16:H5	C15:H5	3.23	4.93
C13:H2'	U14:H6	1.94	2.97	U16:H5	U16:H6	2.09	3.20
C13:H3'	C13:H5	4.14	6.00	U16:H5	C17:H5	3.14	4.79
C13:H3'	C13:H6	2.46	3.75	U16:H5#	U16:H6	2.82	4.31
C13:H3'	U14:H5	3.94	5.70	U16:H6	C15:H1'	3.27	5.00
C13:H3'	U14:H6	2.59	3.95	U16:H6	C15:H3'	2.18	3.34
C13:H4'	C13:H1'	2.65	4.05	U16:H6	U16:H3'	2.29	3.50
C13:H5	G12:H8	3.50	5.36	U16:H6	U16:H4'	3.52	5.38
C13:H5	C13:H5#	4.48	6.00	U16:H6	C17:H5	3.56	5.44
C13:H5	C13:H6	2.13	3.26	C17:H1'	A5:H2	2.78	4.24
C13:H5#	C13:H1'	4.12	6.00	C17:H1'	U16:H2'	2.85	4.36
C13:H5#	C13:H6	2.63	4.03	C17:H1'	C17:H5#	3.79	5.80
C13:H6	C13:H5#	3.02	4.61	C17:H1'	C17:H5#	4.22	6.00
U14:H1'	C13:H2'	3.63	5.55	C17:H1'	C17:H6	3.00	4.58
U14:H1'	U14:H3'	3.13	4.78	C17:H1'	U18:H6	3.13	4.79
U14:H1'	U14:H4'	2.53	3.87	C17:H2'	C17:H1'	2.22	3.39
U14:H1'	C15:H6	3.17	4.84	C17:H2'	C17:H5	4.40	6.00
U14:H2'	U14:H1'	2.20	3.36	C17:H2'	C17:H6	2.76	4.22
U14:H2'	U14:H6	3.13	4.79	C17:H2'	U18:H1'	3.22	4.93
U14:H2'	C15:H6	2.01	3.08	C17:H2'	U18:H5	2.68	4.10
U14:H3'	C15:H5	2.89	4.42	C17:H2'	U18:H6	2.00	3.06
U14:H3'	C15:H6	2.25	3.45	C17:H3'	C17:H1'	3.63	5.56
U14:H4'	U14:H6	3.00	4.59	C17:H3'	U18:H6	2.85	4.36
U14:H5	C13:H6	3.93	6.00	C17:H4'	C17:H1'	2.79	4.27
U14:H5	C13:H2'	2.91	4.45	C17:H5	U16:H1'	3.57	5.46
U14:H5	U14:H6	2.11	3.22	C17:H5	U16:H2'	2.86	4.13
U14:H5	C15:H5	3.36	5.14	C17:H5	C17:H6	2.04	3.12
U14:H5#	U14:H6	2.74	4.19	C17:H5#	C17:H6	2.72	3.94
U14:H6	U14:H1'	2.74	4.19	C17:H6	C17:H3'	2.27	3.47
U14:H6	U14:H3'	2.13	3.26	U18:H1'	U18:H3'	2.92	4.46
U14:H6	C15:H5	3.00	4.59	U18:H1'	U18:H4'	2.69	4.11
C15:H1'	A7:H2	2.75	4.20	U18:H1'	U18:H6	2.85	4.36
C15:H1'	U14:H2'	2.88	4.40	U18:H1'	G19:H8	2.98	4.55
C15:H1'	C15:H6	2.73	4.18	U18:H2'	U18:H1'	2.31	3.54
C15:H2'	C15:H1'	2.20	3.37	U18:H2'	U18:H5	4.43	6.00
C15:H2'	U16:H1'	3.61	5.52	U18:H2'	G19:H1'	3.20	4.89
C15:H2'	U16:H5	2.65	4.05	U18:H2'	G19:H8	1.97	3.02
C15:H2'	U16:H6	2.01	3.08	U18:H3'	U18:H6	2.21	3.39
C15:H3'	C15:H5	3.67	5.61	U18:H3'	G19:H8	2.63	4.02
C15:H3'	C15:H6	2.22	3.40	U18:H4'	U18:H6	2.90	4.43
C15:H3'	U16:H5	2.93	4.47	U18:H5	C17:H1'	3.64	5.56
C15:H5	C15:H6	2.10	3.21	U18:H5	C17:H5	2.95	4.51
C15:H5#	C15:H1'	4.03	6.00	U18:H5	C17:H6	3.19	4.88
C15:H5#	C15:H6	2.49	3.80	U18:H5	U18:H6	2.11	3.23
C15:H6	U16:H5	2.62	4.01	U18:H5	G19:H8	3.57	5.46
U16:H1'	U16:H3'	2.89	4.42	U18:H5#	U18:H6	2.86	4.38
U16:H1'	U16:H5#	4.17	6.00	G19:H1'	A3:H2	2.91	4.45
U16:H1'	U16:H6	2.74	4.19	G19:H1'	G19:H5#	4.41	6.00
U16:H1'	C17:H6	3.23	4.94	G19:H1'	G19:H8	3.00	4.59
U16:H2'	U16:H1'	2.22	3.39	G19:H1'	C20:H5	4.32	6.00
U16:H2'	U16:H6	2.80	4.29	G19:H1'	C20:H6	3.62	5.54
U16:H2'	C17:H6	1.95	2.98	G19:H2'	G19:H1'	2.19	3.35
U16:H3'	C17:H6	2.40	3.67	G19:H2'	G19:H8	2.90	4.43
U16:H4'	U16:H1'	2.61	3.99	G19:H2'	C20:H1'	3.55	5.43

Atom 1	Atom 2	D _d [Å]	D _g [Å]	Atom 1	Atom 2	D _d [Å]	D _g [Å]
G19:H2'	C20:H5	3.13	4.78	G4:H1	U16:H3	1.80	6.00
G19:H2'	C20:H6	2.05	3.13	G4:H1	U18:H5	1.80	6.00
G19:H3'	G19:H1'	3.14	4.81	G6:H1	A7:H1'	1.80	6.00
G19:H3'	G19:H2'	1.76	2.70	G6:H1	A7:H2	1.80	6.00
G19:H3'	G19:H8	2.10	3.21	G8:H1	A7:H2	1.80	6.00
G19:H3'	C20:H6	2.57	3.94	G8:H1	C9:H42	1.80	6.00
G19:H4'	G19:H1'	2.91	4.45	G8:H1	G12:H1	1.80	6.00
G19:H4'	G19:H8	2.90	4.43	U14:H3	G6:H1	1.80	6.00
G19:H5'#	G19:H8	2.72	4.16	U14:H3	G6:H22	1.80	6.00
G19:H8	U18:H6	3.50	5.36	U14:H3	G8:H1	1.80	6.00
G19:H8	C20:H6	3.51	5.37	U14:H3	C13:H42	1.80	6.00
C20:H1'	C20:H5'#	3.84	5.87	U14:H3	C15:H41	1.80	6.00
C20:H1'	C20:H6	2.89	4.42	U14:H3	C15:H42	1.80	6.00
C20:H2'	C20:H1'	2.18	3.33	U14:H3	C15:H5	1.80	6.00
C20:H2'	C20:H5	3.67	5.61	U14:H3	C15:H6	1.80	6.00
C20:H2'	C20:H6	2.62	4.01	U16:H3	G4:H22	1.80	6.00
C20:H3'	C20:H1'	2.61	4.00	U16:H3	G6:H1	1.80	6.00
C20:H3'	C20:H5	3.85	5.88	U16:H3	C15:H42	1.80	6.00
C20:H4'	C20:H1'	2.95	4.51	U16:H3	C17:H41	1.80	6.00
C20:H5	G19:H8	3.33	5.10	U16:H3	C17:H42	1.80	6.00
C20:H5	C20:H1'	4.72	6.00	U16:H3	C17:H5	1.80	6.00
C20:H5	C20:H6	2.04	3.12	U16:H3	C17:H6	1.80	6.00
C20:H5'#	C20:H6	2.88	4.41	U18:H3	C2:H42	1.80	6.00
C20:H5'#	C20:H6	3.30	5.04	U18:H3	G4:H1	1.80	6.00
C20:H6	C20:H3'	2.19	3.35	U18:H3	C17:H42	1.80	6.00
				U18:H3	G19:H1	1.80	6.00
C2:H42	A3:H61	1.80	6.00	G19:H1	A3:H61	1.80	6.00
G4:H1	A5:H2	1.80	6.00	G19:H1	C20:H42	1.80	6.00

Tabela A2. Minimalne (D_d) oraz maksymalne (D_g) odległości międzyprotonowe otrzymane metodą ISPA z pomiaru objętości sygnałów korelacyjnych widm 2D NOESY dupletu II.

Atom 1	Atom 2	D _d [Å]	D _g [Å]	Atom 1	Atom 2	D _d [Å]	D _g [Å]
G1:H1'	G1:H3'	2.72	4.16	C2:H1'	C2:H6	2.81	4.30
G1:H1'	G1:H4'	2.78	4.26	C2:H1'	A3:H1'	3.67	5.62
G1:H1'	G1:H8	2.79	4.26	C2:H1'	A3:H8	2.89	4.42
G1:H2'	G1:H1'	2.29	3.51	C2:H2'	C2:H1'	2.21	3.38
G1:H2'	G1:H3'	2.06	3.15	C2:H2'	C2:H6	2.68	4.10
G1:H2'	G1:H8	2.66	4.06	C2:H2'	A3:H8	2.08	3.18
G1:H2'	C2:H1'	3.30	5.04	C2:H3'	C2:H6	2.19	3.35
G1:H2'	C2:H5	2.78	4.26	C2:H5	G1:H1'	3.62	5.54
G1:H2'	C2:H6	2.12	3.24	C2:H5	G1:H8	3.35	5.13
G1:H3'	G1:H8	2.45	3.75	C2:H5	C2:H6	2.07	3.17
G1:H3'	C2:H5	2.65	4.06	C2:H5'#	C2:H6	2.93	4.47
G1:H4'	G1:H5'#	2.06	3.15	A3:H1'	C2:H2'	2.63	4.02
G1:H4'	G1:H8	3.21	4.91	A3:H1'	A3:H2	3.73	5.70
G1:H5'#	G1:H3'	2.32	3.55	A3:H1'	A3:H3'	2.76	4.23
G1:H5'#	G1:H8	2.77	4.24	A3:H1'	A3:H5'#	3.36	5.14
G1:H8	G1:H5'#	2.56	3.91	A3:H1'	A3:H8	2.84	4.34
C2:H1'	C2:H3'	2.53	3.87	A3:H1'	G4:H8	3.00	4.59
C2:H1'	C2:H5	3.78	5.79	A3:H2	A3:H2'	3.85	5.88
C2:H1'	C2:H5'#	3.48	5.32	A3:H2	G4:H8	3.99	6.11

Atom 1	Atom 2	D _a [Å]	D _g [Å]	Atom 1	Atom 2	D _a [Å]	D _g [Å]
A3:H2	U19:H2'	4.16	6.36	A6:H2	G7:H8	4.00	6.50
A3:H2	G20:H2'	4.33	6.61	A6:H2'	A6:H1'	2.13	3.25
A3:H2	G20:H8	4.05	6.20	A6:H2'	A6:H2	3.65	5.57
A3:H2'	A3:H1'	2.11	3.23	A6:H2'	G7:H8	2.09	3.19
A3:H2'	G4:H8	2.12	3.24	A6:H3'	G7:H8	2.80	4.29
A3:H3'	A3:H8	2.36	3.60	A6:H5'#	A6:H8	2.91	4.44
A3:H3'	G4:H8	2.56	3.91	A6:H8	A6:H5'#	2.63	4.02
A3:H4'	A3:H1'	2.60	3.98	G7:H1'	A6:H2	2.67	4.08
A3:H5'#	A3:H8	2.64	4.04	G7:H1'	G7:H8	2.89	4.41
A3:H8	C2:H5	3.81	5.83	G7:H1'	A8:H8	2.80	4.28
A3:H8	C2:H6	3.00	4.58	G7:H2'	G7:H1'	2.17	3.32
G4:H1'	A3:H2	2.63	4.02	G7:H2'	A8:H8	1.99	3.05
G4:H1'	A3:H2'	3.07	4.70	G7:H2'	A8:H8	2.40	3.67
G4:H1'	G4:H3'	2.77	4.23	G7:H3'	A8:H8	2.53	3.86
G4:H1'	G4:H4'	2.56	3.92	G7:H3'	A8:H8	2.53	3.86
G4:H1'	G4:H5'#	3.53	5.40	G7:H5'#	G7:H8	2.54	3.89
G4:H1'	G4:H8	2.90	4.43	G7:H8	A6:H8	3.48	5.32
G4:H1'	A5:H3'	4.00	6.50	G7:H8	A8:H8	3.39	5.19
G4:H1'	A5:H8	3.11	4.76	A8:H1'	A8:H2	3.74	5.72
G4:H2'	A3:H2	4.07	6.22	A8:H1'	A8:H5'#	3.69	5.64
G4:H2'	G4:H1'	2.18	3.33	A8:H1'	A8:H8	2.87	4.39
G4:H2'	G4:H8	2.58	3.95	A8:H1'	G9:H8	3.01	4.61
G4:H2'	A5:H8	2.19	3.35	A8:H2	A8:H2'	3.86	5.90
G4:H3'	G4:H8	2.35	3.59	A8:H2	G9:H8	4.00	6.50
G4:H5'#	G4:H8	2.81	4.29	A8:H2	G9:H8	4.03	6.16
G4:H5'#	G4:H8	3.16	4.83	A8:H2	U15:H2'	3.39	5.18
G4:H8	A3:H8	3.50	5.35	A8:H2	U15:H1'	4.00	6.50
G4:H8	G4:H4'	2.97	4.55	A8:H2	C16:H6	3.76	5.75
G4:H8	A5:H8	3.63	5.55	A8:H2'	A8:H1'	2.25	3.44
A5:H1'	G4:H1'	4.07	6.23	A8:H2'	A8:H8	2.60	3.98
A5:H1'	G4:H2'	3.34	5.10	A8:H2'	G9:H8	2.12	3.24
A5:H1'	A5:H2	3.80	5.81	A8:H2'	A8:H1'	2.45	3.74
A5:H1'	A5:H5'#	3.37	5.15	A8:H3'	A8:H1'	2.45	3.74
A5:H1'	A5:H8	2.88	4.40	A8:H3'	G9:H8	2.51	3.84
A5:H1'	A6:H8	3.18	4.87	A8:H3'	G9:H8	2.51	3.84
A5:H2	A6:H2	3.90	5.96	A8:H4'	A8:H1'	2.71	4.15
A5:H2	U17:H5	4.00	6.50	A8:H4'	G9:H8	3.80	5.81
A5:H2	U17:H6	5.00	25.50	A8:H8	A8:H5'#	2.61	3.99
A5:H2	C18:H5	5.00	25.50	G9:H1'	A8:H2'	3.05	4.67
A5:H2'	A5:H1'	2.22	3.40	G9:H1'	G9:H5'#	3.26	4.98
A5:H2'	A5:H3'	2.03	3.11	G9:H1'	G9:H8	2.88	4.41
A5:H2'	A5:H8	2.30	3.52	G9:H1'	C10:H5	3.87	5.92
A5:H3'	A5:H1'	2.83	4.33	G9:H2'	C10:H1'	2.91	4.45
A5:H3'	A5:H5'#	2.27	3.47	G9:H2'	C10:H6	1.91	2.92
A5:H3'	A5:H8	2.36	3.61	G9:H5'#	G9:H8	2.70	4.13
A5:H3'	A6:H8	2.64	4.04	G9:H5'#	G9:H8	3.04	4.65
A5:H4'	A5:H1'	2.76	4.22	G9:H8	A8:H8	3.53	5.39
A5:H4'	A5:H3'	2.17	3.32	G9:H8	C10:H6	3.56	5.44
A5:H5'#	A5:H8	2.89	4.42	G9:H8	C10:H6	4.00	6.50
A6:H1'	A5:H2	3.26	4.99	C10:H1'	C10:H3'	2.68	4.09
A6:H1'	A5:H2'	3.13	4.79	C10:H1'	C10:H5	3.77	5.77
A6:H1'	A6:H5'#	3.26	4.99	C10:H1'	C10:H5'#	3.33	5.09
A6:H1'	A6:H5'#	3.49	5.34	C10:H1'	C10:H5'#	3.59	5.50
A6:H1'	A6:H8	2.82	4.31	C10:H1'	C10:H6	2.79	4.27
				C10:H1'	G11:H8	3.00	4.59
				C10:H2'	C10:H1'	2.16	3.30
				C10:H2''	C10:H6	2.79	4.26

Atom 1	Atom 2	D _a [Å]	D _g [Å]	Atom 1	Atom 2	D _a [Å]	D _g [Å]
C10:H2'	G11:H8	2.09	3.20	G13:H8	C14:H5	3.37	5.16
C10:H3	C10:H6	2.33	3.57	C14:H1'	G13:H2'	3.16	4.84
C10:H4'	C10:H1'	2.80	4.29	C14:H1'	C14:H5	4.02	6.15
C10:H4'	C10:H6	2.77	4.24	C14:H1'	C14:H5#	3.33	5.09
C10:H5	G9:H8	3.41	5.22	C14:H1'	C14:H6	2.83	4.32
C10:H5	C10:H6	2.05	3.14	C14:H1'	U15:H6	2.91	4.45
C10:H5#	C10:H6	2.92	4.46	C14:H2'	C14:H1'	2.18	3.33
C10:H6	G9:H1'	3.33	5.10	C14:H2'	C14:H6	2.99	4.57
C10:H6	C10:H5#	2.74	4.20	C14:H2'	U15:H5	2.64	4.03
C10:H6	G11:H8	3.16	4.84	C14:H2'	U15:H6	1.93	2.95
G11:H1'	C10:H2'	3.29	5.03	C14:H3'	C14:H1'	2.40	3.67
G11:H1'	G11:H8	2.72	4.16	C14:H3'	C14:H5	3.14	4.80
G11:H2'	G11:H1'	2.16	3.31	C14:H3'	C14:H6	2.12	3.25
G11:H2'	G11:H8	2.51	3.84	C14:H3'	U15:H5	2.77	4.23
G11:H3'	G11:H1'	2.72	4.15	C14:H5	G13:H3'	2.89	4.42
G11:H3'	G11:H2'	1.88	2.88	C14:H5	C14:H6	2.09	3.19
G11:H3'	G11:H8	2.24	3.43	C14:H5#	C14:H6	2.65	4.05
G11:H4'	G11:H1'	2.53	3.88	C14:H5#	C14:H6	3.24	4.96
G11:H4'	G11:H8	3.02	4.61	C14:H6	C14:H5#	2.68	4.10
G11:H5#	G11:H8	2.85	4.36	C14:H6	U15:H5	4.00	6.50
G11:H8	C10:H3'	2.40	3.68	C14:H6	U15:H6	4.00	6.50
G11:H8	C10:H5	4.00	6.50	U15:H1'	C14:H2'	3.26	4.99
G11:H8	C10:H6	4.00	6.50	U15:H1'	U15:H4'	2.66	4.06
G11:H8	G11:H5#	3.30	5.04	U15:H1'	U15:H5#	3.43	5.25
C12:H1'	C12:H5	3.68	5.63	U15:H1'	U15:H6	2.89	4.42
C12:H1'	C12:H5#	3.17	4.85	U15:H1'	C16:H6	3.12	4.77
C12:H1'	C12:H5#	3.57	5.46	U15:H2'	U15:H1'	2.15	3.28
C12:H1'	C12:H6	2.67	4.08	U15:H3'	U15:H6	2.15	3.28
C12:H1'	G13:H8	2.83	4.33	U15:H5	C14:H6	3.20	4.90
C12:H2'	C12:H1'	2.07	3.16	U15:H5	U15:H6	2.07	3.17
C12:H2'	G13:H1'	2.76	4.22	U15:H5	C16:H5	3.06	4.68
C12:H4'	C12:H1'	2.58	3.95	U15:H5#	U15:H6	2.83	4.33
C12:H4'	C12:H5#	1.90	2.90	U15:H6	C14:H6	3.20	4.89
C12:H4'	C12:H6	2.83	4.33	U15:H6	C16:H5	4.00	6.50
C12:H4'	G13:H8	3.53	5.41	C16:H1'	U15:H2'	3.09	4.72
C12:H5	C12:H6	1.93	2.96	C16:H1'	C16:H3'	2.79	4.26
C12:H5#	C12:H3'	2.34	3.58	C16:H1'	C16:H4'	2.63	4.02
C12:H5#	C12:H6	2.40	3.67	C16:H1'	C16:H5#	3.22	4.93
C12:H5#	C12:H6	2.61	3.99	C16:H1'	C16:H5#	3.39	5.19
G13:H1'	G13:H5#	3.31	5.07	C16:H1'	C16:H6	2.61	3.99
G13:H1'	G13:H8	2.83	4.32	C16:H2'	C16:H1'	2.24	3.43
G13:H1'	C14:H5	3.68	5.62	C16:H2'	U17:H5	2.98	4.56
G13:H1'	C14:H6	2.94	4.48	C16:H5	U15:H6	3.53	5.40
G13:H2'	G13:H1'	2.20	3.37	C16:H5	C16:H6	2.12	3.24
G13:H2'	G13:H8	2.81	4.29	C16:H5#	C16:H6	2.90	4.44
G13:H2'	C14:H5	2.57	3.93	U17:H1'	C16:H2'	2.89	4.42
G13:H2'	C14:H6	2.05	3.14	U17:H1'	U17:H4'	2.69	4.12
G13:H3'	G13:H1'	2.66	4.07	U17:H1'	U17:H5#	3.52	5.38
G13:H3'	G13:H8	2.31	3.53	U17:H2'	U17:H1'	2.20	3.36
G13:H3'	C14:H6	2.60	3.98	U17:H2'	C18:H5	2.69	4.11
G13:H4'	G13:H1'	2.56	3.91	U17:H3'	U17:H1'	2.81	4.29
G13:H5#	G13:H8	2.73	4.18	U17:H5	C16:H3'	3.72	5.69
G13:H8	C12:H5	4.00	6.50	U17:H6	U17:H2'	3.21	4.91
G13:H8	C12:H6	3.00	4.59	U17:H6	U17:H5	2.15	3.28

Atom 1	Atom 2	D _a [Å]	D _g [Å]	Atom 1	Atom 2	D _a [Å]	D _g [Å]
U17:H6	U17:H5'#	2.94	4.49	G20:H4'	G20:H1'	2.61	3.99
U17:H6	C18:H5	4.00	6.50	G20:H4'	G20:H8	3.19	4.87
C18:H1'	A5:H2	2.84	4.34	G20:H5'#	G20:H8	2.76	4.22
C18:H1'	A6:H2	2.83	4.33	G20:H8	U19:H3'	2.41	3.69
C18:H1'	C18:H4'	2.74	4.20	G20:H8	U19:H5	4.00	6.50
C18:H1'	C18:H5'#	3.51	5.37	G20:H8	U19:H6	3.20	4.89
C18:H2'	C18:H1'	2.19	3.35	C21:H1'	G20:H2'	3.11	4.76
C18:H2'	U19:H5	2.63	4.02	C21:H1'	C21:H3'	2.58	3.95
C18:H2'	U19:H6	2.05	3.14	C21:H1'	C21:H4'	2.69	4.12
C18:H5	U17:H3'	2.95	4.51	C21:H1'	C21:H5'#	3.62	5.53
C18:H5	C18:H1'	3.63	5.55	C21:H1'	C21:H5'#	3.78	5.78
C18:H5	C18:H3'	3.27	5.01	C21:H1'	C21:H6	2.88	4.41
C18:H5	C18:H6	2.07	3.17	C21:H2'	C21:H1'	2.10	3.22
C18:H6	U17:H2'	2.06	3.15	C21:H2'	C21:H6	2.54	3.88
C18:H6	C18:H1'	2.83	4.33	C21:H4'	C21:H5'#	1.91	2.93
C18:H6	C18:H2'	2.98	4.56	C21:H5	G20:H1'	3.70	5.66
C18:H6	C18:H5'#	3.04	4.65	C21:H5	G20:H3'	2.94	4.50
C18:H6	U19:H5	3.48	5.33	C21:H5	G20:H8	3.20	4.89
U19:H1'	A3:H2	4.00	6.12	C21:H5	C21:H1'	3.71	5.67
U19:H1'	U19:H5'#	3.18	4.87	C21:H5	C21:H2'	3.16	4.84
U19:H1'	G20:H8	2.81	4.30	C21:H5	C21:H3'	2.84	4.34
U19:H2'	U19:H1'	2.14	3.27	C21:H5	C21:H6	1.99	3.04
U19:H2'	G20:H8	1.96	3.00	C21:H5'#	C21:H6	3.03	4.64
U19:H3'	U19:H1'	2.69	4.12	C21:H6	G20:H8	3.38	5.17
U19:H4'	U19:H1'	2.55	3.91	C21:H6	C21:H3'	2.10	3.21
U19:H5	C18:H3'	2.76	4.23	C21:H6	C21:H4'	2.60	3.98
U19:H5	C18:H5	2.98	4.55	C21:H6	C21:H5'#	2.92	4.47
U19:H5	U19:H3'	2.92	4.47				
U19:H5	U19:H6	2.10	3.21	G4:H1	A3:H2	1.80	6.00
U19:H5'#	U19:H6	2.84	4.34	G7:H1	A8:H2	1.80	6.00
U19:H6	C18:H5	4.00	6.50	G9:H1	A8:H2	1.80	6.00
G20:H1'	A3:H2	2.72	4.16	G9:H1	C10:H42	1.80	6.00
G20:H1'	U19:H2'	2.93	4.49	G9:H1	G13:H1	1.80	6.00
G20:H1'	G20:H5'#	3.28	5.02	G13:H1	C14:H42	1.80	6.00
G20:H1'	G20:H8	2.90	4.43	U15:H3	G7:H1	1.80	6.00
G20:H1'	C21:H6	2.98	4.56	U15:H3	G9:H1	1.80	6.00
G20:H2'	G20:H1'	2.17	3.32	U15:H3	C14:H42	1.80	6.00
G20:H2'	G20:H8	2.88	4.40	U15:H3	C16:H41	1.80	6.00
G20:H2'	C21:H5	2.68	4.10	U15:H3	C16:H42	1.80	6.00
G20:H2'	C21:H6	2.04	3.11	U19:H3	G4:H1	1.80	6.00
G20:H3'	G20:H1'	2.77	4.24	U19:H3	C18:H42	1.80	6.00
G20:H3'	G20:H8	2.25	3.44	G20:H1	U19:H3	1.80	6.00
G20:H3'	C21:H6	2.50	3.82				

Tabela A3. Minimalne (D_a) oraz maksymalne (D_g) odległości międzyprotonowe otrzymane metodą ISPA z pomiaru objętości sygnałów korelacyjnych widm 2D NOESY dupletu III.

Atom 1	Atom 2	D _a [Å]	D _g [Å]	Atom 1	Atom 2	D _a [Å]	D _g [Å]
G1:H1'	G1:H2'	2.52	3.85	G1:H4'	G1:H1'	2.76	4.22
G1:H1'	G1:H3'	2.89	4.42	G1:H8	G1:H1'	3.08	4.71
G1:H1'	G1:H5'#	3.44	5.25	G1:H8	G1:H2'	3.10	4.74
G1:H3'	C2:H5	2.77	4.23	G1:H8	G1:H3'	2.29	3.50

Atom 1	Atom 2	D _a [Å]	D _g [Å]	Atom 1	Atom 2	D _a [Å]	D _g [Å]
G1:H8	G1:H4'	3.33	5.10	A5:H3'	A5:H1'	3.37	5.15
G1:H8	G1:H5'#	2.73	4.18	A5:H3'	A7:H8	5.00	25.00
G1:H8	G1:H5'#	2.78	4.25	A5:H8	G4:H1'	3.25	4.97
G1:H8	C2:H5	3.62	5.53	A5:H8	G4:H2'	2.48	3.79
C2:H1'	G1:H2'	3.22	4.93	A5:H8	A5:H1'	3.04	4.65
C2:H1'	C2:H5'#	3.25	4.97	A5:H8	A5:H5'#	3.14	4.81
C2:H1'	C2:H5	3.70	5.66	A5:H8	A6:H2	5.00	25.00
C2:H5	G1:H1'	3.17	4.84	A5:H8	A6:H8	4.20	6.50
C2:H5	G1:H2'	2.91	4.45	A6:H1'	A6:H2'	2.55	3.90
C2:H5	C2:H1'	4.20	6.50	A6:H1'	A6:H3'	3.28	5.01
C2:H6	G1:H1'	3.05	4.67	A6:H1'	A6:H4'	2.74	4.20
C2:H6	C2:H3'	2.22	3.40	A6:H1'	A6:H5'#	3.70	5.66
C2:H6	C2:H5	2.11	3.23	A6:H2	A6:H1'	3.62	5.54
A3:H1'	C2:H2'	2.86	4.38	A6:H2'	A6:H3'	2.30	3.51
A3:H1'	A3:H2'	2.25	3.45	A6:H2	A7:H1'	3.06	4.88
A3:H1'	A3:H3'	3.07	4.69	A6:H2	A7:H2'	5.00	25.00
A3:H1'	A3:H4'	2.67	4.09	A6:H2	U18:H1'	4.20	6.50
A3:H1'	A3:H5'#	3.50	5.36	A6:H2	C19:H1'	3.65	5.58
A3:H1'	G4:H1'	4.20	6.50	A6:H4'	A6:H3'	2.39	3.66
A3:H2	A3:H1'	3.93	6.00	A6:H4'	A6:H8	3.33	5.09
A3:H2	A3:H2'	3.96	6.05	A6:H5''	A6:H3'	2.48	3.80
A3:H2	G4:H1'	2.59	3.97	A6:H5'	A6:H3'	2.52	3.86
A3:H2	G4:H2'	4.17	6.38	A6:H8	A5:H1'	3.33	5.09
A3:H2	G4:H8	4.20	6.50	A6:H8	A5:H2'	2.85	4.36
A3:H2	G21:H1'	2.83	4.33	A6:H8	A5:H4'	3.60	5.50
A3:H2	G21:H8	3.99	6.10	A6:H8	A6:H1'	3.24	4.96
A3:H8	C2:H1'	2.94	4.49	A6:H8	A6:H2'	2.63	4.03
A3:H8	A3:H2'	2.71	4.15	A6:H8	A6:H3'	2.93	4.47
A3:H8	A3:H3'	2.59	3.96	A6:H8	A6:H4'	4.20	6.50
A3:H8	A3:H5'#	2.72	4.16	A6:H8	A6:H5'#	3.26	4.98
A3:H8	G4:H8	4.20	6.50	A6:H8	A7:H8	3.57	5.46
G4:H1'	A3:H1'	3.91	5.98	A7:H1'	A7:H4'	2.70	4.13
G4:H1'	A3:H2'	3.19	4.88	A7:H1'	A7:H5'#	3.06	5.17
G4:H1'	G4:H2'	2.24	3.42	A7:H1'	A7:H5'#	3.53	5.40
G4:H1'	G4:H3'	2.50	3.82	A7:H1'	G8:H1'	4.20	7.00
G4:H1'	G4:H4'	2.33	3.56	A7:H2	A7:H1'	4.20	6.50
G4:H1'	G4:H5'#	3.40	5.20	A7:H2'	G8:H1'	3.24	4.95
G4:H8	A3:H1'	3.32	5.08	A7:H2	G8:H1'	5.00	25.00
G4:H8	A3:H3'	2.70	4.13	A7:H2	U18:H1'	4.20	6.50
G4:H8	G4:H1'	3.24	4.95	A7:H2	C19:H1'	2.72	4.16
G4:H8	G4:H2'	3.02	4.62	A7:H2	C19:H5	5.00	25.00
G4:H8	G4:H3'	2.45	3.75	A7:H2	C19:H6	5.00	25.00
G4:H8	G4:H4'	3.18	4.86	A7:H3'	G8:H8	3.01	4.60
G4:H8	G4:H5'#	2.95	4.51	A7:H8	A6:H1'	3.35	5.12
G4:H8	A5:H2	5.00	25.00	A7:H8	A6:H3'	3.17	4.85
G4:H8	A5:H8	4.20	6.50	A7:H8	A7:H1'	3.18	4.87
A5:H1'	G4:H2'	3.40	5.21	A7:H8	A7:H4'	2.86	4.38
A5:H1'	A5:H2'	2.46	3.76	A7:H8	A7:H5'#	2.88	4.40
A5:H1'	A5:H4'	2.86	4.37	A7:H8	A7:H5'#	3.07	4.69
A5:H1'	A5:H5'	4.20	6.50	A7:H8	G8:H8	4.20	6.50
A5:H1'	A5:H5''	4.20	6.50	G8:H1'	G8:H2'	2.37	3.63
A5:H2	A5:H1'	4.17	6.37	G8:H1'	A9:H1'	4.20	6.50
A5:H2'	A5:H8	2.51	3.84	G8:H8	A7:H1'	3.39	5.19
A5:H2	A6:H1'	3.87	5.92	G8:H8	A7:H2'	2.87	4.39
A5:H2	A6:H8	5.00	25.00	G8:H8	G8:H1'	3.33	5.10
A5:H2	U18:H1'	5.00	25.00	G8:H8	G8:H2'	3.25	4.97
A5:H2	C19:H1'	3.18	4.86	G8:H8	G8:H4'	3.83	5.86

Atom 1	Atom 2	D _a [Å]	D _g [Å]	Atom 1	Atom 2	D _a [Å]	D _g [Å]
G8:H8	G8:H5#	2.76	4.22	G12:H8	G12:H1'	2.84	4.35
G8:H8	G8:H5#	2.94	4.50	G12:H8	G12:H2'	2.63	4.02
A9:H1'	A9:H2'	2.28	3.49	G12:H8	G12:H3'	2.28	3.49
A9:H1'	A9:H3'	3.71	5.67	G12:H8	G12:H4'	2.93	4.49
A9:H1'	A9:H4'	2.71	4.15	G12:H8	G12:H5#	2.61	3.99
A9:H1'	A9:H5#	4.74	7.26	G12:H8	G12:H5#	2.78	4.25
A9:H2	A9:H1'	4.03	6.16	C13:H1'	C13:H4'	2.44	3.73
A9:H2	G10:H1'	2.73	4.18	C13:H1'	C13:H5#	3.01	4.60
A9:H2'	G10:H1'	3.00	4.59	C13:H1'	C13:H5#	3.69	5.64
A9:H2	G10:H2'	3.48	5.33	C13:H1'	G14:H1'	4.20	6.50
A9:H2	G10:H8	3.76	5.75	C13:H5	C13:H3'	3.10	4.75
A9:H2	C17:H1'	2.63	4.02	C13:H5	C13:H5#	3.45	5.28
A9:H2	C17:H2'	3.61	5.52	C13:H6	C13:H1'	2.65	4.06
A9:H2	C17:H6	3.00	5.00	C13:H6	C13:H2'	2.28	3.49
A9:H8	A9:H1'	3.02	4.61	C13:H6	C13:H3'	2.41	3.68
A9:H8	A9:H5#	2.79	4.27	C13:H6	C13:H4'	2.97	4.54
G10:H1'	C11:H5	3.73	5.71	C13:H6	C13:H5	1.95	2.98
G10:H3'	C11:H5	2.93	4.48	C13:H6	C13:H5#	2.45	3.75
G10:H8	A9:H1'	3.30	5.05	C13:H6	C13:H5#	2.79	4.27
G10:H8	A9:H2	4.20	7.00	G14:H1'	G14:H2'	2.24	3.42
G10:H8	A9:H8	3.65	5.58	G14:H1'	G14:H3'	2.88	4.40
G10:H8	G10:H1'	2.96	4.52	G14:H1'	G14:H4'	2.44	3.73
G10:H8	G10:H5#	2.78	4.26	G14:H1'	G14:H5#	3.25	4.98
G10:H8	G10:H5#	2.93	4.49	G14:H1'	C15:H1'	4.20	6.50
G10:H8	C11:H5	3.59	5.49	G14:H2'	G14:H8	2.39	3.66
G10:H8	C11:H6	3.45	5.28	G14:H3'	G14:H8	2.46	3.76
C11:H1'	G10:H1'	4.20	6.50	G14:H3'	C15:H5	3.05	4.66
C11:H1'	C11:H2'	2.10	3.21	G14:H3'	C15:H6	2.61	3.99
C11:H1'	C11:H4'	2.56	3.92	G14:H8	C13:H1'	2.82	4.31
C11:H1'	C11:H5#	3.01	4.61	G14:H8	G14:H1'	2.91	4.45
C11:H1'	C11:H5#	3.23	4.93	G14:H8	G14:H5#	2.72	4.17
C11:H1'	G12:H1'	3.29	5.03	C15:H1'	G14:H2'	3.01	4.60
C11:H5	G10:H1'	4.20	6.50	C15:H1'	C15:H2'	2.11	3.22
C11:H5	G10:H2'	2.55	3.90	C15:H1'	C15:H5#	3.00	5.00
C11:H5	C11:H1'	3.49	5.34	C15:H1'	U16:H5	3.00	5.00
C11:H5	C11:H2'	3.66	5.60	C15:H1'	U16:H5	4.20	6.50
C11:H5	C11:H3'	2.83	4.33	C15:H5	G14:H1'	3.65	5.58
C11:H5	C11:H5#	3.84	5.88	C15:H5	G14:H2'	2.65	4.05
C11:H6	G10:H1'	3.02	4.62	C15:H5	C15:H1'	3.55	5.43
C11:H6	C11:H1'	2.72	4.16	C15:H5	C15:H3'	2.92	4.47
C11:H6	C11:H2'	2.67	4.09	C15:H5#	C15:H6	2.75	4.20
C11:H6	C11:H3'	2.12	3.24	C15:H5	U16:H5	2.86	4.37
C11:H6	C11:H5	2.08	3.18	C15:H6	G14:H1'	2.86	4.37
C11:H6	C11:H5#	2.64	4.04	C15:H6	G14:H2'	2.02	3.08
C11:H6	C11:H5#	2.72	4.16	C15:H6	C15:H1'	2.72	4.16
C11:H6	G12:H8	2.90	4.44	C15:H6	C15:H2'	2.68	4.10
G12:H1'	C11:H2'	3.02	4.61	C15:H6	C15:H3'	2.15	3.29
G12:H1'	C11:H3'	3.74	5.72	C15:H6	C15:H5	2.19	3.35
G12:H1'	G12:H2'	2.15	3.28	U16:H1'	U16:H5#	3.25	4.97
G12:H1'	G12:H3'	2.59	3.97	U16:H1'	U16:H5	4.20	6.50
G12:H1'	G12:H4'	2.44	3.74	U16:H1'	C17:H6	2.85	4.36
G12:H1'	G12:H5#	3.18	4.86	U16:H2'	U16:H1'	2.01	3.07
G12:H1'	G12:H5#	3.58	5.48	U16:H2'	C17:H1'	2.84	4.35
G12:H8	C11:H1'	3.07	4.69	U16:H5	U16:H5#	3.33	5.09
G12:H8	C11:H2'	2.14	3.28	U16:H5	C17:H5	2.78	4.25
G12:H8	C11:H3'	2.52	3.85	U16:H6	C15:H2'	2.03	3.10
G12:H8	C11:H5	4.17	6.37	U16:H6	C15:H3'	2.27	3.48

Atom 1	Atom 2	D _a [Å]	D _g [Å]	Atom 1	Atom 2	D _a [Å]	D _g [Å]
U16:H6	C15:H5	3.61	5.52	U20:H1'	U20:H6	2.88	4.41
U16:H6	U16:H1'	3.03	4.63	U20:H1'	G21:H1'	3.63	5.56
U16:H6	U16:H3'	2.21	3.38	U20:H3'	U20:H5	3.04	4.65
U16:H6	U16:H5	2.04	3.11	U20:H5	C19:H2'	2.69	4.12
U16:H6	U16:H5'#	2.80	4.28	U20:H5	C19:H3'	2.54	3.89
U16:H6	C17:H5	3.23	4.93	U20:H5	C19:H5	3.03	4.64
C17:H1'	C17:H5'#	3.14	4.80	U20:H6	C19:H1'	3.03	4.64
C17:H2'	U18:H6	2.08	3.19	U20:H6	C19:H1'	3.03	4.64
C17:H5	U16:H2'	2.49	3.81	U20:H6	C19:H2'	2.03	3.11
C17:H5	C17:H3'	3.00	5.00	U20:H6	U20:H5	2.09	3.20
C17:H5	U18:H6	2.93	4.48	G21:H1'	U20:H2'	2.96	4.52
C17:H5	C19:H5	5.00	25.00	G21:H1'	G21:H2'	2.19	3.34
C17:H6	U16:H2'	1.99	3.04	G21:H1'	G21:H3'	2.53	3.87
C17:H6	U16:H5	3.03	4.64	G21:H1'	G21:H4'	2.60	3.97
C17:H6	C17:H1'	2.62	4.00	G21:H1'	G21:H5'#	3.01	4.60
C17:H6	C17:H3'	2.09	3.20	G21:H1'	G21:H5'#	3.49	5.33
C17:H6	C17:H5	2.12	3.24	G21:H8	U20:H1'	2.94	4.49
C17:H6	C17:H5'#	2.65	4.06	G21:H8	U20:H2'	2.08	3.19
U18:H1'	A6:H2	3.33	5.09	G21:H8	U20:H4'	3.77	5.77
U18:H1'	U18:H2'	2.18	3.34	G21:H8	U20:H5	4.17	6.38
U18:H1'	U18:H3'	2.37	3.62	G21:H8	G21:H1'	3.04	4.65
U18:H1'	C19:H5	2.93	4.79	G21:H8	G21:H2'	2.96	4.53
U18:H1'	C19:H5	2.93	4.79	G21:H8	G21:H4'	2.89	4.43
U18:H3'	C19:H5	2.88	4.40	G21:H8	G21:H5'#	2.72	4.15
U18:H5	C19:H5	2.59	3.97	G21:H8	G21:H5'#	2.73	4.17
U18:H6	C17:H3'	2.07	3.17	G21:H8	C22:H5	3.33	5.10
U18:H6	U18:H1'	2.78	4.25	C22:H1'	G21:H2'	2.89	4.42
U18:H6	U18:H3'	2.08	3.18	C22:H1'	C22:H2'	2.12	3.24
U18:H6	U18:H5	2.07	3.16	C22:H1'	C22:H3'	2.54	3.89
C19:H1'	U18:H1'	3.65	5.59	C22:H1'	C22:H4'	2.43	3.72
C19:H1'	U18:H2'	3.12	4.78	C22:H1'	C22:H5'#	3.22	4.93
C19:H1'	C19:H2'	2.26	3.46	C22:H5	G21:H1'	3.60	5.51
C19:H1'	C19:H3'	2.73	4.17	C22:H5	G21:H2'	2.67	4.09
C19:H1'	C19:H4'	2.76	4.22	C22:H5	G21:H3'	2.78	4.26
C19:H1'	C19:H5'#	3.48	5.32	C22:H5	C22:H1'	3.50	5.35
C19:H1'	C19:H5	4.00	6.12	C22:H5	C22:H2'	3.17	4.85
C19:H1'	U20:H5	4.20	6.50	C22:H5	C22:H3'	2.76	4.22
C19:H2'	C19:H5	3.81	5.83	C22:H5	C22:H5'#	3.35	5.12
C19:H2'	U20:H1'	3.45	5.27	C22:H6	G21:H1'	2.95	4.51
C19:H5	U18:H2'	2.72	4.16	C22:H6	G21:H1'	2.95	4.51
C19:H5	C19:H3'	2.50	5.00	C22:H6	G21:H2'	2.03	3.10
C19:H5	C19:H4'	4.00	6.50	C22:H6	G21:H3'	2.42	3.71
C19:H5	C19:H5'#	3.72	5.69	C22:H6	C22:H1'	2.68	4.09
C19:H6	U18:H1'	3.13	4.79	C22:H6	C22:H2'	2.57	3.93
C19:H6	U18:H2'	2.04	3.12	C22:H6	C22:H3'	2.08	3.18
C19:H6	C19:H1'	2.91	4.45	C22:H6	C22:H4'	2.63	4.02
C19:H6	C19:H2'	2.77	4.24	C22:H6	C22:H5	2.00	3.05
C19:H6	C19:H4'	2.82	4.31	C22:H6	C22:H5'#	2.70	4.13
C19:H6	C19:H5	2.09	3.20	C22:H6	C22:H5'#	2.81	4.30
C19:H6	C19:H5'#	2.92	4.47				
U20:H1'	U20:H2'	2.23	3.41	G4:H1	U20:H3	1.80	6.00
U20:H1'	U20:H3'	2.64	4.03	G8:H1	U16:H3	1.80	6.00
U20:H1'	U20:H4'	2.72	4.15	G10:H1	G14:H1	1.80	6.00
U20:H1'	U20:H5'#	3.44	5.26	G10:H1	U16:H3	1.80	6.00
U20:H1'	U20:H5'#	3.96	6.06	U20:H3	G21:H1	1.80	6.00

Tabela A4. Minimalne (D_d) oraz maksymalne (D_g) odległości międzyprotonowe otrzymane metodą ISPA z pomiaru objętości sygnałów korelacyjnych widm 2D NOESY dupletu V.

Atom 1	Atom 2	D_d [Å]	D_g [Å]	Atom 1	Atom 2	D_d [Å]	D_g [Å]
G1:H1'	G1:H2'	2.23	3.41	C3:H6	C3:H5''	3.91	5.98
G1:H1'	G1:H3'	3.04	4.66	C3:H6	G4:H8	3.87	6.18
G1:H1'	G1:H4'	2.90	4.44	G4:H1	G6:H1	2.00	6.00
G1:H1'	G1:H5'	3.78	5.77	G4:H1'	C3:H2'	4.02	6.41
G1:H1'	G1:H5''	1.80	6.50	G4:H1'	G4:H2'	2.13	3.51
G1:H3'	U2:H5	2.75	4.21	G4:H1'	G4:H3'	2.84	4.60
G1:H4'	G1:H5''	1.98	3.02	G4:H1'	G4:H5'	1.80	6.50
G1:H5'	G1:H3'	2.74	4.19	G4:H1'	G4:H5''	1.80	6.50
G1:H5'	G1:H4'	2.11	3.22	G4:H2'	G4:H3'	1.77	2.96
G1:H5''	G1:H2'	4.21	6.43	G4:H2'	G4:H8	2.40	4.50
G1:H5''	G1:H3'	2.45	3.75	G4:H2'	G6:H8	4.00	6.00
G1:H5''	G1:H8	3.49	5.33	G4:H3'	G4:H8	2.65	4.31
G1:H8	G1:H5'	3.81	5.83	G4:H8	C3:H3'	3.04	4.91
U2:H1'	U2:H3'	3.29	5.03	G4:H8	G4:H1'	3.17	5.10
U2:H1'	U2:H4'	2.87	4.39	G4:H8	G4:H5'	2.73	4.42
U2:H1'	U2:H5	1.80	6.50	G4:H8	G4:H5''	3.76	6.00
U2:H1'	U2:H5''	3.89	5.95	A5:H1'	G4:H2'	4.50	44.50
U2:H1'	U2:H6	2.88	4.41	A5:H1'	G4:H3'	5.00	45.00
U2:H2'	U2:H1'	2.21	3.37	A5:H1'	G4:H4'	4.50	44.50
U2:H2'	U2:H6	2.72	4.16	A5:H1'	G4:H5'	5.00	45.00
U2:H3'	C3:H6	2.45	3.75	A5:H1'	G4:H5''	5.00	45.00
U2:H4'	U2:H6	2.76	4.22	A5:H1'	A5:H2'	2.27	3.73
U2:H5	G1:H1'	4.52	6.91	A5:H1'	A5:H4'	2.47	4.53
U2:H5	G1:H2'	2.84	4.34	A5:H1'	A5:H5'	4.00	6.00
U2:H5	U2:H3'	5.05	7.72	A5:H1'	A5:H5''	4.00	6.00
U2:H5	C3:H5	3.06	4.68	A5:H2	A5:H1'	3.72	6.30
U2:H6	G1:H1'	2.94	4.50	A5:H2	G6:H1'	4.15	6.00
U2:H6	G1:H2'	1.97	3.01	A5:H2	C14:H1'	4.50	6.50
U2:H6	G1:H3'	2.58	3.95	A5:H2	G15:H1'	5.00	45.00
U2:H6	U2:H3'	2.36	3.61	A5:H2'	A5:H8	2.39	4.41
U2:H6	U2:H5	2.06	3.15	A5:H2'	G6:H8	2.82	5.57
U2:H6	U2:H5'	2.46	3.76	A5:H3'	A5:H1'	2.87	5.14
U2:H6	C3:H6	2.71	4.14	A5:H3'	G6:H8	2.66	4.82
C3:H1'	U2:H2'	3.16	4.83	A5:H5'	A5:H5''	1.36	2.83
C3:H1'	C3:H2'	2.23	3.41	A5:H8	G4:H1'	4.50	6.50
C3:H1'	C3:H3'	3.09	4.73	A5:H8	A5:H1'	3.01	5.36
C3:H1'	C3:H4'	2.91	4.46	A5:H8	A5:H3'	2.50	4.50
C3:H1'	C3:H5	1.80	6.50	A5:H8	A5:H4'	3.00	5.50
C3:H1'	G4:H8	4.13	6.56	A5:H8	A5:H5'	3.26	4.80
C3:H2'	G4:H8	2.23	3.66	A5:H8	A5:H5''	3.50	6.00
C3:H5	U2:H2'	3.36	5.13	A5:H8	G6:H4'	4.50	44.50
C3:H5	U2:H6	3.54	5.42	A5:H8	G15:H1'	5.00	45.00
C3:H5	C3:H3'	3.44	5.26	G6:H1'	G6:H2'	2.20	3.62
C3:H5	C3:H6	2.07	3.17	G6:H1'	G6:H3'	2.93	4.74
C3:H6	U2:H1'	3.18	4.86	G6:H1'	G6:H5'	4.00	6.00
C3:H6	U2:H2'	2.02	3.09	G6:H1'	G6:H5''	4.00	6.00
C3:H6	U2:H5	4.48	6.84	G6:H2'	G6:H4'	3.40	5.45
C3:H6	C3:H1'	2.54	3.89	G6:H2'	C7:H5'#	2.86	4.62
C3:H6	C3:H2'	2.71	4.15	G6:H3'	G6:H2'	1.95	3.23
C3:H6	C3:H3'	2.07	3.16	G6:H3'	C7:H6	2.75	4.46
C3:H6	C3:H5'	2.80	4.28	G6:H5'	G6:H8	2.65	4.31

Atom 1	Atom 2	D _a [Å]	D _g [Å]	Atom 1	Atom 2	D _a [Å]	D _g [Å]
G6:H8	G4:H1'	3.50	5.00	G9:H8	G9:H3'	2.59	3.96
G6:H8	A5:H1'	4.50	6.50	C10:H1'	C10:H2'	2.15	3.29
G6:H8	A5:H8	3.80	6.37	C10:H1'	C10:H4'	2.64	4.04
G6:H8	G6:H1'	3.20	5.15	C10:H2'	A11:H8	2.07	3.17
G6:H8	G6:H2'	2.77	4.49	C10:H3'	C10:H1'	3.35	5.12
G6:H8	G6:H3'	2.71	4.40	C10:H3'	C10:H6	2.23	3.41
G6:H8	G6:H4'	3.68	5.88	C10:H4'	C10:H5"	1.99	3.04
G6:H8	G6:H5"	3.07	4.95	C10:H5	C10:H1'	4.97	7.60
C7:H1'	G6:H2'	2.65	4.30	C10:H5	A11:H8	1.80	6.50
C7:H1'	C7:H2'	2.72	4.16	C10:H5'	C10:H1'	3.37	5.16
C7:H1'	C7:H5'	3.02	4.61	C10:H5'	C10:H3'	2.54	3.89
C7:H1'	C7:H5"	4.52	6.91	C10:H5'	C10:H4'	2.00	3.06
C7:H2'	U8:H5	3.26	4.99	C10:H5"	C10:H1'	3.90	5.97
C7:H2'	U8:H6	2.03	3.10	C10:H5"	C10:H3'	2.55	3.91
C7:H3'	C7:H6	2.55	3.90	C10:H6	C10:H1'	2.80	4.28
C7:H4'	G6:H2'	3.59	5.74	C10:H6	C10:H2'	2.75	4.20
C7:H5	G6:H2'	3.01	4.86	C10:H6	C10:H4'	3.23	4.94
C7:H5	C7:H3'	3.46	5.30	C10:H6	C10:H5	2.02	3.08
C7:H5	U8:H5	2.86	4.37	C10:H6	C10:H5'	2.79	4.26
C7:H5'	C7:H6	2.98	4.55	C10:H6	C10:H5"	2.50	3.82
C7:H5"	C7:H6	2.65	4.05	C10:H6	A11:H8	3.63	5.56
C7:H6	G6:H1'	2.90	4.68	A11:H1'	C10:H1'	4.63	7.08
C7:H6	G6:H2'	1.95	3.24	A11:H1'	C10:H2'	3.94	6.02
C7:H6	C7:H1'	2.70	4.12	A11:H1'	A11:H2'	2.17	3.32
C7:H6	C7:H5	2.07	3.17	A11:H1'	A11:H3'	2.89	4.42
C7:H6	U8:H5	3.44	5.27	A11:H1'	A11:H4'	2.84	4.34
U8:H1'	C7:H2'	3.01	4.60	A11:H1'	A11:H5'	1.80	6.50
U8:H1'	U8:H2'	2.28	3.48	A11:H1'	G12:H1'	3.81	5.82
U8:H1'	U8:H5'	2.94	4.50	A11:H2	A11:H1'	4.58	7.01
U8:H1'	U8:H5"	1.80	6.50	A11:H2	A11:H2'	4.12	6.31
U8:H1'	U8:H6	2.94	4.49	A11:H2	G12:H1'	2.89	4.42
U8:H1'	G9:H8	1.80	6.50	A11:H2'	A11:H3'	2.05	3.14
U8:H2'	G9:H1'	1.80	6.50	A11:H2'	A11:H8	2.77	4.24
U8:H3'	U8:H1'	2.88	4.40	A11:H3'	A11:H8	2.31	3.53
U8:H3'	G9:H1'	1.80	6.50	A11:H4'	A11:H8	3.22	4.93
U8:H5	C7:H3'	2.86	4.38	A11:H8	C10:H1'	3.18	4.86
U8:H5	G9:H8	3.89	5.95	A11:H8	C10:H3'	3.10	4.75
U8:H6	C7:H1'	3.25	4.98	A11:H8	A11:H1'	3.09	4.73
U8:H6	C7:H3'	2.62	4.01	A11:H8	A11:H5'	2.73	4.17
U8:H6	U8:H2'	3.25	4.97	A11:H8	A11:H5"	2.93	4.48
U8:H6	U8:H3'	2.42	3.71	G12:H1'	A11:H2'	2.66	4.07
U8:H6	U8:H5	2.08	3.18	G12:H1'	G12:H2'	2.80	4.28
U8:H6	U8:H5'	2.50	3.82	G12:H1'	G12:H3'	2.97	4.54
U8:H6	U8:H5"	3.23	4.94	G12:H1'	G12:H5'	3.14	4.81
G9:H1'	G9:H5'	1.80	6.50	G12:H8	A11:H1'	3.30	5.05
G9:H2'	G9:H1'	2.63	4.02	G12:H8	A11:H2'	2.25	3.44
G9:H3'	G9:H1'	3.01	4.60	G12:H8	A11:H3'	2.85	4.36
G9:H4'	G9:H1'	2.70	4.13	G12:H8	A11:H8	4.03	6.17
G9:H4'	G9:H8	4.30	6.58	G12:H8	G12:H1'	3.07	4.69
G9:H5'	G9:H8	1.80	6.50	G12:H8	G12:H2'	2.86	4.37
G9:H8	U8:H2'	2.37	3.62	G12:H8	G12:H3'	3.00	4.59
G9:H8	U8:H3'	3.31	5.06	G12:H8	G12:H5"	3.48	5.31
G9:H8	G9:H1'	3.34	5.10	C13:H2'	C13:H1'	2.23	3.41
G9:H8	G9:H2'	2.85	4.36	C13:H2'	C13:H6	2.72	4.15

Atom 1	Atom 2	D _a [Å]	D _g [Å]	Atom 1	Atom 2	D _a [Å]	D _g [Å]
C13:H3'	C13:H1'	3.05	4.66	G15:H8	C14:H6	3.36	5.13
C13:H3'	C13:H6	2.28	3.49	G15:H8	G15:H1'	3.32	5.08
C13:H3'	C14:H5	2.88	4.41	G15:H8	G15:H4'	4.05	6.19
C13:H4'	C13:H1'	3.17	4.85	G15:H8	G15:H5''	3.08	4.70
C13:H4'	C13:H6	2.97	4.54	A16:H1'	A16:H2'	2.09	3.19
C13:H5	G12:H2'	3.28	5.01	A16:H1'	A16:H3'	2.75	4.21
C13:H5	C14:H5	2.77	4.24	A16:H1'	A16:H5'	3.63	5.55
C13:H5	C14:H6	1.80	6.50	A16:H1'	C17:H5	4.68	7.16
C13:H5	C14:H6	4.58	7.00	A16:H2	A16:H1'	4.19	6.40
C13:H6	G12:H1'	3.36	5.14	A16:H2	C17:H1'	3.33	5.09
C13:H6	G12:H2'	2.09	3.19	A16:H2'	C17:H5	2.92	4.47
C13:H6	C13:H1'	2.94	4.49	A16:H2'	C17:H5	2.92	4.47
C13:H6	C13:H5	2.12	3.25	A16:H3'	A16:H2'	1.99	3.04
C13:H6	C13:H5''	2.94	4.49	A16:H3'	A16:H8	2.90	4.44
C13:H6	C14:H6	3.58	5.48	A16:H4'	A16:H1'	3.02	4.62
C14:H1'	C14:H3'	3.29	5.03	A16:H5'	A16:H8	2.38	3.65
C14:H1'	C14:H6	2.95	4.51	A16:H8	G15:H1'	3.35	5.13
C14:H1'	G15:H8	3.88	5.93	A16:H8	G15:H3'	2.56	3.92
C14:H2'	C14:H1'	2.19	3.35	A16:H8	G15:H8	3.70	5.66
C14:H2'	C14:H6	2.79	4.26	A16:H8	A16:H1'	3.05	4.67
C14:H2'	G15:H1'	3.25	4.97	A16:H8	A16:H2'	2.88	4.41
C14:H3'	G15:H8	2.71	4.14	A16:H8	A16:H5''	2.84	4.34
C14:H4'	C14:H1'	2.89	4.43	A16:H8	C17:H5	3.47	5.31
C14:H4'	C14:H6	3.09	4.72	A16:H8	C17:H6	3.47	5.30
C14:H5	C13:H2'	3.13	4.79	C17:H1'	C17:H3'	3.07	4.69
C14:H5	C13:H6	3.26	4.98	C17:H1'	C17:H6	3.38	5.16
C14:H5	C14:H3'	3.49	5.34	C17:H5	A16:H3'	3.02	4.62
C14:H5	G15:H8	1.80	6.50	C17:H5	C17:H2'	3.46	5.29
C14:H6	C13:H1'	3.49	5.33	C17:H5	C17:H3'	3.47	5.31
C14:H6	C13:H2'	2.09	3.20	C17:H6	A16:H1'	3.22	4.93
C14:H6	C13:H3'	2.51	3.84	C17:H6	A16:H2'	1.95	2.98
C14:H6	C14:H3'	2.40	3.67	C17:H6	A16:H3'	2.40	3.67
C14:H6	C14:H5	2.12	3.24	C17:H6	C17:H3'	2.35	3.59
C14:H6	C14:H5'	3.59	5.49	C17:H6	C17:H5	1.97	3.01
C14:H6	C14:H5''	3.31	5.07	U2:H3	G15:H1	1.80	6.00
G15:H1'	G15:H2'	2.24	3.43	G4:H1	G6:H1	1.80	6.00
G15:H1'	G15:H3'	2.96	4.53	G6:H1	G12:H1	1.80	6.00
G15:H1'	G15:H4'	2.96	4.52	C7:H42	U8:H3	1.80	6.00
G15:H1'	G15:H5''	4.57	6.99	C7:H42	13:H42	1.80	6.00
G15:H1'	A16:H1'	4.22	6.45	U8:H3	G12:H1	1.80	6.00
G15:H2'	G15:H8	3.35	5.13	A11:H2	G12:H1	1.80	6.00
G15:H2'	A16:H8	2.07	3.16	C13:H42	C14:H42	1.80	6.00
G15:H5'	G15:H1'	3.12	4.78	C13:H5	C14:H42	1.80	6.00
G15:H8	C14:H2'	2.25	3.44	G15:H1	A16:H2	1.80	6.00

Tabela A5. Minimalne (D_d) oraz maksymalne (D_g) odległości międzyprotonowe otrzymane metodą ISPA z pomiaru objętości sygnałów korelacyjnych widm 2D NOESY dupletu VI.

Atom 1	Atom 2	D_d [Å]	D_g [Å]	Atom 1	Atom 2	D_d [Å]	D_g [Å]
G1:H1'	G1:H8	3.04	4.66	C3:H6	U2:H5	3.59	5.49
G1:H1'	U2:H6	2.50	4.50	C3:H6	C3:H1'	3.18	4.86
G1:H2'	G1:H1'	2.62	4.00	C3:H6	C3:H4'	3.14	4.80
G1:H2'	U2:H5	2.73	4.17	G4:H1'	G4:H8	3.08	4.71
G1:H2'	U2:H5#	2.80	4.27	G4:H1'	U5:H6	4.00	6.50
G1:H2'	U2:H6	1.80	3.50	G4:H1'	G6:H8	2.84	4.80
G1:H3'	G1:H1'	2.69	4.11	G4:H2'	G4:H1'	2.33	3.57
G1:H3'	G1:H2'	2.26	3.45	G4:H2'	G4:H3'	1.95	2.98
G1:H3'	G1:H8	2.82	4.31	G4:H2'	G4:H8	2.11	3.22
G1:H3'	U2:H5	2.72	4.15	G4:H2'	U5:H6	2.23	4.17
G1:H3'	U2:H6	2.13	3.25	G4:H2'	G6:H8	2.50	4.00
G1:H4'	G1:H1'	2.56	3.91	G4:H3'	G4:H1'	2.94	4.50
G1:H5''	G1:H5'	1.45	2.22	G4:H3'	G4:H8	2.72	4.56
G1:H5#	G1:H4'	1.82	2.78	G4:H3'	G4:H8	2.72	4.56
G1:H5#	G1:H8	2.87	4.39	G4:H3'	U5:H6	3.02	5.37
G1:H8	G1:H2'	2.97	4.53	G4:H4'	G4:H1'	2.52	3.86
G1:H8	G1:H5#	3.15	4.82	G4:H4'	G4:H3'	1.95	2.99
U2:H1'	U2:H4'	2.49	3.81	G4:H5#	G4:H1'	3.22	4.92
U2:H2'	U2:H1'	2.23	3.41	G4:H5#	G4:H3'	2.24	3.43
U2:H2'	U2:H6	2.67	4.09	G4:H5#	G4:H8	2.79	4.27
U2:H2'	C3:H1'	2.97	4.55	U5:H1'	G4:H2'	4.50	44.50
U2:H2'	C3:H5	2.75	4.20	U5:H1'	G4:H3'	4.50	44.50
U2:H2'	C3:H6	2.01	3.07	U5:H1'	G4:H8	4.50	44.50
U2:H3'	U2:H1'	2.58	3.94	U5:H1'	U5:H4'	2.60	4.74
U2:H3'	U2:H5	2.83	4.33	U5:H1'	G6:H8	4.50	44.50
U2:H3'	U2:H6	2.33	3.56	U5:H2'	U5:H3'	2.04	3.88
U2:H3'	C3:H5	3.00	4.58	U5:H2'	G6:H1'	4.50	44.50
U2:H3'	C3:H6	2.30	3.52	U5:H2'	G6:H8	4.00	44.00
U2:H4'	U2:H5#	1.54	2.35	U5:H3'	G4:H2'	4.50	44.50
U2:H4'	U2:H6	2.72	4.16	U5:H3'	U5:H1'	2.83	5.08
U2:H5	U2:H6	2.14	3.27	U5:H3'	U5:H6	1.94	3.72
U2:H5	C3:H5	2.48	3.79	U5:H3'	G6:H1'	4.50	44.50
U2:H5'	U2:H5''	1.44	2.21	U5:H4'	U5:H3'	2.00	3.05
U2:H5#	U2:H1'	3.16	4.84	U5:H4'	G6:H8	4.50	44.50
U2:H5#	U2:H6	2.74	4.18	U5:H5	G4:H2'	4.50	44.50
C3:H1'	C3:H3'	2.59	3.95	U5:H5	G4:H3'	4.50	44.50
C3:H1'	C3:H4'	2.32	3.55	U5:H5	G4:H4'	4.50	44.50
C3:H1'	G4:H8	3.12	4.77	U5:H5	G4:H8	4.50	44.50
C3:H1'	A16:H2	2.50	3.83	U5:H5	U5:H6	2.13	3.26
C3:H2'	C3:H1'	2.21	3.38	U5:H5	G6:H8	4.50	44.50
C3:H2'	C3:H6	2.69	4.12	U5:H5#	G4:H3'	4.20	44.20
C3:H2'	G4:H1'	2.98	4.56	U5:H5#	G4:H3'	4.50	44.50
C3:H2'	G4:H8	2.17	3.31	U5:H5#	U5:H3'	2.09	3.49
C3:H3'	C3:H6	1.97	3.01	U5:H5#	U5:H3'	3.00	4.50
C3:H3'	G4:H8	2.28	3.49	U5:H5#	U5:H6	2.28	4.25
C3:H5	U2:H6	3.16	4.83	U5:H5#*	G6:H8	4.20	44.20
C3:H5	C3:H6	2.08	3.19	U5:H6	G4:H4'	4.20	44.20
C3:H5	G4:H8	3.18	4.86	G6:H1'	G6:H8	2.84	4.35
C3:H5#	C3:H1'	3.16	4.83	G6:H2'	G6:H1'	2.36	3.61
C3:H5#	C3:H6	2.48	3.79	G6:H2'	C7:H1'	3.39	5.18
C3:H6	U2:H1'	2.75	4.20	G6:H2'	C7:H5	2.81	4.29

Atom 1	Atom 2	D _a [Å]	D _g [Å]	Atom 1	Atom 2	D _a [Å]	D _g [Å]
G6:H2'	C7:H6	2.24	3.42	C10:H4'	C10:H5#	1.81	2.77
G6:H3'	G6:H1'	2.63	4.02	C10:H4'	C10:H6	3.05	4.66
G6:H3'	G6:H2'	2.02	3.09	C10:H5	C10:H6	2.04	3.12
G6:H3'	G6:H8	2.00	3.50	C10:H5"	C10:H5'	1.46	2.24
G6:H4'	G6:H1'	2.44	3.73	C10:H5#	C10:H4'	1.83	2.79
G6:H4'	G6:H8	2.50	4.50	C10:H5#	C10:H6	2.35	3.60
G6:H5*'	G6:H1'	3.00	5.50	C10:H5#	C10:H6	2.62	4.00
G6:H5*'	G6:H8	2.50	5.50	A11:H1'	A11:H5#	3.57	5.46
G6:H5#	G6:H2'	3.17	5.04	A11:H1'	A11:H8	2.98	4.55
G6:H8	U5:H3'	3.50	6.50	A11:H1'	G12:H8	3.31	5.06
G6:H8	G6:H2'	2.46	4.05	A11:H2	A11:H1'	3.93	6.01
C7:H1'	C7:H6	2.80	4.27	A11:H2'	A11:H1'	2.67	4.08
C7:H2'	U8:H5	2.85	4.36	A11:H2'	A11:H3'	2.11	3.23
C7:H3'	C7:H6	2.00	3.50	A11:H2'	A11:H8	3.07	4.69
C7:H3'	U8:H5	2.63	4.03	A11:H2'	G12:H8	2.54	3.88
C7:H5	C7:H6	2.10	3.21	A11:H3'	A11:H1'	2.88	4.40
C7:H5	U8:H5	2.95	4.51	A11:H3'	A11:H8	2.32	3.55
C7:H5#	C7:H6	2.45	3.75	A11:H3'	G12:H8	2.72	4.15
U8:H1'	U8:H2'	2.45	3.74	A11:H4'	A11:H1'	2.90	4.43
U8:H1'	U8:H3'	2.56	3.92	A11:H4'	A11:H3'	2.39	3.65
U8:H1'	U8:H4'	2.21	3.37	A11:H4'	A11:H5#	1.85	2.83
U8:H1'	G9:H8	3.13	4.79	A11:H5'	A11:H5"	1.60	2.44
U8:H2'	G9:H1'	2.84	4.34	A11:H5#	A11:H1'	3.61	5.52
U8:H2'	G9:H8	2.12	3.24	A11:H5#	A11:H3'	2.35	3.60
U8:H3'	U8:H5	3.18	4.87	A11:H5#	A11:H3'	2.40	3.67
U8:H5	C7:H6	2.82	4.31	A11:H5#	A11:H8	2.69	4.11
U8:H5	U8:H6	2.05	3.14	A11:H8	C10:H6	2.69	4.11
U8:H5#	U8:H1'	3.06	4.68	A11:H8	G12:H8	3.67	5.62
U8:H5#	U8:H6	3.08	4.72	G12:H1'	A11:H2	2.95	4.51
U8:H6	U8:H2'	2.41	3.88	G12:H1'	C13:H6	3.15	4.82
U8:H6	U8:H3'	1.98	3.03	G12:H2'	G12:H1'	2.20	3.37
G9:H1'	G9:H8	3.00	4.59	G12:H2'	G12:H8	2.65	4.05
G9:H1'	A11:H2	3.21	4.91	G12:H2'	C13:H1'	2.89	4.42
G9:H2'	G9:H1'	2.30	3.52	G12:H2'	C13:H5	3.08	4.71
G9:H3'	G9:H1'	2.60	3.98	G12:H2'	C13:H6	2.09	3.19
G9:H3'	G9:H8	2.21	3.38	G12:H3'	G12:H1'	2.47	3.77
G9:H4'	G9:H1'	2.46	3.77	G12:H3'	C13:H6	2.36	3.61
G9:H4'	G9:H8	2.87	4.38	G12:H4'	G12:H1'	2.68	4.10
G9:H5#	G9:H4'	1.52	2.33	G12:H5#	G12:H8	2.56	3.92
G9:H5#	G9:H4'	1.57	2.40	G12:H8	G12:H1'	2.63	4.02
G9:H5#	G9:H8	2.41	3.69	C13:H1'	C13:H6	2.92	4.46
G9:H8	U8:H3'	2.28	3.49	C13:H1'	C14:H6	3.08	4.70
C10:H1'	C10:H5#	3.22	4.92	C13:H2'	C13:H1'	2.33	3.56
C10:H1'	C10:H6	2.84	4.35	C13:H2'	C13:H6	3.08	4.72
C10:H1'	A11:H1'	3.35	5.12	C13:H2'	C14:H1'	3.02	4.62
C10:H1'	A11:H8	3.05	4.67	C13:H2'	C14:H6	1.99	3.05
C10:H2'	C10:H1'	2.25	3.43	C13:H3'	C13:H1'	2.73	4.17
C10:H2'	C10:H6	2.49	3.81	C13:H3'	C13:H5	2.96	4.53
C10:H2'	A11:H1'	2.73	4.17	C13:H3'	C13:H6	2.27	3.47
C10:H2'	A11:H8	2.05	3.13	C13:H3'	C14:H5	2.79	4.27
C10:H3'	C10:H1'	2.71	4.14	C13:H3'	C14:H6	2.23	3.42
C10:H3'	C10:H6	2.11	3.23	C13:H4'	C13:H1'	2.50	3.83
C10:H3'	A11:H8	2.26	3.45	C13:H4'	C13:H5#	1.67	2.55
C10:H4'	C10:H1'	2.53	3.86	C13:H5	C13:H6	2.13	3.26

Atom 1	Atom 2	D _a [Å]	D _g [Å]	Atom 1	Atom 2	D _a [Å]	D _g [Å]
C13:H5	C14:H5	2.59	3.96	A16:H3'	A16:H1'	2.61	3.99
C13:H5'	C13:H5''	1.30	1.99	A16:H3'	C17:H5	2.69	4.11
C13:H5'#	C13:H6	2.66	4.07	A16:H4'	C17:H6	2.43	3.72
C13:H5'#	C13:H6	2.77	4.23	A16:H5'#	A16:H1'	2.55	3.91
C14:H1'	C14:H6	2.75	4.21	A16:H8	A16:H8	2.45	3.75
C14:H1'	G15:H8	3.17	4.85	A16:H3'	G15:H2'	1.94	2.97
C14:H2'	C14:H1'	2.25	3.44	A16:H8	G15:H8	3.31	5.06
C14:H2'	C14:H6	2.03	3.61	A16:H8	A16:H2'	2.70	4.13
C14:H2'	G15:H8	1.99	3.04	C17:H1'	C17:H5'#	3.04	4.65
C14:H3'	C14:H1'	2.55	3.90	C17:H2'	C17:H1'	2.20	3.36
C14:H3'	C14:H6	2.01	3.07	C17:H2'	C17:H6	2.52	3.85
C14:H3'	G15:H8	2.35	3.59	C17:H3'	C17:H1'	2.75	4.20
C14:H4'	C14:H1'	2.59	3.97	C17:H3'	C17:H5	2.88	4.41
C14:H4'	C14:H5'#	2.00	3.50	C17:H3'	C17:H6	2.02	3.08
C14:H5	C13:H2'	2.42	3.71	C17:H4'	C17:H1'	2.54	3.88
C14:H5	C13:H6	3.31	5.06	C17:H4'	C17:H6	2.42	3.71
C14:H5	C14:H3'	2.93	4.49	C17:H5	A16:H8	2.97	4.54
C14:H5	C14:H6	2.06	3.15	C17:H5	C17:H5'#	3.64	5.56
C14:H5'#	C14:H1'	3.17	4.85	C17:H5	C17:H6	2.01	3.08
C14:H5'#	C14:H6	2.76	4.23	C17:H5'	C17:H5''	1.48	2.27
C14:H6	C13:H6	3.39	5.18	C17:H5'#	C17:H4'	1.63	2.50
C14:H6	C14:H4'	2.53	3.86	C17:H5'#	C17:H6	2.60	3.98
C14:H6	G15:H8	2.86	4.38	C17:H6	A16:H8	3.52	5.38
G15:H1'	G15:H4'	2.36	3.61				
G15:H1'	G15:H8	2.91	4.45	U2:H3	C17:H42	1.80	6.00
G15:H1'	A16:H8	2.90	4.43	U2:H3	C3:H1'	1.80	6.00
G15:H2'	G15:H1'	2.15	3.28	U2:H3	C3:H41	1.80	6.00
G15:H2'	G15:H8	2.76	4.22	U2:H3	C3:H5	1.80	6.00
G15:H2'	A16:H1'	3.11	4.76	C3:H22	G4:H1	1.80	6.00
G15:H3'	G15:H1'	2.54	3.88	G4:H1	G6:H1	1.80	6.00
G15:H3'	G15:H8	2.24	3.43	G6:H1	C7:H42	1.80	6.00
G15:H5'#	G15:H1'	3.23	4.95	G6:H1	C7:H5	1.80	6.00
G15:H5'#	G15:H8	2.54	3.89	G6:H1	G12:H1	1.80	6.00
G15:H5'#	G15:H8	2.59	3.97	G6:H1	C14:H1'	1.80	7.00
A16:H1'	A16:H2	3.14	4.81	G6:H1	C14:H6	1.80	7.00
A16:H1'	A16:H5'#	3.87	5.92	U8:H3	C7:H42	1.80	6.00
A16:H1'	A16:H8	2.92	4.46	U8:H3	C10:H42	1.80	6.00
A16:H1'	C17:H6	3.27	5.00	U8:H3	G12:H1	1.80	6.00
A16:H2	A16:H2'	3.01	4.61	G12:H1	A11:H2	1.80	6.00
A16:H2	C17:H1'	2.62	4.01	G12:H1	C13:H42	1.80	6.00
A16:H2'	A16:H1'	2.21	3.38	G15:H1	G4:H1'	1.80	6.00
A16:H2'	C17:H5	2.79	4.26	G15:H1	C14:H41	1.80	6.00
A16:H2'	C17:H6	1.94	2.96	G15:H1	A16:H2	1.80	6.00

Aneks 5. Pliki protokołu obliczeniowego

```
remarks File generate/generatedna.inp
remarks Generate structure file for a dodecamer

topology @TOPPAR:dna-rna-allatom.top end

parameter
  @TOPPAR:dna-rna-allatom.par

  hbonds
    acce=true don=5.5 doff=6.5
    dcut=7.5 aon=60.0 aoff=80.0
    acut=100.0
  end
  nbonds
    atom cdie shift eps=1.0 e14fac=0.4
    cutnb=7.5 ctonnb=6.0 ctofnb=6.5
    nbxmod=5 vswitch
  end
end

segment                                     { * Generate one strand. * }
  name="STRA"
  chain
    LINK NUC HEAD - * TAIL + * END
    FIRST 5TER TAIL + * END
    LAST 3TER HEAD - * END

    sequence @strand1.seq end
  end
end

{-----}
segment                                     { * Generate second strand. * }
  name="STRB"
  chain
    LINK NUC HEAD - * TAIL + * END
    FIRST 5TER TAIL + * END
    LAST 3TER HEAD - * END

    sequence @strand2.seq end
  end
end

{-----}
vector do ( resid = encode ( decode ( resid ) + 10 ) ) (segid "STRB")
write structure output=structure.psf end { * writes the structure file. * }
stop
```

```

remarks File nmr/generate_template.inp
remarks Generates a "template" coordinate set. This produces
remarks an arbitrary extended conformation with ideal geometry.

{====>}
set seed=@xplor.seed end                ! Use xplor -s

set echo=off message=off end

structure @structure.psf end            /* Read structure file. */

{====>} parameter                        /* Read parameter file. */
  @TOPPAR:dna-rna-allatom.par
end

evaluate ($accept = 1)
while ($accept > 0) loop main

vector ident (x) ( all )
vector do (x=x/10.) ( all )
vector do (y=random(0.5) ) ( all )
vector do (z=random(0.5) ) ( all )

vector do (fbeta=50) (all)               /* Friction coefficient, in 1/ps. */
vector do (mass=100) (all)              /* Heavy masses, in amus. */

parameter
  nbonds
  cutnb=5.5 rcon=20. nbxmod=-2 repel=0.9 wmin=0.1 tolerance=1.
  rexp=2 irexp=2 inhibit=0.25
end
end

flags exclude * include bond angle dihe vdw end

minimize powell nstep=200 nprint=10 end

flags include impr end

minimize powell nstep=400 nprint=10 end

dynamics verlet
  nstep=200 timestep=0.001 iasvel=maxwell firsttemp= 300.
  tcoupling = true tbath = 300. nprint=50 iprfrq=0
end

parameter
  nbonds
  rcon=2. nbxmod=-3 repel=0.75
end
end

minimize powell nstep=400 nprint=25 end

dynamics verlet
  nstep=600 timestep=0.005 iasvel=maxwell firsttemp= 300.
  tcoupling = true tbath = 300. nprint=100 iprfrq=0
end

flags exclude vdw elec end
vector do (mass=1.) ( name h* )
hbuild selection=( name h* ) phistep=360 end
flags include vdw elec end

minimize powell nstep=1000 nprint=50 end

/* DIHE Data Analysis */
  print threshold=5 dihedrals

```

```

    evaluate ($rms_dihe=$result)
    evaluate ($v_dihe=$violations)

{* BOND Data Analysis *}
print threshold=0.05 bonds
evaluate ($rms_bond=$result)
evaluate ($v_bond=$violations)

{* ANGLE Data Analysis *}
print threshold=5 angles
evaluate ($rms_angl=$result)
evaluate ($v_angl=$violations)

{* IMPROPER Data Analysis *}
print threshold=5 impropers
evaluate ($rms_impr=$result)
evaluate ($v_impr=$violations)

evaluate ( $accept = 0 )
if ($v_bond > 0) then evaluate ( $accept = $accept + 1 ) end if
if ($v_angl > 0) then evaluate ( $accept = $accept + 1 ) end if
if ($v_dihe > 0) then evaluate ( $accept = $accept + 1 ) end if
if ($v_impr > 0) then evaluate ( $accept = $accept + 1 ) end if
if ($ener >80) then evaluate ( $accept = $accept + 1 ) end if

if ($accept = 0 ) then
    set echo=off message=off end

    display Energy: bond $bond, angle $angl, dihedral $dihe,
    display          improper $impr, vdW $vdw, total $ener
    display RMSD:   bond $rms_bond, angle $rms_angl, dihedral $rms_dihe,
    display          improper $rms_impr
    display Violations: bond $v_bond, angle $v_angl, dihedral $v_dihe,
    display          improper $v_impr

{* Write coordinates. *}
    write coordinates output=generate_template.pdb end

end if
end loop main

stop

```



```

remarks File: tutorial/nmr_torsion/nmr_torsion.inp
remarks Protocol for torsion angle molecular dynamics structure
remarks calculations for proteins and nucleic acids

remarks The protocol has been tested with initial structures obtained by
remarks "generate_template.inp". However, any structure with proper
remarks geometry could serve as initial structure. It is imperative that
remarks the initial structure has proper geometry (ideal bond lengths,
remarks angles, and impropers) because the torsion-angle molecular
remarks dynamics routine derives the internal constraints(e.g., bond
remarks length, bond angle) from the initial coordinates.

```

```

{* =====> Paramter, structure, and template files *}
evaluate ($PARAMETERS = "TOPPAR:dna-rna-allatom.par" )
evaluate ($STRUCTURE = "structure.psf" )
evaluate ($TEMPLATE = "generate_template.pdb" )

{* =====> NOE distance restraints files *}
evaluate ($NOE_TABLE1 = "noes.tbl" )
evaluate ($NOE_TABLE2 = "hbnd.tbl" )
evaluate ($NOE_TABLE3 = "noeh2o.tbl" )

{* =====> dihedral angle restraints file *}
evaluate ($DIHE_TABLE = "dihs.tbl" )

{* =====> The base name of the generated coordinate files *}
evaluate ($PDBNAME = "sa_tad." )

{* =====> Parameters for high temperature torsion angle stage *}
{* =====> Suggested nucleic acid parameters are in curly brackets *}
evaluate ($tad_temp = 20000 )
evaluate ($tad_step = 8000 )
evaluate ($tad_vdw = 0.3 )
evaluate ($tad_noe = 75 )
evaluate ($tad_dih = 100 )

{* =====> Parameters for slow-cool torsion angle stage *}
evaluate ($cool_t = 20000 )
evaluate ($cool_steps = 10000 )
evaluate ($cool_noe = 100 )
evaluate ($cool_dih = 100 )

{* =====> Parameters for slow-cool Cartesian MD stage *}
evaluate ($vercool_temp = 3000 )
evaluate ($vercool_steps = 6000 )
evaluate ($vercool_vdw = 1.0 )
evaluate ($vercool_noe = 125 )
evaluate ($vercool_dih = 200 )

{* =====> Parameters for Final Minimization stage *}
evaluate ($pow_vdw = 1.0 )
evaluate ($pow_noe = 250 )
evaluate ($pow_dih = 250 )
evaluate ($pow_step = 1200 )

parameter
  @$PARAMETERS
end

structure
  @$STRUCTURE
end

coor @$TEMPLATE
coor copy end

```

```

set echo off message off end

noe
  nres = 3000
  class all
  @$NOE_TABLE1
  @$NOE_TABLE2
  @$NOE_TABLE3
end

set echo off message off end

restraints dihedral
  nass = 1000
  @$DIHE_TABLE
end

set echo on message on end

flags exclude * include bonds angle impr vdw noe cdih end

vector do (fbeta=10) (all)
vector do (mass=100) (all)

noe
  ceiling=1000
  averaging * cent
  potential * soft
  sqoffset * 0.0
  sqconstant * 1.0
  sqexponent * 2
  soexponent * 1
  asymptote * 1.0
  rswitch * 0.5
end

parameter
  nbonds
    repel=0.80
    rexp=2 irexp=2 rcon=1.
    nbxmod=3
    wmin=0.01
    cutnb=6.0 ctonnb=2.99 ctofnb=3.
    tolerance=0.5
  end
end

set seed=@xplor.seed end          ! Use xplor -s

coor swap end
coor copy end

{* =====> High Temperature Torsion Angle Dynamics *}

vector do ( vx = maxwell(1.5) ) ( all )
vector do ( vy = maxwell(1.5) ) ( all )
vector do ( vz = maxwell(1.5) ) ( all )

restraints dihedral
  scale = $tad_dih
end

dynamics torsion
  topology
    kdihmax = 300
    maxchn = 1000

    {* If refining nucleic acids, uncomment and appropriately *}
    {* modify the following lines. You must free the C3'-C4' bond *}

```

```

    {* on all furanose sugars otherwise you will encounter          *}
    {* 'impossible topology' errors.                                *}
    evaluate ( $nucl = 1 )
    while ( $nucl le 20 ) loop cut
        free bond ( resid $nucl and name C3' )
                ( resid $nucl and name C4' )
        evaluate ( $nucl = $nucl + 1 )
    end loop cut
end
end

evaluate ( $ncycle_tad = 100 )
evaluate ( $nstep_tad = int($tad_step/$ncycle_tad) )

evaluate ( $tadini_vdw = 5 )
evaluate ( $tadvdw_step = ($tadini_vdw-$tad_vdw)/$ncycle_tad )
evaluate ( $ktad_vdw = $tadini_vdw )
evaluate ( $tadini_noe = 2 )
evaluate ( $tadnoe_step = ($tad_noe-$tadini_noe)/$ncycle_tad )
evaluate ( $ktad_noe = $tadini_noe )

evaluate ( $i_tad = 0 )
while ( $i_tad < $ncycle_tad ) loop tad
    evaluate ( $i_tad = $i_tad + 1 )

    noe
        scale * $ktad_noe
    end

    constraints interaction (all) (all)
        weights * 1 vdw $ktad_vdw end
    end

    dynamics torsion
        ntrfrq = 1
        nstep = $nstep_tad    timestep = 0.008
        tcoupling = true     tbath = $tad_temp    nprint = $nstep_tad
    end

    evaluate ( $ktad_vdw = $ktad_vdw - $tadvdw_step )
    evaluate ( $ktad_noe = $ktad_noe + $tadnoe_step )

end loop tad

{* =====> Slow-cooling with torsion angle dynamics *}

noe
    scale * $cool_noe
end

restraints dihedral
    scale = $cool_dih
end

flag exclude * include noe cdih bond angl impr vdw end

evaluate ( $final_t = 300 )
evaluate ( $tempstep = 100 )

evaluate ( $ncycle = int(( $cool_t - $final_t ) / $tempstep) )
evaluate ( $nstep = int( $cool_steps / $ncycle ) )

evaluate ( $ini_vdw = $tad_vdw )
evaluate ( $fin_vdw = 1.0 )
evaluate ( $vdw_step = ($fin_vdw - $ini_vdw) / $ncycle )

evaluate ( $bath = $cool_t )
evaluate ( $k_vdw = $ini_vdw )

```

```

evaluate ($i_cool = 0)
while ($i_cool < $ncycle) loop cool
  evaluate ($i_cool = $i_cool + 1)

  constraints interaction (all) (all)
    weights * 1. vdw $k_vdw end
  end

  dynamics torsion
    ntrfrq = 1
    nstep = $nstep    timestep = 0.007
    tcoup = true     tbath = $bath    nprint = $nstep
  end

  evaluate ($bath = $bath - $tempstep)
  evaluate ($k_vdw = $k_vdw + $vdw_step)

end loop cool

dynamics torsion
  topology
  reset
end
end

{* =====> Slow-cooling with Cartesian molecular dynamics *}

vector do ( vx = maxwell($vercool_temp) ) ( all )
vector do ( vy = maxwell($vercool_temp) ) ( all )
vector do ( vz = maxwell($vercool_temp) ) ( all )

noe
  scale * $vercool_noe
end

restraints dihedral
  scale = $vercool_dih
end

evaluate ($final_t = 300)
evaluate ($tempstep = 50)

evaluate ($ncycle = ($vercool_temp - $final_t)/$tempstep)
evaluate ($nstep = int($vercool_steps/$ncycle))

evaluate ($bath = $vercool_temp)

constraints interaction (all) (all)
  weights * 1 vdw $vercool_vdw end
end

evaluate ($i_cool = 0)
while ($i_cool < $ncycle) loop cool
  evaluate ($i_cool=$i_cool+1)

  dynamics verlet
    nstep = $nstep    time = 0.003
    iasvel = current  firstt = $bath
    tcoup = true     tbath = $bath
    nprint = $nstep   iprfrq = 0
  end

  evaluate ($bath = $bath - $tempstep)

end loop cool

{* =====> Final minimization *}

```

```

noe
  scale * $pow_noe
end

restraints dihedral
  scale = $pow_dih
end

constraints interaction (all) (all)
  weights * 1 vdw $pow_vdw end
end

minimize powell nstep=$pow_step drop=10.0 nprint=25 end

{* NOE Data Analysis *}
print threshold = 0.5 noe
evaluate ($noe5 = $violations)
print threshold = 0.2 noe
evaluate ($noe2 = $violations)
evaluate ($rms_noe = $result)

{* DIHE Data Analysis *}
print threshold = 5.0 dihe
evaluate ($dihe5 = $violations)
evaluate ($rms_dihe = $result)

{* CDIH Data Analysis *}
print threshold = 5.0 cdih
evaluate ($cdih5 = $violations)
evaluate ($rms_cdih = $result)

{* BOND Data Analysis *}
print thres=0.05 bond
evaluate ($bond5=$violations)
evaluate ($rms_bond = $result)

{* ANGLE Data Analysis *}
print thres=5.0 angle
evaluate ($angl5=$violations)
evaluate ($rms_angl = $result)

{* IMPROPER Data Analysis *}
print thres=5.0 improper
evaluate ($impr5=$violations)
evaluate ($rms_impr = $result)

{* ENERGY Data Analysis *}
energy end

set echo=off message=off end

display Energy: bond $bond, angle $angl, improper $impr,
display          NOE $noe, c-dihedral $cdih, vdw $vdw, total $ener
display RMSD:    bond $rms_bond, angle $rms_angl, dihedral $rms_dihe,
display          improper $rms_impr, NOE $rms_noe, c-dihedral $rms_cdih
display Violations: bond $bond5, angle $angl5, dihedral $dihe5,
display          improper $impr5, NOE $noe2, c-dihedral $cdih5

write coordinates output = "sa_tad.pdb" end

stop

```

```

remarks File: eginput/rna_refi/rna_databse_refine.inp
remarks Refinement of RNA using torsion angle and base-base positional
remarks database potentials of mean force

set seed=@xplor.seed end          ! Use xplor -s

{====>} parameter                 /* Read the parameter file. */
  @TOPPAR:dna-rna-allatom.par
end

evaluate ($knoe = 0.1)
evaluate ($kcdi = 10.0)

evaluate ($kori = 0.002)
evaluate ($knuc = 0.002)

{====>} structure @structure.psf end    /* Read the structure file. */
coor @sa_tad.pdb
flags exclude * include bonds angles impr end
mini powell nstep=200 step=1.0 end

coor copy end

restraints planar
  @plnr.tbl /* Sets up basepairs for the stem and even base-triples. */
end

@rna_orient.setup

noe
  nres=3000 /* Estimate greater than the actual number of NOEs. */
  class all
    @noes.tbl /* Read NOE distance ranges. */
    @noeh2o.tbl
  class hb
    @hbnd.tbl
end

restraints dihedral
  scale $kcdi
  nass = 5000
  set message on echo on end
  @dihs.tbl /* Read dihedral angle restraints. */
  set message on echo on end
end

noe /* Parameters for NOE effective energy term. */
  ceiling=1000
  averaging all cent
  potential all square
  sqconstant all 1.
  sqexponent all 2
  scale all $knoe /* Constant NOE scale throughout the protocol. */

  averaging hb sum
  potential hb biharmonic
  sqconstant hb 1.
  sqexponent hb 2
  scale hb $knoe /* Constant NOE scale throughout the protocol. */
end

evaluate ($knuc=0.1)

```

```

rama
  nres=10000
  set message off echo off end
  @nucleic_deltor_quarts2d.tbl
  @nucleic_deltor_quarts3d.tbl
  @nucleic_deltor_quarts4d.tbl
  @force_nucleic_quarts2d.tbl
  @force_nucleic_quarts3d.tbl
  @force_nucleic_quarts4d.tbl
end
set message on echo on end
@setup_nucleic_2d3d.setup
@setup_nucleic_4d.setup
set message on echo on end

parameter                      {* Parameters for the repulsive energy term. *}
  nbonds
    cutnb=6.5
    rcon=4.0 nbxmod=3 repel=0.8 rexp=2 irex=2
    wmin=0.01 tolerance=0.5
  end
end

vector do (store1 = decode(resid)) (name C3')
vector show min (store1) (name C3')
evaluate ($first_residue = $result)
vector show max (store1) (name C3')
evaluate ($last_residue = $result)

dynamics internal

  group (resid 500 )
  hinge rotate (resid 500)

  evaluate ($res = 1)
  while ($res le 22) loop group

    group (resid $res and resname CYT and
      (name n1 or name c6 or name c5 or name c4
        or name n3 or name c2))
    group (resid $res and resname GUA and
      (name n9 or name c4 or name n3 or name c2 or name n1 or
        name c6 or name c5 or name n7 or name c8))
    group (resid $res and resname ADE and
      (name n9 or name c4 or name n3 or name c2 or name n1 or
        name c6 or name c5 or name n7 or name c8))
    group (resid $res and resname URI and
      (name n1 or name c6 or name c5 or name c4
        or name n3 or name c2))

    evaluate ($res = $res +1)
  end loop group

  set message on echo on end
  cloop=false
  auto torsion
  maxe 10000
end

evaluate ($cool_steps = 3000)
evaluate ($init_t = 2000.01)
evaluate ($tol = $init_t/1000)

vector do (mass = 100.0) (all)
vector do (fbeta = 10.0) (all)

vector do (x=xcomp) (all)
vector do (y=ycomp) (all)
vector do (z=zcomp) (all)

```

```

evaluate ($ini_rad = 0.9)
evaluate ($ini_con= 0.004)
evaluate ($rcon=$ini_con)
evaluate ($ini_ang = 1.0)
evaluate ($ini_imp = 1.0)

evaluate ($fin_rad = 0.78)
evaluate ($fin_con = 4.0)

evaluate ($fin_ang = 1.0)
evaluate ($fin_imp = 1.0)

evaluate ($ini_noe = 2.0)
evaluate ($knoe = $ini_noe)
evaluate ($ini_nuc = 0.5)
evaluate ($knuc = $ini_nuc)
evaluate ($ini_orie = 0.002)
evaluate ($korie = $ini_orie)

evaluate ($fin_noe = 30.0)
evaluate ($fin_nuc = 1.0)
evaluate ($fin_orie = 0.30)

evaluate ($kcdi = 10.0)

noe scale * $knoe end

restraints dihed
  scale $kcdi
end

rama
  @force_nucleic_quarts2d.tbl
  @force_nucleic_quarts3d.tbl
  @force_nucleic_quarts4d.tbl
end
set message on echo on end

orie scale $korie end

evaluate ($rcon = 1.0)

parameters
  nbonds
    atom
    nbxmod 3
    wmin = 0.01 ! warning off
    cutnb = 100 ! nonbonded cutoff
    tolerance 45
    repel = 1.2 ! scale factor for vdw radii = 1 ( L-J radii)
    rexp = 2 ! exponents in (r^irex - R0^irex)^arexp
    irex = 2
    rcon = $rcon ! actually set the vdw weight
  end
end

flags exclude * include bond angl impr vdw noe cdih plan orie rama end

constraints
  interaction (not name c1' ) (all)
  weights * 1 angl 0.4 impr 0.1 vdw 0 elec 0 end
  interaction (name c1') (name c1')
  weights * 1 angl 0.4 impr 0.1 vdw 1.0 end
end

vector do (vx = maxwell($init_t)) (all)
vector do (vy = maxwell($init_t)) (all)
vector do (vz = maxwell($init_t)) (all)

dynamics internal
  itype=pc6
  !maxe=100
  etol=$tol
  tbath=$init_t
  response= 20
  response= 5
  nstep=5000

```



```

nprint=50
timestep= 0.002
endtime=10
end

parameters
  nbonds
    atom
    nbxmod 3
    wmin = 0.01 ! warning off
    cutnb = 4.5 ! nonbonded cutoff
    tolerance 0.5
    repel = 0.9 ! scale factor for vdw radii = 1 ( L-J radii)
    rexp = 2 ! exponents in (rairex - R0airex)arexp
    irex = 2
    rcon = 1.0 ! actually set the vdw weight
  end
end

evaluate ($kcdi = 200)
restraints dihed
  scale $kcdi
end

evaluate ($final_t = 25) { K }
evaluate ($tempstep = 25) { K }

evaluate ($ncycle = ($init_t-$final_t)/$tempstep)
evaluate ($nstep = int($cool_steps*4.0/$ncycle))
evaluate ($endtime = $nstep*0.002)

evaluate ($bath = $init_t)
evaluate ($k_vdw = $ini_con)
evaluate ($k_vdwfact = ($fin_con/$ini_con)^(1/$ncycle))
evaluate ($radius= $ini_rad)
evaluate ($radfact = ($fin_rad/$ini_rad)^(1/$ncycle))
evaluate ($k_ang = $ini_ang)
evaluate ($ang_fac = ($fin_ang/$ini_ang)^(1/$ncycle))
evaluate ($k_imp = $ini_imp)
evaluate ($imp_fac = ($fin_imp/$ini_imp)^(1/$ncycle))
evaluate ($noe_fac = ($fin_noe/$ini_noe)^(1/$ncycle))
evaluate ($knoe = $ini_noe)
evaluate ($nuc_fac = ($fin_nuc/$ini_nuc)^(1/$ncycle))
evaluate ($knuc = $ini_nuc)
evaluate ($orie_fac= ($fin_orie/$ini_orie)^(1/$ncycle))
evaluate ($korie = $ini_orie)

flags exclude * include bond angl impr vdw noe cdih plan orie rama end

vector do (vx = maxwell($bath)) (all)
vector do (vy = maxwell($bath)) (all)
vector do (vz = maxwell($bath)) (all)

evaluate ($i_cool = 0)
while ($i_cool < $ncycle) loop cool
  evaluate ($i_cool=$i_cool+1)

  evaluate ($bath = $bath - $tempstep)
  evaluate ($k_vdw=min($fin_con,$k_vdw*$k_vdwfact))
  evaluate ($radius=max($fin_rad,$radius*$radfact))
  evaluate ($k_ang = $k_ang*$ang_fac)
  evaluate ($k_imp = $k_imp*$imp_fac)
  evaluate ($knoe = $knoe*$noe_fac)
  evaluate ($knuc = $knuc*$nuc_fac)
  evaluate ($korie = $korie*$orie_fac)

  constraints
    interaction (all) (all)
    weights * 1 angles $k_ang improper $k_imp end
end

```

```

end

parameter
  nbonds
  cutnb=4.5 rcon=$k_vdw nbxmod=3 repel=$radius
end end

noe scale * $knoe end

rama
  @force_nucleic_quarts2d.tbl
  @force_nucleic_quarts3d.tbl
  @force_nucleic_quarts4d.tbl
end
set message on echo on end
orie scale $korie end

dynamics internal
  itype=pc6
  !maxe=100
  etol=$tol
  tbath=$bath
  response= 20
  response= 5
  nstep=$nstep
  endtime=$endtime
  timestep= 0.002
end

end loop cool

dynamics internal
  itype=powell
  nstep=800
  maxcalls=20000
  nprint=1
  etol=1e-7
  gtol=0.01
  deprec=0.001
end

noe scale * 50. end

parameter
  nbonds
  repel 0
  atom wmin=0.01 tolerance=0.5
  nbxmod=3 cutnb=11.5 ctonnb=9.5 ctofnb=10.5 tolerance=0.5
  rdie vswitch switch
end
end

restraints dihedral
  scale=200.
end

flags exclude * include bond angl impr vdw noe cdih elec dihe plan end

vector do ( fbeta=100. ) ( all )
dynamics verlet
  nstep=200 timestep=0.0005
  iasvel=maxwell firsttemperature=300
  tbath=300
  nprint=250 iprfrq=2500
  trajectory=refine.tra nsavc=200
end

dynamics analysis average
  input=refine.tra begin=10000 skip=100 stop=$cool_steps

```

```

end
close refine.tra end

minimize powell nstep= 600 nprint=25 end

{* NOE Data Analysis *}
print threshold=0.5 noe
evaluate ($rms_noe=$result)
evaluate ($v_noe=$violations)

{* DIHE Data Analysis *}
print threshold = 5.0 dihe
evaluate ($dihe5 = $violations)
evaluate ($rms_dihe = $result)

{* CDIH Data Analysis *}
print threshold=5. cdih
evaluate ($rms_cdih=$result)
evaluate ($v_cdih=$violations)

{* BOND Data Analysis *}
print thres=0.05 bonds
evaluate ($rms_bond=$result)

{* ANGLE Data Analysis *}
print thres=5. angles
evaluate ($rms_angl=$result)

{* IMPROPER Data Analysis *}
print thres=5. impropers
evaluate ($rms_impr=$result)
evaluate ($v_impr=$violations)

{* ENERGY Data Analysis *}
energy end

set echo=off message=off end

display Energy: bond $bond, angle $angl, dihedral $dihe,
display          improper $impr, NOE $noe, c-dihedral $cdih,
display          planar $plan, vdw $vdw, elec $elec, total $ener
display RMSD:   bond $rms_bond, angle $rms_angl, dihedral $rms_dihe,
display          improper $rms_impr, NOE $rms_noe, c-dihedral $rms_cdih
display Violations: bond $v_bond, angle $v_angl, dihedral $v_dihe,
display          improper $v_impr, NOE $v_noe, c-dihedral $v_cdih

{====>}          {* Name(s) of the family of final structures. *}

write coordinates output = "cross_pairs_rama.pdb" end

stop

```