

Niekanoniczne struktury kwasów nukleinowych indukowane specyficznym wiązaniem jonów metali

1. Imię i nazwisko

Witold Jacek Andrałojć

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

2016 **Doktor biologii strukturalnej**

międzynarodowe studia doktoranckie w Centrum Rezonansu Magnetycznego (CERM – wł. „Centro Europeo di Risonanze Magnetiche”),

(<https://www.cerm.unifi.it/training/international-doctorate>), (w ramach projektu Marie Curie Actions ITN pNMR), Uniwersytet we Florencji, Florencja, Włochy

Promotor: prof. Giacomo Parigi

Tytuł pracy: „*Conformational heterogeneity in multidomain biological systems studied through averaged NMR restraints*”

2013 **Magister chemii i nauki o materiałach**

studia magisterskie w ramach międzynarodowego programu studiów magisterskich z zakresu chemii fizycznej SERP-chem (www.serp-chem.eu) na:

Université Paris-Sud, Paryż, Francja

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań, Polska

Università Degli Studi di Genova, Genua, Włochy

Promotor: prof. Catalin Miron

Tytuł pracy: „*On the nature of Rotational Doppler Broadening in photoelectron spectroscopy – an experimental study*”

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.

2024 Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk: kierownik Zakładu Biomolekularnego NMR

2018 Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk: adiunkt

2017 Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk: asystent
-2018

2013 Centrum Rezonansu Magnetycznego (CERM), Uniwersytet we Florencji, Włochy:
-2016 doktorant

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.). Omówienie to winno dotyczyć merytorycznego ujęcia przedmiotowych osiągnięć, jak i w sposób precyzyjny określać indywidualny wkład w ich powstanie, w przypadku, gdy dane osiągnięcie jest dziełem współautorskim, z uwzględnieniem możliwości wskazywania dorobku z okresu całej kariery zawodowej.

Lista publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego:

- [H1] **W. Andrałojć**, M. Małgowska, J. Sarzyńska, K. Pasternak, K. Szpotkowski, R. Kierzek, Z. Gdaniec*, *Unraveling the structural basis for the exceptional stability of RNA G-quadruplexes capped by a uridine tetrad at the 3' terminus*, RNA, 2019, 25, 131-134
- [H2] **W. Andrałojć***, K. Pasternak, J. Sarzyńska, K. Zielińska, R. Kierzek, Z. Gdaniec*, *The origin of the high stability of 3'-terminal uridine tetrads: contributions of hydrogen bonding, stacking interactions, and steric factors evaluated using modified oligonucleotide analogs*, RNA 2020, 26, 2000-2016
- [H3] **W. Andrałojć***, J. Wieruszewska, K. Pasternak, Z. Gdaniec, *Solution Structure of a Lanthanide-binding DNA Aptamer Determined Using High Quality pseudocontact shift restraints*, Chem. Eur. J., 2022, 28, e202202114
- [H4] J. Wieruszewska, A. Pawłowicz, E. Połomska, K. Pasternak, Z. Gdaniec, **W. Andrałojć***, *The 8-17 DNAzyme can operate in a single active structure regardless of metal ion cofactor*, Nat. Commun., 2024, 15, 4218

Wstęp

Głównym celem prowadzonych przeze mnie badań jest lepsze zrozumienie zdolności cząsteczek kwasów nukleinowych – DNA i RNA – do silnego i specyficznego wiązania jonów metali, jak również potencjału takich oddziaływań do kształtowania struktur przestrzennych i aktywności tych biomolekuł. W ramach prezentowanego osiągnięcia habilitacyjnego wyznaczyłem z wysoką rozdzielczością struktury przestrzenne trzech typów cząsteczek kwasów nukleinowych oraz scharakteryzowałem tworzone przez nie miejsca wiązania jonów metali. Do zbadanych przeze mnie układów należą:

- 1) Czteroniciowy G-kwadrupleks RNA r(UGGUGGU)₄ tworzący się w następstwie oddziaływań z jonami potasu K⁺ (prace H1 i H2)
- 2) Aptamer DNA wiążący jony z grupy lantanowców po związaniu swojego celu molekularnego (praca H3)
- 3) Aktywna katalitycznie struktura przyjmowana przez DNAzym 8-17 po związaniu jonu Zn²⁺ jako kofaktora (praca H4)

Niniejsza rozprawa podzielona jest na trzy rozdziały. W pierwszym z nich opisuję właściwości fizyczne charakteryzujące typowe miejsca wiązania jonów metali tworzone przez cząsteczki kwasów nukleinowych oraz wachlarz metod biologii strukturalnej dostępnych do ich eksperymentalnej charakterystyki, koncentrując się na stosowanych przeze mnie metodach spektroskopii NMR. Rolą tego rozdziału jest również umiejscowienie poszczególnych prac eksperymentalnych (H1-H4) w szerszym kontekście badań oddziaływań cząsteczek DNA/RNA z jonami metali, przed pogłębioną dyskusją każdej z tych prac w Rozdziale 2. Rozdział 3 stanowi natomiast podsumowanie podobieństw oraz różnic pomiędzy właściwościami zbadanych przeze mnie układów oraz refleksję, jak wpłynęły one na wybór stosowanych przeze mnie technik badawczych i w konsekwencji uzyskane wyniki. Zawiera on również próbę syntezy wkładu, jaki uzyskane przeze mnie wyniki wniosły w rozwój mojej dyscypliny badawczej.

Rozdział 1

Charakterystyka, znaczenie i metody badania oddziaływań kwasów nukleinowych z jonami metali

1.1 Właściwości oddziaływań kwasów nukleinowych z jonami metali oraz ich rola w kształtowaniu struktur tych układów

Jako biopolimery obdarzone znaczącym ładunkiem ujemnym – wynikającym z obecności reszt fosforanowych w ich strukturach – kwasy nukleinowe w roztworze zawsze otoczone są chmurą neutralizujących je jonów dodatnich, często prostych, jednoatomowych kationów metali M^{n+} .¹ Jednakże większość z tych przeciwnonów oddziałuje z DNA/RNA w sposób niespecyficzny, jedynie na zasadzie przyciągania elektrostatycznego i pozostając w ciągłym ruchu tworzy wokół biomolekuły tzw. atmosferę jonową (ang. *ion atmosphere*).^{2,3} Już ten typ oddziaływań ma istotny wpływ na preferencje konformacyjne kwasów nukleinowych stabilizując ich kompaktowe struktury trójwymiarowe poprzez ekranowanie odpychania pomiędzy poszczególnymi grupami fosforanowymi.^{2,3} Mniej liczne, bo odpowiadające średnio za około 10 % ładunku dodatniego zobojętniającego cząsteczki RNA,^{1,2} a jednak często bardziej istotne dla preferencji strukturalnych cząsteczki DNA lub RNA są jony metali wiążące się specyficznie, a więc do konkretnych elementów jej struktury trójwymiarowej (ang. *site-specific binding*).^{N1} Oddziaływania takie mogą oznaczać

^{N1} W opisie osiągnięcia habilitacyjnego sformułowanie „specyficzne wiązanie” stosuję najczęściej jako odpowiednik występującego w anglojęzycznej literaturze określenia „*site-specific binding*” oznaczającego oddziaływanie z konkretnym elementem struktury trójwymiarowej DNA lub RNA.

Nie mam więc w większości przypadków na myśli specyficzności danego miejsca wiązania dla konkretnego typu jonu metalu, gdyż taka sytuacja zdarza się w przypadku kwasów nukleinowych relatywnie rzadko, co opisuję w Rozdziale 1.1. W sporadycznych przypadkach dyskusji miejsc wiązania rzeczywiście specyficznych dla konkretnego typu jonu użycie określenia „specyficzne wiązanie” zostanie zawsze opatrzone odniesieniem do niniejszej notatki.

tworzenie bezpośrednich wiązań koordynacyjnych jonu metalu z grupami funkcyjnymi w strukturze kwasu nukleinowego, jednakże częstotliwość występowania takich bezpośrednich kontaktów jest zaskakująco niska. W większości przypadków jon metalu pozostaje w znacznym stopniu hydratowany, dominują zaś oddziaływania w zewnętrznej strefie koordynacyjnej (oddziaływania wodorowe koordynujących jon metalu cząsteczek wody z ligandami DNA/RNA) oraz nadal istotną rolę pełni przyciąganie elektrostatyczne. Za ilustrację może posłużyć analiza statystyczna zaobserwowanych krystalograficznie specyficznych miejsc wiązania jonów magnezu Mg^{2+} o preferowanej liczbie koordynacyjnej $N=6$ do cząsteczek RNA.⁴ Spośród kilkunastu tysięcy przeanalizowanych miejsc wiązania jedna trzecia nie zawierała żadnych bezpośrednich kontaktów jonu Mg^{2+} z grupami funkcyjnymi RNA, ponad połowa jeden lub dwa takie kontakty, a jedynie poniżej 10% miejsc trzy lub cztery bezpośrednie oddziaływania. Sytuacja ta pozostaje w jaskrawym kontraście do obrazu obserwowanego dla jonów metali wiążących się do enzymów białkowych, dla których ligandy białkowe rutynowo wypełniają większość lub nawet całą pierwszą strefę koordynacyjną metalu. Różnica ta przekłada się też bezpośrednio na nieporównywalnie niższe stałe wiązania jonów metali osiągane przez cząsteczki kwasów nukleinowych w porównaniu do układów białkowych.⁵ Już dla jonów tolerowanych przez komórki w stosunkowo wysokich stężeniach, jak Ca^{2+} , normą dla białek są stałe dysocjacji (K_d) w zakresie nanomolowym,⁶ zaś dla jonów których metabolizm w komórkach jest ściśle regulowany, układy białkowe mogą osiągać stałe wiązania w zakresie attomolowym,⁷ porównywalnym do kompleksów metali z małowartościowymi chelatami takimi jak EDTA. W kontraście duża część istotnych biologicznie miejsc wiązania jonów Mg^{2+} do RNA wykazuje stałe dysocjacji w zakresie milimolowym,⁸⁻¹¹ z mniej licznymi przykładami miejsc dla których oddziaływanie przesunięte jest w stronę mikromolowych wartości stałych dysocjacji ($K_d \approx 10^{-5}$ - 10^{-6} M).¹² Co więcej, istnieją przesłanki sugerujące, że wartości te zbliżają się już do fizycznego limitu stałych wiązania osiągalnych dla oddziaływań kwasów nukleinowych z dwuwartościowymi jonami metali. Mianowicie liczne eksperymenty typu SELEX, poszukujące motywów strukturalnych kwasów nukleinowych najbardziej zdolnych do silnego oddziaływania z jonami takimi jak Zn^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} i Hg^{2+} , znajdowały zawsze układy wiążące dany metal z wartością K_d nie lepszą niż 10^{-6} M.¹³⁻¹⁵ Obok mniejszych entalpii swobodnych oddziaływań, drugą cechą często charakteryzującą miejsca wiązania jonów metali tworzone przez cząsteczki kwasów nukleinowych jest ich ograniczona selektywność względem typu wiążanego jonu. Właściwość ta wynikać może ze wspomnianego wcześniej większego udziału oddziaływań elektrostatycznych i wodorowych w stosunku do bezpośredniej koordynacji dla wielu kompleksów DNA/RNA-metal. Dotyczy to również miejsc wiązania o istotnym znaczeniu strukturalnym i funkcjonalnym. Za przykład posłużyć tu mogą liczne miejsca specyficznego wiązania metali dwuwartościowych obecne w istotnych biologicznie rybozymach – a więc cząsteczkach RNA zdolnych do katalizowania reakcji własnej hydrolizy w ściśle zdefiniowanych punktach sekwencji. Wypełnienie wspomnianych miejsc wiązania przez kationy metalu jest niezbędne dla przyjęcia przez cząsteczki rybozymów kompaktowych struktur aktywnych

katalitycznie. Możliwe jest również bezpośrednie zaangażowanie związanych jonów metalu w katalizowaną przez dany rybozym reakcję hydrolizy, choć dla wielu aktywnych katalitycznie RNA nie osiągnięto jeszcze w tej kwestii konsensusu.^{5,16,17} W komórkach żywych naturalnym kofaktorem rybozymów są jony magnezu Mg^{2+} , jednak liczne badania tego typu cząsteczek *in vitro* wykazały, że są one w stanie oddziaływać z całą serią innych jonów dwu- i trójwartościowych, takich jak Ca^{2+} , Sr^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Co^{3+} czy też jony lantanowców Ln^{3+} .^{1,5,16} W wielu przypadkach w obecności takich alternatywnych kofaktorów cząsteczki rybozymów zachowują znaczącą lub niekiedy nawet poprawioną aktywność katalityczną.¹ Dostępne struktury krystalograficzne pokazują, że różne jony mogą oddziaływać z tym samym miejscem wiązania przyjmując odmienne geometrie wiązania,¹ różniące się na przykład ilością bezpośrednich kontaktów RNA-metal, zależnie od czynników takich jak promień jonowy metalu lub też jego entalpia dehydratacji. Zdolność promowana reakcji hydrolizy RNA w obecności serii różnych kationów metali jest również cechą wielu spośród odpowiedników rybozymów zbudowanych z DNA, zwanych DNAzymami. Jednakże w przypadku DNAzymów dostępna ilość wysokorozdzielczych informacji strukturalnych jest bardzo ograniczona, gdyż rozwiązano jedynie kilka struktur przestrzennych dla tego typu układów.^{18–20} Należy do nich wyznaczona przeze mnie struktura trójwymiarowa DNAzymu 8-17 wywołana wiązaniem jonu cynku Zn^{2+} , opisana w pracy **H4**.

Innym przykładem ograniczonej selektywności tworzonych przez cząsteczki kwasów nukleinowych miejsc wiązania jonów metali mogą być struktury G-kwadrupleksów DNA i RNA. Ich architektura, opisana bardziej szczegółowo w Rozdziale 2.1, zawiera zawsze centralny kanał, wewnątrz którego jony metali wiążą się poprzez bezpośrednią koordynację potencjalnie aż ośmiu grup karbonylowych należących do nukleozasad reszt guanozyny. Oddziaływania zachodzące wewnątrz kanałów G-kwadrupleksów stanowią rzadki przykład wiązania jonów metali zachodzącego z ich pełną dehydratacją. Pomimo tego diskutowane miejsca wiązania nie wykazują się znaczącą selektywnością i są w stanie przyjąć szerokie spektrum jonów zarówno jedno- jak i dwuwartościowych, takich jak K^+ , Na^+ , Cs^+ , Ba^{2+} , Sr^{2+} , czy Pb^{2+} .²¹ W ramach prezentowanego osiągnięcia habilitacyjnego – prace **H1** i **H2** – rozwiązałem strukturę trójwymiarową czteroniciowego G-kwadrupleksu RNA utworzonego poprzez wiązanie jonów K^+ oraz wykazałem, że ta sama topologia G-kwadrupleksu tworzy się również, gdy w kanale wiążą się jony Na^+ .

Pomimo opisywanej dotychczas zazwyczaj niskiej selektywności miejsc wiązania jonów metali tworzonych przez cząsteczki kwasów nukleinowych, na przestrzeni lat zidentyfikowano również serię stosunkowo rzadszych przykładów oddziaływań charakteryzujących się wysoką selektywnością lub nawet specyficznością względem konkretnego typu jonu metalu.^{N1} Najbardziej znanymi przykładami tego typu oddziaływań są stabilizowane jonami metali pary zasad pirymidyna-pirymidyna. Niesparowanie tymidyna-tymidyna (T:T) jest zdolne do związania jonu rtęci Hg^{2+} prowadzącego do utworzenia się pary zasad T-Hg-T o stabilności porównywalnej do kanonicznych

par Watsona-Cricka.²² Oddziaływanie to opiera się na bezpośredniej koordynacji jonu rtęci przez atomy azotu N3 obu reszt tymidyny. Niesparowanie cytydyna-cytydyna (C:C) jest zdolne do tworzenia analogicznych oddziaływań, tym razem jednak z jonami srebra Ag^+ .²³ Częsteczki DNA tworzą również dość szeroki wachlarz miejsc wiązania potencjalnie selektywnych względem jonów lantanowców Ln^{3+} . Wniosek taki można wysnuć na podstawie identyfikacji serii różnorodnych sekwencyjnie cząsteczek DNAzymów wykazujących aktywność katalityczną jedynie w obecności jonów Ln^{3+} jako kofaktorów.²⁴ Tym niemniej cząsteczki te nigdy nie były głębiej badane strukturalnie, zaś brak obserwowalnej aktywności katalitycznej w obecności jonów metali innych niż Ln^{3+} nie jest dowodem braku oddziaływań. Przykłady odwrotnej sytuacji są znane w literaturze, jak choćby wiadomo, że jony Ln^{3+} wiążą się do rybozomu hammerhead, aktywowanego zazwyczaj przez różnorodne jony dwuwartościowe, jednak tworzący się kompleks jest nieaktywny katalitycznie.²⁵ Potwierdzonym przykładem selektywnego wiązania jonu Ln^{3+} przez DNA jest natomiast odkryty w 2016 roku aptamer wiążący lantanowce – Ln_apramer.²⁶ W jego przypadku wiązaniu jonu lantanowca towarzyszy zmiana całej trzeciorzędowej architektury DNA obserwowana w oryginalnej publikacji za pomocą metod fluorescencyjnych. Podobnej zmiany strukturalnej nie zaobserwowano miareczkując Ln_apramer szerokim wachlarzem innych jonów metali co pozwoliło stwierdzić, że tworzy on miejsce wiązania rzeczywiście specyficzne dla jonów lantanowców. Jednak wobec braku wysokorozdzielczych informacji strukturalnych niejasne pozostawało źródło tej specyficzności. Wyjaśnienie źródeł selektywnego wiązania lantanowców przez Ln_apramer było jednym z celów wyznaczenia przeze mnie wysokorozdzielczej struktury tego układu (opisanej w pracy **H3**).

1.2 Badanie oddziaływań kwasów nukleinowych z jonami metali metodami biologii strukturalnej

Dostępne typy metod wysokorozdzielczych

W celu uzyskania precyzyjnych informacji o położeniu miejsc wiązania metali w strukturze DNA/RNA oraz o szczegółach geometrii tych oddziaływań, niezbędne jest wykorzystanie jednej z wysokorozdzielczych metod badania struktur biomolekuł, a więc krystalografii, kriomikroskopii elektronowej (cryo-EM) lub spektroskopii jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR). W przypadku miejsc wiązania o dobrze zdefiniowanej geometrii oddziaływań najbogatszym źródłem informacji strukturalnych są zdecydowanie dwie pierwsze z tych metod, z wiodącym udziałem krystalografii wynikającym zarówno ze znacznie dłuższego okresu stosowania tej metody, jak i z zazwyczaj wyższej rozdzielczości otrzymywanych struktur, ułatwiającej precyzyjne modelowanie położenia jonów metali względem biomolekuły. Struktury krystalograficzne o odpowiedniej rozdzielczości pozwalają nie tylko na jednoznaczne ustalenie tożsamości atomów koordynujących jon metalu, ale również dostarczają szczegółowych informacji o geometrii tworzącego się kompleksu, długości wiązań metal-ligand itp. Dla hydratowanych jonów koordynowane cząsteczki wody również

mogą być widoczne w strukturach krystalograficznych, jeśli przyjmują dobrze zdefiniowane pozycje względem biomolekuły, na przykład na skutek tworzenia z nią wiązań wodorowych. Do ograniczeń metod krystalograficznych w tym kontekście należy natomiast zaliczyć niemożliwość obserwacji miejsc wiązania o gorzej zdefiniowanej geometrii oddziaływań (również tych silnych i specyficznych), brak informacji o sile oddziaływań jonu metalu z poszczególnymi miejscami (niezbędnej choćby w celu odróżnienia silnego mikromolowego miejsca wiązania od licznych miejsc o milimolowej stałej dysocjacji K_d) oraz potencjalny wpływ upakowania w kryształach zarówno na strukturę cząsteczki DNA/RNA jak i na jej oddziaływania z jonami metali. Nie bez znaczenia jest też fakt, że otrzymanie kryształów bardziej skomplikowanych cząsteczek kwasów nukleinowych jest często bardzo trudne.

Spektroskopia NMR w kontekście oddziaływań DNA/RNA-metal

Sposób wykorzystania trzeciej z wysokorozdzielczych technik biologii strukturalnej – spektroskopii NMR, stanowiącej podstawowe narzędzie w mojej pracy badawczej – w kontekście badania miejsc wiązania jonów metali różni się znacząco od wymienionych wcześniej metod. Z jednej strony technika ta nie jest zazwyczaj w stanie dostarczyć tak dokładnych informacji o szczegółach oddziaływań, gdyż duża część istotnych biologicznie jonów metali nie jest bezpośrednio obserwowalna w widmach NMR (ich jądra atomowe są nieaktywne magnetycznie, bądź też wykazują się bardzo niską czułością). Ich obecność obserwowana jest więc pośrednio, poprzez wpływ jaki wywiera na parametry NMR innych jąder atomowych. Z drugiej jednak strony, spektroskopia NMR doskonale uzupełnia wymienione wcześniej ograniczenia technik krystalograficznych, dzięki:

- 1) badaniu kompleksów DNA/RNA-metal bezpośrednio w roztworze,
- 2) wrażliwości na obecność oddziaływań, niezależnie od stopnia ich zdefiniowania w przestrzeni,
- 3) możliwości bezpośredniego powiązania obecności jonu metalu ze zmianami strukturalnymi zachodzącymi w biomolekule,
- 4) możliwości oszacowania wartości K_d dla poszczególnych obserwowanych miejsc wiązania.

Mnogość parametrów i technik widmowych NMR dostępnych do badania oddziaływań kwasów nukleinowych z jonami metali, na bardzo różnych poziomach szczegółowości, wymaga w tym miejscu podsumowania i usystematyzowania.

Wyznaczanie struktur NMR kwasów nukleinowych – metody klasyczne (więzy NOE i sprzężenia J)

W przypadku układów, dla których same struktury przestrzenne przyjmowane przez biopolimer tworzą się w odpowiedzi na wiązanie jonów metali – jak ma to miejsce dla wszystkich cząsteczek opisywanych w pracach **H1-H4** – kluczowym elementem badania oddziaływań jest

scharakteryzowanie konformacji samego komponentu DNA/RNA w obserwowanym kompleksie. Wachlarz metod NMR dostępnych do tego celu pokrywa się w dużym stopniu z narzędziami dostępnymi do badania struktur przestrzennych DNA/RNA w ogóle,²⁷ choć gdy wiązany metal ma właściwości paramagnetyczne jego obecność może być wykorzystana do uzyskania dodatkowych informacji strukturalnych.²⁸ Pierwszym etapem analizy strukturalnej metodami NMR jest zawsze przypisanie sygnałów obserwowanych w widmach do poszczególnych atomów w badanej cząsteczce, za pomocą zestawu widm korelacyjnych.²⁷ W toku tej analizy uzyskujemy też jednoznaczną informację czy badana cząsteczka przyjmuje jedną stabilną formę strukturalną w roztworze czy też jest w nim obecna równowaga konformacyjna pomiędzy szeregiem struktur. W przypadku kompleksów z metalami możemy też już na wstępnym etapie badań stwierdzić czy oddziaływanie z jonami ma istotny wpływ na strukturę przestrzenną komponentu DNA/RNA. Jeśli podczas miareczkowania wiązaniem metalem obserwuje się w widmach ¹H-NMR pojawienie się szeregu nowych sygnałów rezonansowych w rejonie iminowym, świadczy to o tworzeniu nowych elementów struktury drugorzędowej i/lub o reorganizacji istniejących już elementów w nową architekturę trzeciorzędową (sytuacja taka miała miejsce w pracy **H3**). Gdy w podobnym eksperymencie obserwujemy natomiast zanik grupy sygnałów rezonansowych, któremu towarzyszy wzrost intensywności i często wyostrenie pozostałych, możemy wnioskować, że wiązanie metalu wpływa na równowagę konformacyjną obecną w cząsteczce kwasu nukleinowego stabilizując jej formy strukturalne zdolne do wiązania jonu metalu kosztem pozostałych (praca **H4**). Tego typu eksperymenty pozwalają już na wstępnym etapie badań konformacyjnych potwierdzić, że badana forma strukturalna DNA/RNA rzeczywiście stanowi kompleks z konkretnym jonem metalu.

W celu wyznaczenia z wysoką rozdzielczością struktury przestrzennej danej formy DNA/RNA należy wyekstrahować w widm NMR możliwie jak najszerszy zestaw informacji bezpośrednio przekładalnych na parametry strukturalne, tzw. „więzów strukturalnych NMR”. Następnie zaś, za pomocą symulacji dynamiki molekularnej ograniczonej zestawem wyznaczonych więzów, identyfikuje się strukturę przestrzenną spełniającą wszystkie dane eksperymentalne NMR. W kolejnym etapie weryfikuje się jak dobrze użyte więzy definiują poszczególne jej elementy, poprzez wielokrotne powtarzanie symulacji i analizę statystyczną zestawu otrzymanych struktur. Jakość (stopień zdefiniowania) uzyskanej struktury końcowej zależy bezpośrednio od ilości oraz typów użytych więzów NMR. Klasycznie najważniejszym typem więzów NMR są więzy odległościowe, obliczane na podstawie obserwacji Jądrowego Efektu Overhauser’a (ang. „Nuclear Overhauser Effect” – NOE) pomiędzy atomami wodoru. Efekt ten pozwala na półilościowe oszacowanie dystansów pomiędzy parami jąder atomowych znajdujących się bliżej niż 5-6 Å od siebie. Są to więc więzy na krótkie odległości. Więzy odległościowe NOE uzupełniane są zazwyczaj więzami na kąty dwuścienne, pomiędzy atomami oddalonymi o trzy wiązania chemiczne, obliczanymi na podstawie wartości obserwowanych sprzężeń skalarnych („sprzężeń J”). Ten typ więzów dostarcza lokalnych

informacji np. o konformacjach przyjmowanych przez szkielet fosforanowo-cukrowy cząsteczki DNA/RNA, w tym o sposobie pofałdowania pierścieni cukrowych poszczególnych reszt nukleotydowych. Te dwa typy więzów strukturalnych pozostają do dzisiaj najczęściej używanymi źródłami informacji w procesie wyznaczania struktur biomolekuł metodami NMR, w tym struktur opisanych w pracach **H1**, **H3** i **H4**.

Wyznaczanie struktur NMR kwasów nukleinowych – więzy dalekiego zasięgu (RDC, PCS, PRE)

Z uwagi na lokalny charakter tych klasycznych więzów NMR, niektóre globalne cechy bardziej skomplikowanych struktur kwasów nukleinowych, jak na przykład dokładne wartości kątów pomiędzy poszczególnymi elementami helikalnymi lub też stopień zakrzywienia dłuższych helis (ang. „helix bending”), są często wyznaczone w strukturach NMR z niższą dokładnością.²⁹ Ograniczenia te eliminuje wykorzystanie nowszych typów więzów NMR, dostarczających bardziej globalnych informacji strukturalnych, jednak z uwagi na trudności techniczne związane z ich obserwacją, są one nadal używane dla kwasów nukleinowych jedynie w szczególnych przypadkach. Spośród nich najczęściej wykorzystywane są tzw. resztkowe sprzężenia dipolowe (ang. „residual dipolar couplings” – RDC) dostarczające informacji o kątach tworzonych przez wektory wyznaczone przez pary atomów w cząsteczce z układem odniesienia całej jej struktury przestrzennej.^{28,30} Pomiar RDC wymaga jednak częściowej orientacji biomolekuł względem zewnętrznego pola magnetycznego,³⁰ osiąganey najczęściej poprzez umieszczenie ich w tzw. mediach orientujących (zawierających na przykład cząsteczki lipidów zorganizowane w bicele lub całe nukleokapsydy bakteriofagów) oraz najczęściej znakowania DNA/RNA izotopami ^{13}C i/lub ^{15}N w celu uzyskania zadowalającej czułości do pomiaru tych subtelnych efektów. Alternatywną metodą wywołania RDC jest samoorientacja badanej biomolekuły poprzez wprowadzenie do jej struktury niesparowanych elektronów o niezerowej anizotropii tensora podatności magnetycznej $\Delta\chi$ (ang. „magnetic susceptibility tensor anisotropy”).²⁸ Ogromną zaletą tej metody jest fakt, że obecność w cząsteczce niesparowanego elektronu umożliwia również pomiar dwóch innych typów więzów NMR dalekiego zasięgu dla każdego atomu obecnego w cząsteczce:

- 1) przesunięcia dipolowego (ang. „dipolar shift” lub „pseudo-contact shift” – PCS), również wymagającego $\Delta\chi \neq 0$ dla niesparowanych elektronów
- 2) paramagnetycznego wzmocnienia relaksacji (ang. „paramagnetic relaxation enhancements” – PRE), wymagającego jedynie obecności niesparowanych elektronów, niezależnie od ich $\Delta\chi$

Oba te efekty niosą informacje o położeniu niesparowanego elektronu względem każdego z atomów biomolekuły i są obserwowane na widmach NMR jako odpowiednio przesunięcia i poszerzenia odpowiednich sygnałów rezonansowych. Wszystkie te typy więzów pozwalają na znacznie bardziej dokładne i precyzyjne wyznaczanie struktur większych biomolekuł, mogą też być

użyte do badania dynamiki tych cząsteczek oraz ich oddziaływań intermolekularnych. Efekty te, znane pod wspólną nazwą “więzów paramagnetycznych”, udowodniły już swoją niezwykłą wartość dla układów białkowych,²⁸ jednak z powodu trudności natury technicznej ich wykorzystanie w badaniach kwasów nukleinowych pozostaje nadal bardzo ograniczone. Niesparowane elektrony o $\Delta\chi \neq 0$ mogą być wprowadzone do biomolekuł jedynie z wykorzystaniem wybranych jonów metali o właściwościach paramagnetycznych – takich jak jony lantanowców Ln^{3+} lub niektóre jony z bloku d, jak Co^{2+} . Obserwowana wartość $\Delta\chi$ zależy również w kluczowy sposób od pierwszej strefy koordynacyjnej jonu metalu w kompleksie z biomolekułą oraz od stopnia zdefiniowania pozycji jonu metalu w układzie odniesienia biomolekuły (miejsce wiązania metalu musi być stabilnie zakotwiczone w jej strukturze). Dla układów białkowych wiele pracy włożono w rozwój bogatego repertuaru metod wprowadzania takich miejsc wiązania do biomolekuły – tzw. „znaczników paramagnetycznych” (ang. „*paramagnetic tags*”).³¹ Pośród tych znaczników wiele opartych jest na kowalencyjnym przyłączaniu do białka kompleksów odpowiednich jonów podczas gdy inne opierają się na takiej mutacji sekwencji aminokwasów, aby wprowadzić miejsce wiązania bezpośrednio do struktury pierwszorzędowej układu. Niestety, pomimo wysiłków^{32,33} dla kwasów nukleinowych nie zostały dotąd opracowane użyteczne w praktyce odpowiedniki tych metod i dostępne są tylko znaczniki o $\Delta\chi$ równym 0, oparte na trwałych rodnikach organicznych i zdolne do wywoływania jedynie efektu PRE.³⁴ Istotną motywacją do podjęcia przeze mnie badań nad strukturą aptameru wiążącego lantanowce (praca **H3**) było ustalenie czy jon metalu w kompleksie z tą cząsteczką DNA charakteryzuje się $\Delta\chi \neq 0$, co otwierałoby perspektywę użycia tego układu jako znacznika paramagnetycznego dla kwasów nukleinowych. Zebrane przeze mnie dane NMR wykazały, że istotnie dla tego aptameru możliwy jest pomiar pełnego zestawu więzów paramagnetycznych. Dlatego też przy wyznaczaniu struktury tego układu wykorzystałem obok klasycznych więzów NOE również bogaty zestaw paramagnetycznych więzów PCS. Jak opisuję bardziej szczegółowo w Rozdziale 2.2, pozwoliło to na dużo precyzyjniejsze niż przy użyciu jedynie klasycznych więzów, wyznaczenie struktury przestrzennej DNA oraz, co rzadko spotykane, na dokładne ustalenie pozycji przyjmowanej przez jon lantanowca za pomocą danych eksperymentalnych NMR.

Charakterystyka miejsc wiązania metalu w strukturach NMR – symulacje MD i pomiar CSP

W badaniach NMR kompleksów kwasów nukleinowych z metalami, wyznaczenie struktury przestrzennej komponentu DNA/RNA opisanymi wcześniej metodami nie dostarcza zazwyczaj bezpośrednio żadnych informacji o położeniu związanego jonu. Dlatego też do opisanego jego właściwości konieczne jest wspomaganie się albo dodatkowymi eksperymentami NMR albo też metodami obliczeniowymi. W drugim z tych podejść przeprowadza się serię symulacji dynamiki molekularnej korzystając z wyznaczonej metodami NMR struktury DNA/RNA jako punktu startowego. W symulacjach tych modeluje się również pozostałe składniki roztworu – cząsteczki

rozpuszczalnika oraz jony dodatnie i ujemne (są to tzw. ang. „explicit solvent molecular dynamic simulations”). Następnie, poprzez analizę uzyskanych trajektorii dynamiki molekularnej, identyfikuje się miejsca na powierzchni DNA/RNA, w których preferencyjnie lokują się jony metali i analizuje się okupację oraz geometrię tych oddziaływań (stopień uporządkowania jonu w przestrzeni, ilość i tożsamość bezpośrednich kontaktów z DNA/RNA itp.). Metodami tego typu posłużyłem się w badaniach oddziaływań G-kwadrupeksu RNA r(UGGUGGU)₄ z jonami potasu K⁺ (prace **H1** i **H2**). Głównym ograniczeniem tego podejścia jest fakt, że – z uwagi na przybliżony sposób opisu właściwości fizycznych komponentów kompleksu – obserwacja konkretnych sposobów oddziaływań w symulacjach nie jest gwarancją ich występowania w rzeczywistych układach. Z tego powodu możliwość choćby przybliżonej lokalizacji miejsca wiązania metodami eksperymentalnymi NMR jest bardzo pożądana. Możliwość taką zapewnia pomiar zaburzeń przesunięć chemicznych (ang. „chemical shift perturbations” - CSP) atomów w cząsteczce DNA/RNA wywołanych przez wiązany jon metalu podczas tworzenia kompleksu.³⁵ CSP mierzy się poprzez miareczkowanie jonu metalu do próbki DNA/RNA, przypisanie częstotliwości rezonansowych w różnych punktach miareczkowania i następnie obliczenie dla każdego atomu obserwowanej wartości zmiany przesunięcia chemicznego. Zmierzone CSP są następnie mapowane na powierzchnię rozwiązanej uprzednio struktury trójwymiarowej DNA/RNA, co pozwala na identyfikację skupisk atomów, których przesunięcia chemiczne są wrażliwe na obecność metalu. Optymalnie informacje dostępne dzięki pomiarom CSP mogą być wykorzystane w tandemie z opisanymi powyżej badaniami za pomocą metod obliczeniowych. W takim przypadku CSP mogą być użyte do wstępnej „niskorozdzielczej” identyfikacji miejsca wiązania, zaś symulacje do pogłębionej analizy geometrii zachodzących oddziaływań.³⁵ Alternatywnie, symulacje dynamiki molekularnej mogą być przeprowadzone jako pierwsze, a następnie CSP zastosowane do weryfikacji, które z obserwowanych *in silico* miejsc wiązania są rzeczywiście obecne w prawdziwym kompleksie.³⁶ Istotnym ograniczeniem metod opartych na pomiarze zaburzeń przesunięć chemicznych jest fakt, że nie wszystkie obserwowane CSP muszą wynikać z bezpośredniego wpływu koordynowanego jonu metalu na gęstość elektronową atomów w jego najbliższej okolicy – co było cichym założeniem przedstawianego wyżej rozumowania. Założenie takie jest prawdziwe tylko w przypadku, gdy tworzenie kompleksu z jonem metalu nie wpływa znacząco na strukturę samego DNA/RNA. W przeciwnym wypadku znaczna część obserwowanych CSP wywołana będzie przez towarzyszącą wiązaniu zmianę strukturalną, co uniemożliwi skorelowanie zakresu ich występowania z bezpośrednim sąsiedztwem miejsca wiązania. W mojej pracy badawczej koncentruję się właśnie na układach, których struktury trzeciorzędowe tworzą się w odpowiedzi na wiązanie jonu metalu, co znacząco utrudnia wykorzystanie CSP do badania miejsc oddziaływań. Tym niemniej udało mi się zastosować tę metodę do identyfikacji miejsca wiązania jonu Zn²⁺ do cząsteczki DNAzemu 8-17, dzięki zastosowaniu wysokich stężeń jonu Na⁺, o znacznie niższym powinowactwie, do wcześniejszego ustrukturyzowania tego układu (praca **H4**).

Charakterystyka miejsc wiązania metalu w strukturach NMR – metody oparte na NOE, PRE i PCS

Pomiar CSP jest metodą umożliwiającą badanie oddziaływań DNA/RNA z szerokim spektrum jonów metali, jednak dostarcza jedynie przybliżonych informacji o geometrii miejsca wiązania. W przypadku niektórych jonów możliwe jest jednak uzyskanie dodatkowych informacji o wyższej rozdzielczości dzięki zastosowaniu efektu NOE lub też efektów paramagnetycznych – PRE i PCS. Najistotniejszy jon oddziałujący z cząsteczkami RNA *in vivo*, czyli Mg^{2+} , jest niemożliwy do bezpośredniej obserwacji metodami NMR. Już w latach dziewięćdziesiątych zauważono jednak, że inertny kompleks kobaltu (III) $Co(NH_3)_6^{3+}$ oddziałuje z bardzo podobnymi miejscami na powierzchni RNA jak w pełni hydratowany jon magnezu (II) $Mg(H_2O)_6^{2+}$.³⁷ Protony cząsteczek NH_3 w tym kompleksie są bezpośrednio obserwowalne metodami NMR i możliwy jest pomiar efektu NOE pomiędzy nimi, a atomami należącymi do cząsteczki RNA. Doprowadziło to do szerokiego zastosowania $Co(NH_3)_6^{3+}$ jako substytutu Mg^{2+} w badaniach geometrii oddziaływań tego jonu z RNA. W podobny sposób wykorzystywane były również jony metali przejściowych o właściwościach paramagnetycznych – Mn^{2+} czy Ni^{2+} (w obu przypadkach z $\Delta\chi = 0$) – tym razem wykorzystując fakt, że generują one w swoim otoczeniu efekt paramagnetycznego wzmocnienia relaksacji (PRE).^{36–38} Efekt PRE przekładany był na informacje strukturalne na dwa sposoby. W niektórych pracach wykorzystywano go jedynie jakościowo – tworząc listy atomów na powierzchni RNA dla których był on obserwowalny i uzyskując w konsekwencji informacje podobne do dostarczanych przez CSP.^{36,37} W innych zaś analizowano ilościowo siłę efektu PRE dla poszczególnych atomów, uzyskując zestaw więzów strukturalnych, podobnych do otrzymywanych za pomocą efektu NOE, jednak obserwowalnych na znacznie dłuższe odległości.³⁸ To drugie podejście pozwala w teorii na bardzo precyzyjne wyznaczanie pozycji przyjmowanych przez jony paramagnetyczne w kompleksach z DNA/RNA, jednak w praktyce precyzyjna ekstrakcja wartości efektu PRE z widm może być trudna,³⁹ zaś ich ilościowa interpretacja wymaga poczynienia dodatkowych założeń dotyczących parametrów opisujących obserwowany proces relaksacji.⁴⁰ Podobnych problemów nie sprawia pomiar i interpretacja innego typu więzów paramagnetycznych dalekiego zasięgu – przesunięć dipolowych, PCS. Niestety w tym wypadku wymaganie obecności na związanym jonie metalu niesparowanego elektronu o $\Delta\chi \neq 0$ bardzo ograniczyło ilość układów DNA/RNA, dla których udało się jak do tej pory zaobserwować te efekty. W istocie, w bazie danych PDB zdeponowano dotąd jedynie dwie struktury cząsteczek kwasów nukleinowych, do rozwiązania których użyto więzów PCS. Pierwszą z nich jest struktura dupleksu DNA w kompleksie z antybiotykiem chromomycyną A3, wiążącym się w małej bruzdzie podwójnej helisy i oddziałującym z kolei z paramagnetycznym jodem Co^{2+} .⁴¹ Drugą zaś, rozwiązana przez mnie struktura aptameru wiążącego lantanowce (praca **H3**). Ten drugi przykład stanowi pierwszy układ, dla którego udało się zmierzyć więzy PCS wywołane bezpośrednim oddziaływaniem kwasu nukleinowego z jodem metalu paramagnetycznego. To odkrycie daje nadzieję na znacznie szersze wykorzystanie efektów paramagnetycznych w badaniach NMR kwasów

nukleinowych w przyszłości, dzięki możliwości przeszczepienia zidentyfikowanego miejsca wiązania lantanowców do innych układów DNA/RNA (Rozdział 3.2).

Oddziaływania DNA/RNA-metal i ich badania metodami NMR – podsumowanie

Kwasy nukleinowe oddziałują z jonami metali w znacząco inny sposób niż układy białkowe. Oddziaływania te charakteryzują się nie tylko dość niskimi wartościami stałej wiązania, ale również często ograniczoną specyficznością – zarówno rozumianą jako selektywność względem konkretnego jonu metalu („metal-specificity”) jak i jako stopień zdefiniowania miejsca oddziaływań w przestrzeni („site-specificity”). Cechy te mogą znacząco utrudniać strukturalną oraz funkcjonalną charakterystykę zachodzących oddziaływań metodami eksperymentalnymi. Pomimo tych ograniczeń oddziaływania z jonami metali są kluczowym czynnikiem kształtującym struktury przestrzenne kwasów nukleinowych, a w przypadku układów aktywnych katalitycznie – rybozymów i DNAzymów – również ich aktywność. Badania strukturalne kompleksów kwasów nukleinowych z jonami metali metodami NMR utrudnia dodatkowo niemożliwość bezpośredniej obserwacji większości istotnych biologicznie jonów. Z tego powodu do opisu miejsc ich wiązania wykorzystuje się serię metod opartych na pomiarze wpływu ich obecności na parametry widmowe atomów należących do DNA/RNA. Badania takie często uzupełnia się również przez zastosowanie metod obliczeniowych. W przypadku struktur przestrzennych kwasów nukleinowych, których samo utworzenie jest następstwem związania jonu metalu, pierwszym i często najbardziej pracochłonnym etapem badań jest wyznaczenie samej struktury DNA/RNA.

Rozdział 2

Struktury kompleksów kwasów nukleinowych z jonami metali wyznaczone w ramach prezentowanego osiągnięcia habilitacyjnego

2.1 Prace H1 i H2 – wyznaczenie struktury przestrzennej G-kwadrupleksu r(UGGUGGU)₄ i wyjaśnienie jej związku z niezwykle stabilnością termiczną tego układu.

Zarys budowy i różnorodności konformacyjnej cząsteczek G-kwadrupleksów

G-kwadrupleksy DNA i RNA stanowią istotny biologicznie^{42,43} i w konsekwencji szeroko badany w ostatnich dziesięcioleciach typ niekanonicznych struktur kwasów nukleinowych. Są one równocześnie być może najszerzej znanym przykładem struktur DNA/RNA tworzących się dzięki specyficznemu wiązaniu jonów metali. Podstawowym elementem budującym G-kwadrupleksy są G-tetrazy, tworzące się poprzez oddziaływania wodorowe typu Hoogsteen’a pomiędzy czterema nukleozasadami guanozyny (Rysunek 2.1.1a).⁴⁴ Najprostsze G-kwadrupleksy składają się już z dwóch oddziałujących warstwowo G-tetrad. Jednak nawet te najprostsze struktury nie mogą istnieć bez

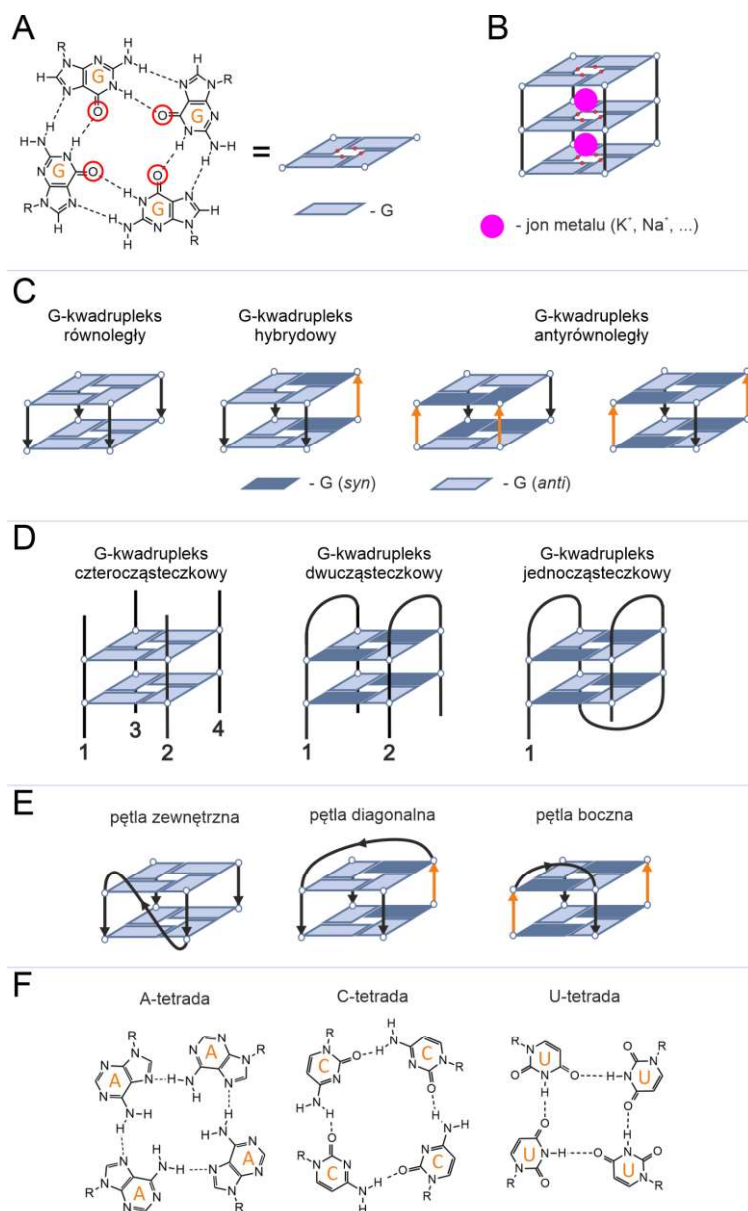
specyficznego związania jonu metalu (Rysunek 2.1.1b).⁴⁵ Wynika to z faktu, że oddziaływanie warstwowe pomiędzy dwiema G-tetradami zbliża do siebie na odległość kilku angstromów aż osiem atomów tlenu (O6) grup karbonylowych nukleozasad guanozyny. Każdy z tych atomów niesie częściowy ładunek ujemny i takie nagromadzenie niezobojętnionego ładunku prowadziłoby do silnego odpychania elektrostatycznego. Związanie jonu metalu w tzw. centralnym kanale G-kwadrupleksu, wyznaczanym właśnie przez wspomniane atomy O6, ekranuje odpychanie pomiędzy nimi i dostarcza w zamian stabilizujących strukturę oddziaływań z ładunkiem dodatnim jonu. W komórkach struktury G-kwadrupleksów stabilizowane są najczęściej jednowartościowymi jonami K^+ , które lokują się pomiędzy G-tetradami bezpośrednio koordynując wszystkie osiem atomów O6 sąsiednich tetrad.⁴⁵ Kationy o mniejszym promieniu jonowym mogą przyjmować nieco odmienne pozycje w kanale G-kwadrupleksu – na przykład jony Na^+ lokują się częściej bliżej płaszczyzny pojedynczej G-tetrady⁴⁵ – jednak zawsze wiązanie opiera się na bezpośredniej koordynacji do atomów O6 i wymaga całkowitej dehydratacji wiązanego jonu. Pomimo występowania bezpośredniej koordynacji DNA/RNA-metal miejsca wiązania tworzące się w kanałach G-kwadrupleksów charakteryzują się dość niską selektywnością i akceptują szeroką gamę jonów metali.

Bardzo istotną cechą G-kwadrupleksów jest olbrzymia różnorodność struktur przestrzennych tworzonych przez te układy.⁴⁴ Trzon G-kwadrupleksu – stos oddziałujących warstwowo G-tetrad – składa się z czterech niezależnych nici DNA/RNA, z których każda dostarcza po jednej reszcie guanozyny do poszczególnych tetrad. G-kwadrupleksy akceptują dowolne kombinacje kierunkowości tworzących je nici względem siebie (Rysunek 2.1.1c). Możemy więc wyróżnić G-kwadrupleksy równoległe (zgodna kierunkowość wszystkich nici), hybrydowe (jedna nić biegnie w przeciwnym kierunku niż pozostałe) oraz antyrównoległe (dwie nici o zgodnej kierunkowości i dwie o przeciwnej). Dodatkowo, choć w konstrukcji samego trzonu G-kwadrupleksu tworzące go cztery ciągi guanozyn (G-trakty) stanowią rzeczywiście niezależne od siebie nici, w strukturze kowalencyjnej cząsteczki DNA/RNA mogą być one połączone dodatkowymi ciągami niesparowanych reszt nukleotydowych, tworzących tzw. pętle G-kwadrupleksu. Obok G-kwadrupleksów czterocząsteczkowych, w których każda z czterech nici tworzących trzon G-kwadrupleksu stanowi rzeczywiście odrębną nić DNA/RNA, mamy więc również do czynienia z G-kwadrupleksami dwu- i jednocząsteczkowymi (Rysunek 2.1.1d). W przypadku tych ostatnich dwóch grup możemy dodatkowo wyróżnić trzy typy konformacji regionów tworzących pętle – tzw. pętlę zewnętrzną, pętlę boczną i diagonalną (Rysunek 2.1.1e). Te niezależne od siebie, liczne stopnie swobody, prowadzą do sytuacji, w której nawet ograniczając się do G-kwadrupleksów jednoniciowych możemy wyodrębnić aż 26 różnych topologii kanonicznych G-kwadrupleksów.⁴⁴ Ta niezwykła mnogość struktur G-kwadrupleksów sprawia, że pomimo ponad trzech dekad intensywnych badań oraz wyznaczenia ponad pięciuset struktur z wysoką rozdzielczością, nadal niemożliwe pozostaje przewidzenie na podstawie znanej sekwencji oligonukleotydu, w którą z licznych struktur G-kwadrupleksów zwinie się on w roztworze.

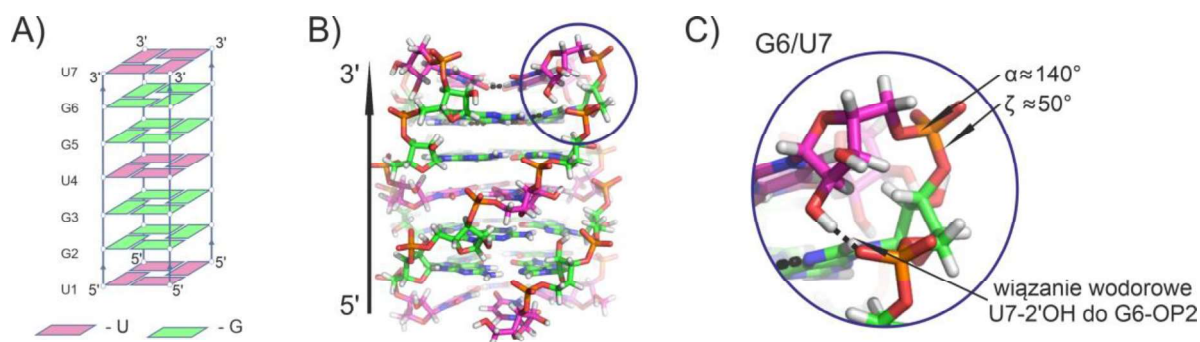
Cechy szczególne G-kwadrupleksów RNA i tetrady nieguaninowe

Z pozoru blahym szczegółem struktur wszystkich topologii G-kwadrupleksów, z wyjątkiem topologii równoległej, jest obecność reszt guanozyny przyjmujących konformację *syn* wokół wiązania glikozydowego.⁴⁶ Fakt ten ma jednak kluczowe znaczenie dla struktur kwadrupleksów RNA, gdyż dla tego typu biopolimeru konformacje *syn* nukleotydów purynowych są wysoce niekorzystne energetycznie. W konsekwencji dla G-kwadrupleksów RNA, niezależnie od cząsteczkowości, eksperymentalnie obserwowana jest prawie wyłącznie topologia równoległa.^{47,48} Nie oznacza to jednak, że układy te nie wykazują się różnorodnością konformacyjną. Nukleozasady inne niż guanozyny nie tworzą wystarczająco stabilnych homo-tetrad, aby mogły stać się podstawowym elementem budulcowym struktur czteroniciowych DNA lub RNA (potencjalnych A-, C- lub U-kwadrupleksów). Tym niemniej, tetrady tego typu były obserwowane w serii cząsteczek DNA i RNA, w których stabilny trzon G-kwadrupleksowy odpowiednio zbliżył do siebie cztery kopie odpowiedniej zasady. Takie A-,⁴⁹ C-,⁵⁰ T-⁵¹ oraz U-tetrady⁵² stanowią dodatkowy element budulcowy charakterystyczny dla G-kwadrupleksów (Rysunek 2.1.1f), dodatkowo zwiększający stopień różnorodności strukturalnej tych układów oraz niekiedy zapewniający im niespodziewane właściwości fizyczne. Istotnym przykładem G-kwadrupleksu RNA, którego właściwości kształtowane są w znacznym stopniu przez obecność U-tetrad jest badany przeze mnie (prace **H1** i **H2**) czterocząsteczkowy kwadrupleks r(UGGUGGU)₄. Studia nad właściwościami tego układu rozpoczęły się w grupie Pani prof. dr hab. Zofii Gdaniec w IChB PAN jeszcze przed moim dołączeniem do jej zespołu w styczniu 2017 roku i biorą swój początek w badaniach zdolności powtórzeń trzynukleotydowych typu AGG, CGG oraz UGG do tworzenia struktur G-kwadrupleksowych.⁵³ Początkowe badania metodami NMR, wsparte analizą widm masowych, wykazały zdolność cząsteczki rUGGUGGU do tworzenia w obecności jonów K⁺ oraz Na⁺ czterocząsteczkowego G-kwadrupleksu zawierającego w swojej strukturze aż trzy U-tetrady (Rysunek 2.1.2a).⁵³ Dodatkowo badania za pomocą metod spektroskopii UV ujawniły bardzo wysoką stabilność termiczną tego układu. Co ciekawe, w okolicach centralnej oraz 3'-końcowej U-tetrady, zaobserwowano serię niespodziewanych kontaktów NOE pomiędzy atomami, sugerujących występowanie w tych rejonach nietypowych konformacji szkieletu RNA. Natura tych atypowych konformacji oraz ich potencjalny związek ze stabilnością układu pozostawały tajemnicą.

Rysunek 2.1.1. Budowa i różnorodność strukturalna cząsteczek G-kwadrupleksów. A) struktura chemiczna G-tetrazy z zaznaczonymi na czerwono atomami tlenu O6 grup karbonylowych, B) schemat budowy trzonu G-kwadrupleksu z zaznaczeniem związanych jonów metali, C) kierunkowość nici w G-kwadrupleksach, D) cząsteczkowość G-kwadrupleksów, E) typy pętli w G-kwadrupleksach, F) struktury chemiczne tetrad nieguaninowych.



Rysunek 2.1.2 Struktura G-kwadrupleksu $r(\text{UGGUGGU})_4$ A) Struktura drugorzędowa wyznaczona w ref. 53, B) struktura przestrzenna, C) wiązania wodorowe pomiędzy grupą 2'OH końcowej urydyny a grupą fosforanową. Rysunek zawiera elementy Figury 1 z pracy **H1**.



Wyznaczenie struktury G-kwadrupleksu $r(\text{UGGUGGU})_4$

Pierwszym zadaniem jakimś podjąłem się po dołączeniu do zespołu prof. dr hab. Zofii Gdaniec było wyznaczenie struktury przestrzennej G-kwadrupleksu $r(\text{UGGUGGU})_4$ z wysoką rozdzielczością przy użyciu danych NMR zmierzonych w obecności jonów potasu K^+ . Ponieważ nie miałem jeszcze wypracowanych sprawdzonych procedur i schematów ekstrakcji więzów strukturalnych z widm NMR, prowadzenia obliczeń strukturalnych czy też analizy otrzymanych struktur, wszystkie te procedury wypracowałem w toku wyznaczania struktury kwadrupleksu $r(\text{UGGUGGU})_4$. W obliczeniach strukturalnych posługiwałem się klasycznymi więzami odległościowymi NOE oraz na kąty dwuścienne. W przypadku obliczeń strukturalnych dla każdego nowego układu należy upewnić się, że stosowany schemat obliczeń zapewnia odpowiednio szeroki zakres próbkowania przestrzeni konformacyjnej badanej biomolekuły oraz że pozwala na relatywnie proste pokonywanie barier pomiędzy poszczególnymi minimami lokalnymi, w celu zapewnienia szansy na znalezienie minimum globalnego - finalnej struktury NMR. W przypadku G-kwadrupleksu $r(\text{UGGUGGU})_4$, poważne utrudnienie w obliczeniach strukturalnych stanowił fakt czterokrotnej degeneracji wszystkich obserwowanych częstotliwości rezonansowych, spowodowany symetrią powstającą struktury. Oznacza to, że dla każdego wyekstrahowanego z widm kontaktu NOE niemożliwe było ustalenie czy odpowiada za niego bliskość dwóch atomów należących do jednej nici RNA czy też kontakt z jedną z pozostałych trzech nici, a może suma obu czynników. Z tego powodu wszystkie więzy NOE traktowałem w obliczeniach jako tzw. więzy niejednoznaczne (ang. “ambiguous restraints”), które mogą być spełnione na więcej niż jeden sposób. Po żmudnej optymalizacji procesu prowadzenia obliczeń zdecydowałem się na dwustopniową procedurę, opisaną ze szczegółami w pracy **H1**. W ogólnym schemacie opierała się ona na pierwotnym znalezieniu przybliżonej struktury wychodząc z przypadkowej konformacji RNA i stosując uproszczone pole siłowe do opisu struktury kowalencyjnej i elektrostatyki układu oraz późniejszym powtórzeniu

obliczeń używając przybliżonej struktury jako punktu startowego oraz bardziej zaawansowanego pola siłowego w celu właściwego uchwycenia lokalnych szczegółów geometrii układu. Procedura ta pozwoliła na uzyskanie dobrze zdefiniowanej wiązki struktur NMR, którą zdeponowałem w bazie danych PDB, pod kodem dostępu 6GE1 (Rysunek 2.1.2b).

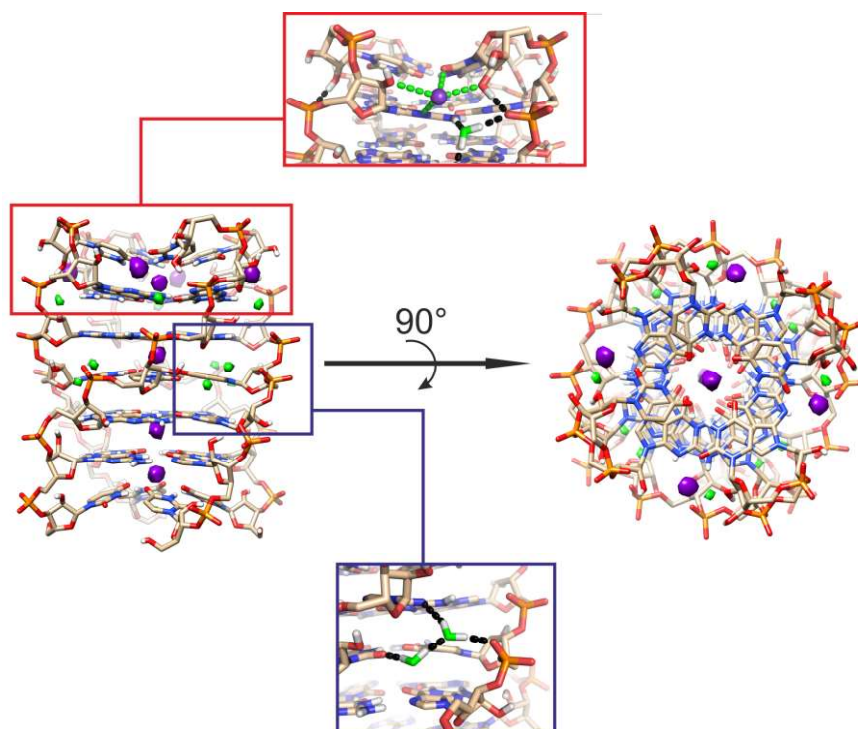
G-kwadrupleks $r(UGGUGGU)_4$ zawiera motyw strukturalny odwróconej U-tetrady

Wyznaczona struktura wykazała obecność nietypowych wartości kątów dwuściennych szkieletu cukrowo-fosforanowego w okolicach centralnej U-tetrady, lecz najbardziej niespodziewaną jej cechą była konformacja 3'-końcowego rejonu cząsteczki. W rozwiązanej strukturze zaobserwowałem gwałtowny zwrot szkieletu cukrowo-fosforanowego o prawie 180 stopni tuż przed ostatnią resztą urydyny (Rysunek 2.1.2b). Konformacja ta odwraca kierunkowość (tożsamość donorów i akceptorów wiązań wodorowych) ostatniej U-tetrady w stosunku do pozostałych tetrad w G-kwadrupleksie oraz zupełnie zmienia geometrię oddziaływań warstwowych 3'-końcowych urydyn z poprzedzającymi je resztami guanozyny. Tę nietypową konformację nazwałem “odwróconą U-tetradą” (ang. “reversed U-tetrad”). Jako najbardziej wyróżniający się element struktury wydała się ona prawdopodobnym źródłem nietypowo wysokiej stabilności badanego układu. Wiedziony tym przypuszczeniem dokonałem kwerendy literaturowej danych dotyczących G-kwadrupleksów zakończonych 3'-końcową U-tetradą. Ujawniła ona, że podobne “odwrócone U-tetrazy” były już obserwowane w strukturach krystalograficznych,⁵⁴ lecz ich właściwości nigdy nie były szerzej dyskutowane, być może uważano, że tak nietypowa konformacja peryferyjnej reszty nukleotydowej może być jedynie następstwem sił upakowania w kryształach. Natrafiłem również na serię artykułów nie zawierających danych strukturalnych, lecz wskazujących, że obecność 3'-końcowej reszty urydyny w czteroniciowych kwadrupleksach RNA zwiększa ich stabilność termiczną o nawet 30 °C.^{55,56}

Dane te skłoniły mnie do głębszej analizy motywu “odwróconej U-tetrady” w poszukiwaniu konkretnych oddziaływań mogących tak znacząco stabilizować tę konformację. Pierwszym kandydatem było prawdopodobne tworzenie się dodatkowego wiązania wodorowego pomiędzy grupą 2'OH końcowej urydyny a grupą fosforanową poprzedzającą ją guanozyny (G-1), możliwe dzięki zawinięciu szkieletu cukrowo-fosforanowego towarzyszącemu tworzeniu się “odwróconej U-tetrady” (Rysunek 2.1.2c). Zaangażowanie grupy 2'OH w wiązanie wodorowe sugerowała już na wczesnym etapie badań jej wysoka odporność na wymianę z rozpuszczalnikiem obserwowana w widmach NMR, jednak dopiero wyznaczenie detali struktury trójwymiarowej pozwoliło zaproponować grupę fosforanową jako akceptor tego wiązania wodorowego. W pogłębiającej analizę właściwości “odwróconej U-tetrady” pracy **H2** udało mi się uzyskać bezpośrednie potwierdzenie eksperymentalne obecności tego wiązania wodorowego, dzięki obserwacji sprzężenia skalarnego protonu grupy 2'OH z atomem fosforu odpowiedniej reszty fosforanowej. Jednakże na etapie zbierania danych do pracy **H1**

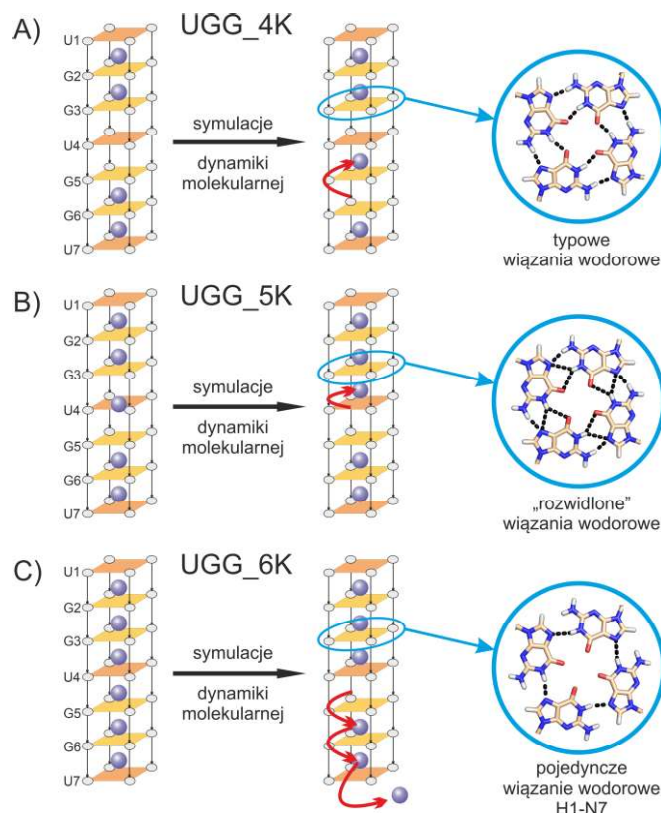
nie dysponowałem jeszcze tą informacją, dlatego też stabilne tworzenie tego wiązania wodorowego oraz potencjalną obecność innych czynników stabilizujących “odwróconą U-tetradę”, jak na przykład nietypowa struktura hydratacyjna, postanowiłem zbadać za pomocą symulacji dynamiki molekularnej (MD) z wykorzystaniem nieciągłego modelu rozpuszczalnika. Ten aspekt badań prowadziłem we współpracy z dr Joanną Sarzyńską, której specjalizacją naukową są symulacje MD kwasów nukleinowych. We wszystkich przeprowadzonych symulacjach, trwających łącznie 6 μ s, spodziewane wiązanie wodorowe jest obecne przez praktycznie cały okres symulacji. Analiza uzyskanych trajektorii ujawniła również tworzenie stabilnej struktury hydratacyjnej, jednak w okolicach centralnej U-tetrazy, nie zaś 3’-końcowej (Rysunek 2.1.3). Zamiast tego zasugerowała istnienie w strukturze “odwróconej U-tetrazy” dodatkowego miejsca wiązania jonu K^+ , poza centralnym kanałem G-kwadrupleksu (Rysunek 2.1.3). Jon ten miałby wiązać się w bruzdzie G-kwadrupleksu i bezpośrednio koordynować aż cztery atomy w strukturze RNA. Miejsce to byłoby również, według wyników symulacji, przynajmniej do pewnego stopnia selektywne, gdyż nie zaobserwowałem jego wypełniania w trajektorii uzyskanej w obecności jonu Na^+ . Na podstawie tych wyników, w pracy **H1** zaproponowałem obecność czterech dodatkowych wiązań wodorowych oraz miejsc wiązania jonu potasu (po jednym na każdą nić RNA wchodzącą w skład G-kwadrupleksu) w strukturze “odwróconej U-tetrazy” jako czynników potencjalnie odpowiedzialnych za stabilizujący wpływ tego elementu strukturalnego na zawierające go G-kwadrupleksy.

Rysunek 2.1.3. Pozycje przyjmowane preferencyjnie przez jony K^+ (fioletowe) oraz atomy tlenu cząsteczek wody (zielone) w symulacjach dynamiki molekularnej G-kwadrupleksu r(UGGUGGU)₄. Rysunek jest kopią Figury 4 z pracy **H1**.



Obok pogłębionej analizy cech “odwróconej U-tetrady”, drugą motywacją do przeprowadzenia symulacji MD G-kwadrupleksu $r(\text{UGGUGGU})_4$ było zbadanie wpływu obecności w jego strukturze aż trzech U-tetrad na wiązanie jonów metalu w centralnym kanale. G-kwadrupleks składający się z siedmiu kolejnych G-tetrad powinien teoretycznie wiązać aż 6 kationów K^+ . Jednakże mniejszy rozmiar U-tetrady powoduje zwężenie centralnego kanału w jej okolicy, co może prowadzić do niemożliwości przyjęcia tak wielu jonów przez cząsteczkę $r(\text{UGGUGGU})_4$. Z powodu zaangażowania jonów K^+ wiążących się w kanale w sam proces układania się struktury G-kwadrupleksu, charakterystyka tego oddziaływania metodami NMR jest bardzo utrudniona (co przedyskutuję dalej w Rozdziale 3.1). Trudnością w zastosowaniu metod obliczeniowych do tego celu jest natomiast wysoka inertywność jonów związanych w kanale, co uniemożliwia uzyskanie zbieżności symulacji w aspekcie ustalenia ich właściwości równowagowych. Tym niemniej przeprowadzenie serii symulacji zawierających oryginalnie cztery, pięć oraz sześć jonów K^+ w kanale pozwoliło mi stwierdzić, że najprawdopodobniejszą sytuacją jest obecność w kanale G-kwadrupleksu czterech jonów K^+ . W pozostałych symulacjach bowiem albo jeden z jonów był usuwany z kanału podczas dynamiki albo też obserwowane były znaczące zaburzenia geometrii wiązań wodorowych w G-tetradach (Rysunek 2.1.4).

Rysunek 2.1.4. Obserwowane w symulacjach dynamiki molekularnej zachowanie jonów K^+ w centralnym kanale G-kwadrupleksu $r(\text{UGGUGGU})_4$. Symulacje przeprowadzone z czterema (A), pięcioma (B) lub sześcioma (C) jonami K^+ obecnymi oryginalnie w kanale G-kwadrupleksu. Rysunek jest kopią Figury 3 z pracy **H1**.

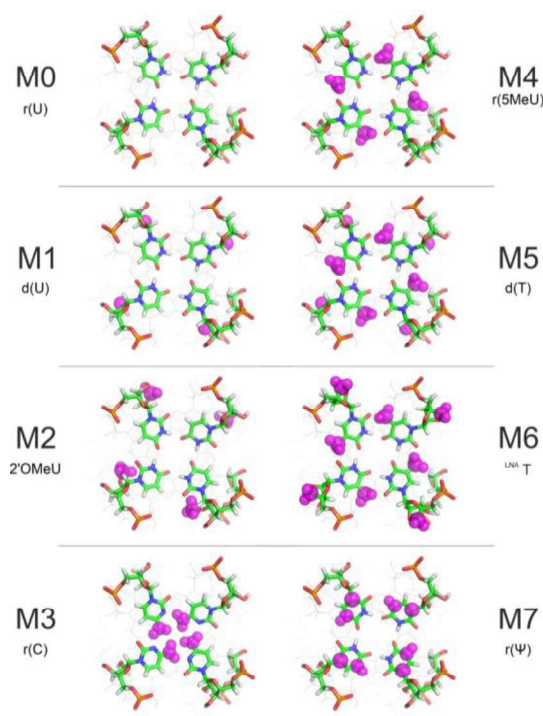


Eksperymentalna ocena źródeł stabilności motywu odwróconej U-tetrady

Temat związku cech strukturalnych motywu “odwróconej U-tetrady” z jego stabilizującym wpływem na struktury G-kwadrupleksów podjąłem ponownie w pracy **H2**. W tej pracy przetestowane eksperymentalnie zostały przyczynki do efektu stabilizującego pochodzące od zaproponowanych wcześniej źródeł - dodatkowych wiązań wodorowych i obecności jonów K^+ w bruzdach kwadrupleksu - jak również od serii innych potencjalnych czynników, takich jak sprzyjające oddziaływania warstwowe czy dopasowanie steryczne. W tym celu do struktury badanego G-kwadrupleksu wprowadzono serię precyzyjnie dobranych modyfikacji chemicznych, których zadaniem było selektywne wpływanie na wybrane spośród wymienionych powyżej czynników. Tak więc, na przykład, poprzez zastąpienie 3'-końcowej reszty (rybo)urydyny jej odpowiednikiem z serii deoksy- spodziewaliśmy się selektywnie usunąć wiązania wodorowe grup 2'OH do reszt fosforanowych, bez zaburzania oddziaływań warstwowych czy też wiązań wodorowych tworzących samą U-tetradę. Serię wprowadzonych na 3'-końcu modyfikacji ilustruje (Rysunek 2.1.5). Analiza efektów wprowadzenia każdej z modyfikacji koncentrowała się na dwóch płaszczyznach: strukturalnej (czy obecność danej modyfikacji wpływa na konformację 3'-końcowej części G-kwadrupleksu) oraz termodynamicznej (jak zmienia się stabilność termiczna zmodyfikowanego układu). W ramach części strukturalnej mój wkład eksperymentalny koncentrował się na analizie właściwości wszystkich modyfikowanych oligomerów metodami NMR. Dokonałem również pomiaru oraz analizy widm dichroizmu kołowego (CD) dla wszystkich badanych układów, w celu sprawdzenia czy motyw “odwróconej U-tetrady” posiada charakterystyczny “*fingerprint*” widmowy w spektroskopii CD. Analiz metodami NMR oraz CD każdego z układów dokonałem dwukrotnie - w obecności jonów K^+ oraz Na^+ - uzyskując bardzo zbliżone wyniki. Świadczyło to o braku wpływu typu wiązanego kationu metalu na właściwości konformacyjne badanych układów. Równolegle współautorka pracy **H2**, dr Karolina Zielińska, dokonała pomiarów temperatur topienia poszczególnych układów za pomocą spektroskopii UV. Zbiorcza analiza uzyskanych wyników pozwoliła wyodrębnić czynniki odpowiedzialne za stabilność motywu “odwróconej U-tetrady”. Na przykład, dla modyfikacji deoksyU (M1 na Rysunku 2.1.5) analiza strukturalna wykazała obecność niezaburzonej konformacji “odwróconej U-tetrady”, podczas gdy dane UV ujawniły obniżenie stabilności termicznej układu o około 10 °C. Ten sam efekt był obserwowany zarówno w obecności jonów K^+ jak i Na^+ . Wprowadzenie modyfikacji deoksyU selektywnie usuwa ze struktury “odwróconej U-tetrady” cztery wiązania wodorowe tworzone przez grupy 2'OH, dlatego też obserwowane obniżenie temperatury topnienia układu zinterpretowaliśmy jako dowód, że te oddziaływania wodorowe stanowią istotny czynnik stabilizujący odwróconą tetradę. Wniosek ten nie był z początku oczywisty, gdyż atomy tlenu O2' reszt urydyny stanowią również jeden z czterech bezpośrednich ligandów jonu K^+ w obserwowanym w symulacjach MD miejscu wiązania w bruzdzie G-kwadrupleksu. Ich usunięcie może więc również zaburzać interakcje jonu metalu z tym miejscem. Istotny wpływ tego czynnika został jednak wykluczony dzięki obserwacji, że

destabilizujący wpływ modyfikacji deoksyU jest niezależny od tego czy obecny jest jon K^+ czy też Na^+ . Na podstawie tej obserwacji wyciągnęliśmy wniosek, że wiązanie jonów K^+ w bruzdach G-kwadrupleksu ma znikomy wpływ na jego stabilność termiczną, wbrew wcześniejszym przypuszczeniom. Analiza strukturalna pozostałych modyfikowanych oligomerów wykazała, że tworzenie “odwróconej U-tetrady” jest bardzo wrażliwe na obecność wszelkich czynników powodujących dodatkowe stłoczenie steryczne w jej bliskości oraz, że potencjalnie drugim istotnym elementem odpowiedzialnym za jej wysoką stabilność są korzystniejsze oddziaływania warstwowe niż te występujące dla konwencjonalnych geometrii oddziaływań sąsiednich tetrad. Z tezą tą zgodne były również wyniki dodatkowych analiz *in silico* za pomocą metody MM-GBSA. Porównywały one energetykę G-kwadrupleksu $r(UGGUGGU)_4$ zawierającego natywną “odwróconą U-tetradę” oraz jego hipotetycznej konformacji zawierającej “standardową” U-tetradę i największe obserwowane różnice dotyczyły rzeczywiście członu związanego z oddziaływaniami warstwowymi.

Rysunek 2.1.5. Zestaw modyfikacji chemicznych wprowadzonych do 3'-końcowej reszty nukleotydowej kanale G-kwadrupleksu $r(UGGUGGU)_4$ w celu zrozumienia źródeł stabilności termicznej motywu „odwróconej U-tetrady”.. Rysunek jest kopią Figury 2 z pracy **H2**.



Badania G-kwadrupleksu $r(UGGUGGU)_4$ i motywu odwróconej U-tetrady – podsumowanie

W pracach **H1** i **H2** zaproponowałem wyjaśnienie niespodziewanie silnego efektu stabilizacji termicznej czterocząsteczkowych G-kwadrupleksów RNA, związanego z obecnością w ich strukturach 3'-końcowej reszty urydyny. Wykazałem, że układy takie tworzą motyw strukturalny nazwany przeze mnie “odwróconą U-tetradą” oraz że istotnymi źródłami jego stabilności są dodatkowe wiązania wodorowe tworzone przez grupy 2'-OH oraz korzystna geometria oddziaływań warstwowych

między terminalnymi tetradami. W toku badań zasugerowałem też tworzenie dodatkowego miejsca wiązanie jonu K^+ w bruzdzie G-kwadrupleksu, lecz obecność tego elementu struktury obserwowałem jedynie *in silico* i nie została ona dotąd potwierdzona eksperymentalnie (Rozdział 3.1).

2.2 Praca H3 – wyznaczenie struktury przestrzennej aptameru wiążącego lantanowce (LnA) z wykorzystaniem więzów paramagnetycznych PCS

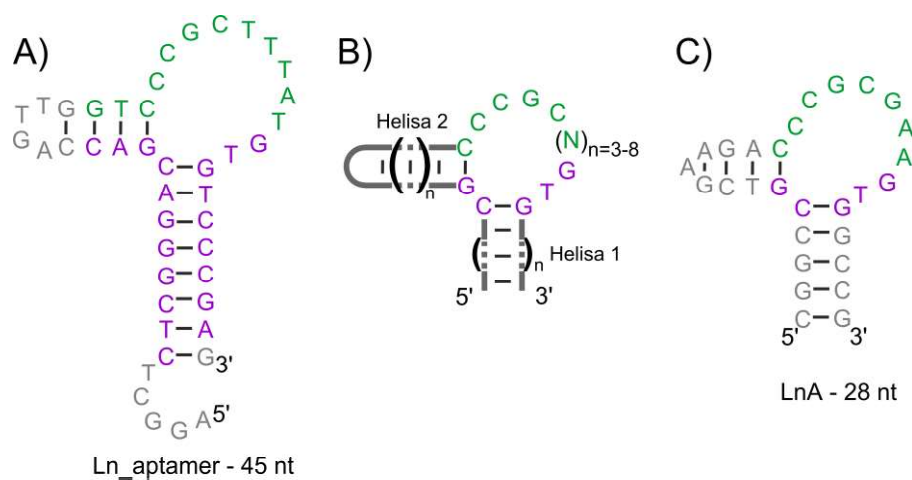
Cząsteczki kwasów nukleinowych wiążące jony lantanowców a metody paramagnetycznego NMR

Istotnym źródłem mojego zainteresowania cząsteczkami kwasów nukleinowych zdolnymi do silnego i specyficznego wiązania jonów metali jest chęć wykorzystania takich układów do rozszerzenia zdolności badawczych biomolekularnej spektroskopii NMR. Jak opisywałem już w Rozdziale 1, istotnym ograniczeniem klasycznych więzów strukturalnych NMR jest ich lokalny charakter, negatywnie wpływający na dokładność i precyzję wyznaczania globalnych parametrów strukturalnych skomplikowanych struktur DNA/RNA.²⁹ Rozwiązaniem tego problemu jest zastosowanie dalekozasięgowych więzów NMR – RDC, PCS, PRE – jednak, dostęp do nich w badaniach kwasów nukleinowych pozostaje ograniczony. Brak w szczególności metod indukowania dla tych układów efektu PCS, którego obserwacja wymaga sztywnego przytwierdzenia jonu metalu o właściwościach paramagnetycznych charakteryzującego się $\Delta\chi \neq 0$ do badanej cząsteczki.³² Najbardziej wartościowym źródłem więzów PCS w układach białkowych są jony z grupy lantanowców, które dzięki zbliżonym właściwościom chemicznym oddziałują zazwyczaj wszystkie z jednym miejscem wiązania, pozwalając na rejestrację kilku zestawów komplementarnych więzów PCS. Z uwagi na dyskutowane w Rozdziale 1 ograniczone powinowactwo kwasów nukleinowych do jonów metali oraz często gorzej zdefiniowaną geometrię oddziaływań, dla tych biopolimerów nie udało się do tej pory zidentyfikować motywu strukturalnego wiążącego jony lantanowców, który byłby zdolny do wywoływania silnych efektów PCS, użytecznych jako więzy strukturalne. Z tego też powodu zainteresowałem się odkrytym w 2016 roku aptamerem DNA wiążącym lantanowce²⁶ z submikromolowym powinowactwem oraz serią cząsteczek DNAzymów aktywnych w obecności jonów lantanowców²⁴ i postanowiłem zbadać obecne w nich miejsca oddziaływań. Tematyka ta – wykorzystanie wiązania jonów lantanowców przez specyficzne motywy strukturalne DNA do indukowania efektów paramagnetycznych spektroskopii NMR - nie była wcześniej realizowana w jednostce, w której jestem zatrudniony. Stanowi ona mój własny pomysł badawczy, na którego realizację zdobyłem finansowanie w ramach programu NCN OPUS19 (grant zatytułowany “Oligonukleotydy wiążące lantanowce (OWL) jako znaczniki paramagnetyczne w spektroskopii NMR kwasów nukleinowych”). Praca **H3** prezentuje wyniki badań nad strukturą aptameru wiążącego lantanowce oraz geometrią obecnego w nim miejsca oddziaływań. Wykazuję w niej również wysoką wartość indukowanych w tym układzie efektów PCS jako więzów strukturalnych.

Wyznaczenie struktury LnA z wykorzystaniem więzów paramagnetycznych

Przed rozpoczęciem dyskusji uzyskanych wyników istotne jest zaznaczenie, że prawie wszystkie znane cząsteczki aptamerów oraz DNAzymów identyfikowane są tzw. metodą SELEX (skrót od ang. “*Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*”),⁵⁷ znaną również jako selekcja *in vitro* (ang. “*in vitro selection*”).⁵⁸ Metoda ta pozwala na wyselekcjonowanie, z szerokiej puli cząsteczek DNA lub RNA o przypadkowych sekwencjach nukleotydów, motywów sekwencyjnych oddziałujących z wybranym celem molekularnym. Nie dostarcza ona jednak bezpośrednio żadnych informacji o strukturze przyjmowanej przez zidentyfikowane aptamery czy też o geometrii, a nawet położeniu miejsca oddziaływań. Wstępnych, przybliżonych danych może dostarczyć analiza zmienności sekwencyjnej wyselekcjonowanych cząsteczek DNA/RNA, jednak poznanie struktury przestrzennej aptameru i geometrii jego kompleksu z wiązanym celem molekularnym wymaga badań za pomocą jednej z wysokorozdzielczych metod biologii strukturalnej.

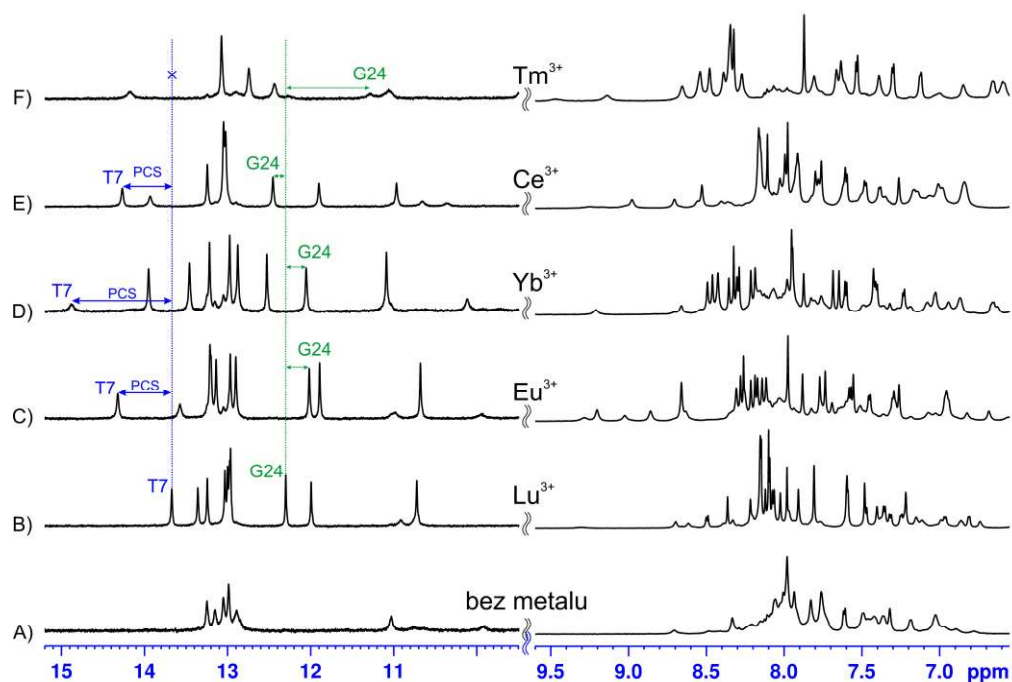
Rysunek 2.2.1. Struktura drugorzędowa aptameru wiążącego jony lantanowców. A) konstrukt stworzony w oryginalnej publikacji – „Ln_aptamer”²⁶, B) zachowawczość reszt nukleotydowych pomiędzy wariantami aptameru otrzymanymi metodą SELEX, C) konstrukt zoptymalizowany do badań NMR – „LnA”. Oznaczenia kolorów reszt: fioletowe – region stały w eksperymencie SELEX, zielone – region zmienny eksperymencie SELEX, szare – region dodane po eksperymencie SELEX. Rysunek zawiera elementy Figury 1 z pracy **H3**.



W przypadku aptameru wiążącego lantanowce, wstępna analiza wybranych metodą SELEX sekwencji, przeprowadzona przez autorów tego eksperymentu, pozwoliła stworzyć konstrukt aptameru o długości 45 jednostek nukleotydowych (nt) oraz zaproponować dla niego strukturę drugorzędową przedstawioną na Rysunku 2.2.1a.²⁶ Wysoka zachowawczość niektórych reszt w rejonie pętli łączącej elementy helikalne (Rysunek 2.2.1b) pozwoliła wskazać ten rejon struktury, jako potencjalne miejsce wiązania jonu metalu,²⁶ lecz bez sugerowania żadnych szczegółów zachodzących oddziaływań. Przed rozpoczęciem głębszych badań strukturalnych tego układu metodami NMR zdecydowałem się na próbę dalszej optymalizacji sekwencji aptameru, mającą na celu uzyskanie znacznie skróconego jego

wariantu ułatwiającego analizę NMR. Zaprojektowałem serię krótszych wariantów aptameru i dla każdego z nich oceniłem zdolność oddziaływania z jonami lantanowców za pomocą metod spektroskopii UV i CD. Było to możliwe dzięki temu, że wiązanie lantanowca wywołuje silne zmiany zarówno struktury jak i stabilności termicznej cząsteczki aptameru, obserwowalne za pomocą wymienionych technik. Tym sposobem udało mi się uzyskać konstrukt oznaczony odąd skrótem LnA o długości 28 nt (Rysunek 2.2.1c) i niezaburzonej stałej wiązania jonu lantanowca ($K_d \approx 0.3 \mu\text{M}$).

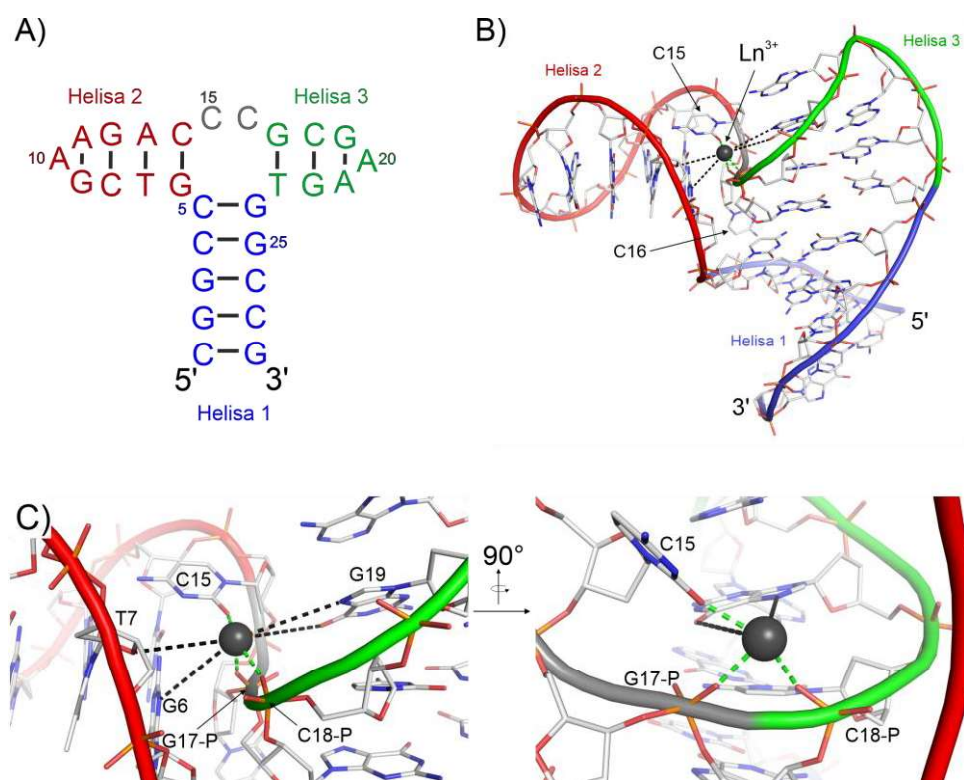
Rysunek 2.2.2. Rejony protonów iminowych i aromatycznych widma ^1H NMR cząsteczki LnA. A) pod nieobecność jonu lantanowca oraz w obecności 1 ekwiwalenta: B) Lu^{3+} , C) Eu^{3+} , D) Yb^{3+} , E) Ce^{3+} F) Tm^{3+} . Rysunek jest kopią Figury 2 z pracy **H3**.



Już wstępna analiza widm ^1H NMR tego układu wykazała tworzenie szeregu nowych par zasad w odpowiedzi na obecność jonu diamagnetycznego lantanowca – lutetu Lu^{3+} (Rysunek 2.2.2a vs b). Miareczkowanie LnA serią innych – paramagnetycznych – lantanowców pozwoliło na zaobserwowanie silnych przesunięć sygnałów w stosunku do próbki diamagnetycznej, które po przypisaniu widm można przełożyć na więzy strukturalne PCS (Rysunek 2.2.2b-f). Już przypisanie częstotliwości rezonansowych protonów iminowych pozwoliło na identyfikację jednego z nowych elementów strukturalnych tworzących się po związaniu jonu metalu. Mianowicie obserwacja pary zasad typu *wobble* pomiędzy resztami G17 i T23 oraz dodatkowej pary zasad GC sąsiadującej z nią w przestrzeni wykazała ustrukturyzowanie się znacznej części rejonu pętli w trzeci, krótki element helikalny (Helisa 3, rys. Rysunek 2.2.3a). W celu wyznaczenia wzajemnej orientacji trzech elementów helikalnych w przestrzeni, a więc struktury trzeciorzędowej aptameru, dokonałem pełnego przypisania częstotliwości rezonansowych, wyznaczyłem więzy strukturalne NOE i PCS i wykonałem symulacje

dynamiki molekularnej ograniczonej tymi więzami. W pierwszym etapie wyznaczyłem wstępnie strukturę trójwymiarową używając jedynie więzów klasycznych (NOE i na kąty dwuścienne). Następnie zaś wykorzystałem uzyskaną strukturę do przybliżonego wyznaczenia pozycji jonu metalu za pomocą danych PCS. W drugim etapie udokładniałem już strukturę całego kompleksu używając zarówno więzów klasycznych jak i PCS, wrażliwych na położenie każdego z atomów w cząsteczce DNA w układzie odniesienia jonu metalu. W celu przeprowadzenia symulacji ograniczonych więzami PCS musiałem również dokonać edycji kodu źródłowego programu AMBER18 w celu właściwego opisu tych efektów w symulacjach. Wykonane obliczenia pozwoliły mi wyznaczyć strukturę LnA w kompleksie z jonami lantanowców (Rysunek 2.2.3b), którą zdeponowałem w bazie PDB pod kodem dostępu 7QB3.

Rysunek 2.2.3. Struktura aptameru LnA indukowana wiązaniem jonów lantanowców. A) Rzeczywista struktura drugorzędowa, B) struktura przestrzenna, C) miejsce wiązania jonu lantanowca. Na panelu C zielone linie ilustrują bezpośrednie kontakty DNA-metal, zaś czarne odległości DNA-metal odpowiednie dla oddziaływań w zewnętrznej sferze koordynacyjnej. Rysunek stanowi kompilację elementów Figur 3, 4 i 5 z pracy **H3**.



Cechy struktury trzeciorzędowej LnA i miejsca wiązania jonów lantanowców

LnA przyjmuje sztywną strukturę trzeciorzędową utworzoną poprzez oddziaływanie współosiowe Helis 1 i 3 (Rysunek 2.2.3b). Helisa 2 zakotwicza się natomiast w przybliżeniu pod kątem prostym do pozostałych. Taka aranżacja elementów helikalnych prowadzi do “zakleszczenia”

fragmentu szkieletu fosforanowego (zazwyczaj skierowanego w stronę roztworu) pomiędzy helisami 2 i 3. Co istotne, w zdeponowanej w PDB strukturze obecny jest również związany jon lantanowca, gdyż jego pozycja została bezpośrednio wyznaczona eksperymentalnie za pomocą więzów PCS. Jon lantanowca oddziałuje bezpośrednio z trzema grupami należącymi do cząsteczki DNA – atomem O2 niesparowanej reszty cytydyny C16 lokującej się w małej bruździe helisy 2 oraz dwoma grupami fosforanowymi należącymi do “zakleszczonego” fragmentu szkieletu (Rysunek 2.2.3c). Za utworzenie kieszeni zawierającej te trzy grupy w odpowiedniej bliskości odpowiedzialna jest aranżacja trzeciorzędowa układu. Obserwacja trzech bezpośrednich oddziaływań koordynacyjnych DNA-metal sugeruje, że związany jon pozostaje częściowo hydratowany gdyż jony lantanowców przyjmują zazwyczaj liczby koordynacyjne z zakresu 7-9. W celu zbadania czy koordynujące związany jon cząsteczki wody tworzą dodatkowe oddziaływania z DNA wykonałem i przeanalizowałem serię symulacji dynamiki z nieciągłym modelem rozpuszczalnika. Zasugerowały one istnienie skomplikowanej sieci wiązań wodorowych pomiędzy cząsteczkami wody w pierwszej sferze koordynacyjnej lantanowca, a atomami elektryczniejemnymi należącymi do cząsteczki DNA. Uwzględniając te obserwowane w symulacjach oddziaływania, aż dziewięć atomów należących do DNA wydaje się zaangażowanych w wiązanie jonu lantanowca – trzy poprzez bezpośrednią koordynację oraz sześć przez wiązania wodorowe – co oznacza, że mamy do czynienia z miejscem wiązania o wysokiej złożoności.

Charakterystyka strukturalna miejsca wiązania jonów metali, specyficznego dla jonów lantanowców^{N1} jest istotna z punktu widzenia badań nad źródłami specyficzności w oddziaływaniach DNA-metal. Jednak samo poznanie detali strukturalnych danego miejsca oddziaływań stanowi jedynie punkt wyjścia do próby wyjaśnienia, w jaki sposób determinują one jego właściwości fizyczne – w tym wypadku selektywność. W przypadku miejsca wiązania jonów lantanowców obecnego w aptamerze LnA, bezpośrednie oddziaływania z jonem metalu tworzą dwie grupy fosforanowe oraz grupa karbonylowa należąca do reszty cytydyny. Grupy fosforanowe, z uwagi na niesiony przez nie ładunek ujemny, należą do najbardziej pospolitych ligandów jonów metali oddziałujących z cząsteczkami kwasów nukleinowych.⁴ Z drugiej strony cytozyna jest jedyną wolną nukleozasadą, do której wiążą się jony lantanowców.⁵⁹ Dlatego też w pracy **H3** sugeruję, że za obserwowaną specyficznością oddziaływań może stać właśnie obecność nukleozasady reszty cytydyny jako jednego z trzech bezpośrednich ligandów związanego jonu metalu.

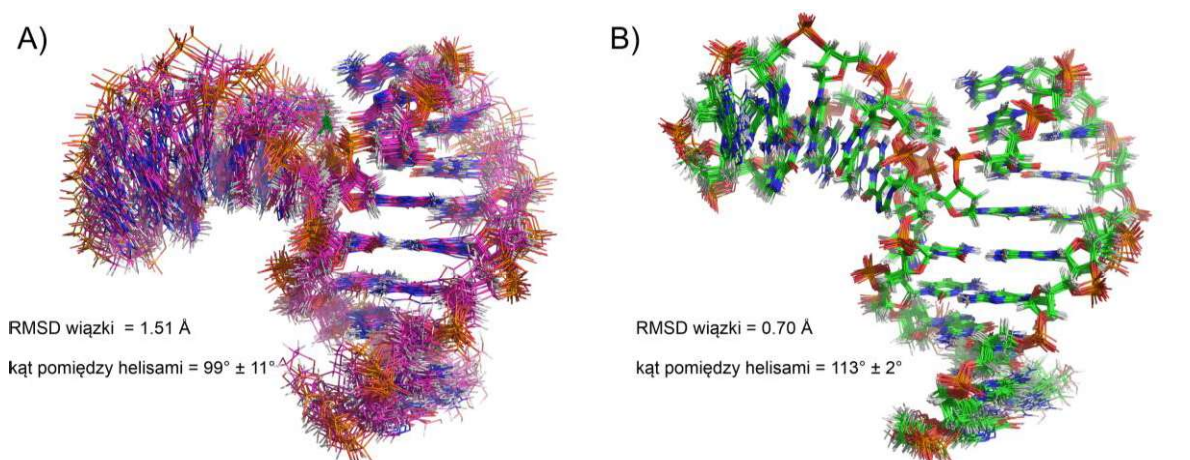
Wpływ więzów PCS na dokładność i precyzję wyznaczenia struktury LnA

Obecność stosunkowo sztywnej i asymetrycznej pierwszej sfery koordynacyjnej metalu jest odpowiedzialna za niezerową wartość anizotropii podatności magnetycznej $\Delta\chi$ ułożonych na nim niesparowanych elektronów i w konsekwencji możliwość obserwacji efektu PCS. Obserwowane

efekty okazały się jednoznacznie interpretowalne w funkcji parametrów strukturalnych, co wykazała doskonała zgodność zamierzonych eksperymentalnie efektów z przewidzianymi na podstawie struktury (za pomocą równania 1 z pracy **H3**).

Oznacza to, że jon lantanowca związany do aptameru LnA stanowi doskonałe źródło więzów dalekozasięgowych PCS. Ich wartość w badaniach strukturalnych wykazałem w pracy **H3** poprzez porównanie struktur LnA wyznaczonych z wykorzystaniem tych więzów oraz bez nich (Rysunek 2.2.4). Wiązka strukturalna NMR otrzymana z wykorzystaniem więzów PCS była znacznie lepiej zdefiniowana w przestrzeni. Dużo lepiej wyznaczone były przede wszystkim globalne cechy struktury, takie jak wartość kąta tworzonego przez Helisę 2 z pozostałymi elementami helikalnymi. Zidentyfikowanie miejsca wiązania jonów lantanowców do DNA pozwalającego na obserwację wysokiej jakości więzów PCS otwiera drogę do szerszego zastosowania efektów paramagnetycznych w spektroskopii NMR kwasów nukleinowych. Pozwalałaby na to izolacja z LnA minimalnego motywu niezbędnego do wiązania jonu metalu a następnie jego “przeszczepianie” do innych układów DNA/RNA co zaproponowałem w pracy **H3** i przedyskutuję szerzej w Rozdziale 3.2.

Rysunek 2.2.4. Wpływ więzów strukturalnych PCS na precyzję wyznaczenia struktury przestrzennej aptameru LnA. Wiązka struktur NMR wyznaczona za pomocą A) jedynie klasycznych więzów NOE i ze sprzężeń skalarnych, B) więzów klasycznych oraz więzów PCS. Rysunek zawiera elementy Figury 8 z pracy **H3**.



Badania strukturalne aptameru LnA – podsumowanie

Praca **H3** prezentuje strukturę przestrzenną aptameru wiążącego jony lantanowców, wyznaczoną metodami NMR. Cechami wyróżniającymi uzyskane w tej pracy wyniki na tle typowych badań strukturalnych NMR są dokładne wyznaczenie pozycji przyjmowanej przez oddziaływający z DNA jon metalu oraz rzadko spotykana zbieżność uzyskanej wiązki struktur (średnie RMSD pomiędzy strukturami to 0.7 Å). Było to możliwe dzięki zastosowaniu dalekozasięgowych efektów paramagnetycznego NMR – więzów strukturalnych PCS. Struktura LnA jest pierwszą zdeponowaną w PDB strukturą DNA, w której bezpośrednie oddziaływanie pomiędzy jonem lantanowca, a

cząsteczką kwasu nukleinowego pozwoliło na obserwację silnych efektów PCS. Odkrycie układu o takich właściwościach otwiera drogę do szerszego zastosowania więzów paramagnetycznego NMR w badaniach DNA/RNA (Rozdział 3.2).

2.3 Praca H4 – wyznaczenie struktury przestrzennej DNAzemu 8-17 w kompleksie z jonem Zn^{2+} i zaproponowanie nowego modelu relacji struktura-funkcja dla tego układu

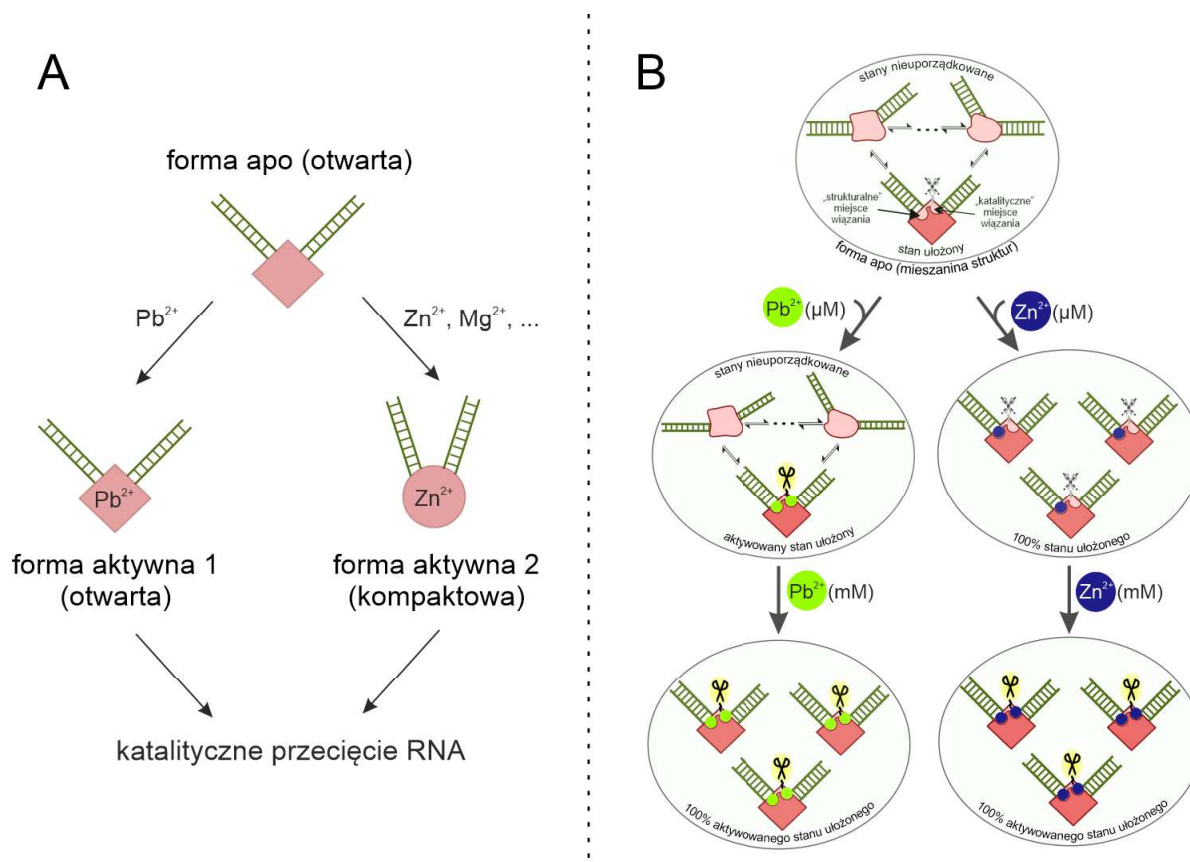
Dotychczasowy stan wiedzy o strukturach przestrzennych cząsteczek DNAzymów

Ważnym typem cząsteczek kwasów nukleinowych, w których związane jony metali mogą pełnić nie tylko rolę strukturalną, lecz również bezpośrednio wspomagać funkcje pełnione przez te układy są cząsteczki RNA i DNA o właściwościach katalitycznych, odpowiednio rybozymy i DNAzemy. Zdecydowanie najistotniejszym typem reakcji chemicznej katalizowanej przez oba te typy układów jest hydroliza RNA, tym niemniej enzymy RNA i DNA różnią się znacząco pod względem zarówno pochodzenia jak i stopnia, w jakim udało się do tej pory scharakteryzować podstawy strukturalne ich działania. O ile najważniejsze typy rybozymów hydrolizujących RNA zostały pierwotnie odkryte w genomach szerokiego spektrum organizmów żywych, o tyle obecność DNAzymów w przyrodzie nadal nie została potwierdzona.⁶⁰ Wszystkie znane tego typu układy zostały otrzymane syntetycznie w procesie tzw. selekcji *in vitro* opisaną już w punkcie 2.2. Pomimo nieobecności w przyrodzie DNAzemy mają serię przewag nad rybozymami w zastosowaniach biotechnologicznych, jak choćby znacząco wyższą trwałość, w tym w warunkach komórkowych czy niższe koszty produkcji.⁶¹ Już od ich odkrycia w latach dziewięćdziesiątych, największe nadzieje budzi zastosowanie DNAzymów jako środków terapeutycznych, zdolnych do modulacji poziomów wybranych mRNA w organizmach żywych.⁶² Jednak takie zastosowanie DNAzymów pozostaje jak do tej pory nadzieją niespełnioną. Wynika to w dużej części z ich ograniczonej aktywności w warunkach komórkowych, ubogich w dwuwartościowe jony metali, stanowiące niezbędne kofaktory większości DNAzymów.⁶³ Próby projektowania nowych wariantów DNAzymów, aktywnych w obecności niższych stężeń jonów metali, ogranicza z kolei brak informacji dotyczących mechanizmów działania tych układów. Choć próby krystalizacji cząsteczek DNAzymów były podejmowane od lat dziewięćdziesiątych, jednak dopiero w roku 2016 ukazała się pierwsza publikacja prezentująca strukturę przestrzenną DNAzemu określanego symbolem 9DB1, katalizującego reakcję ligacji RNA.¹⁸ Rok później opublikowano struktury krystalograficzne DNAzemu 8-17 w obecności jonów Pb^{2+} oraz w formie apo, a więc pozbawionej kofaktora.¹⁹ Struktury te dostarczyły pierwszych wysokorozdzielczych informacji dotyczących mechanistycznych podstaw działania cząsteczek DNAzymów. Ujawniły również nieprzewidzianą wcześniej złożoność strukturalną tych układów. Pokazały mianowicie, że liczne rejony sekwencji zbadanych DNAzymów uważane uprzednio za jednoniciowe tworzą w rzeczywistości stabilne elementy struktury drugo- i trzeciorzędowej, oparte na niekanonicznych parach zasad oraz elementach typu pseudowęzła.

Motywacja do badań NMR DNAzymu 8-17

Odkrycia te zainspirowały mnie do podjęcia próby badania struktur przestrzennych DNAzymów metodami NMR. Gdy w roku 2018 rozpoczynałem badania w tej tematyce nie było jeszcze w literaturze przykładów struktur cząsteczek DNAzymów rozwiązanych metodami NMR. Nie było również oczywiste czy badania takie są wykonalne z uwagi na dość znaczne rozmiary nawet najmniejszych tego typu układów, rzędu 60-70 nt. Z tego powodu, opierając się między innymi na doświadczeniach zdobytych podczas badania aptameru LnA (praca **H3**), zaproponowałem metodę optymalizacji sekwencji cząsteczek DNAzymów do badań NMR. Pozwoliła mi ona stworzyć konstrukt DNAzymu 8-17 o długości jedynie 35 nt oraz niezaburzonej aktywności katalitycznej. Dzięki innowacyjnemu charakterowi proponowanych badań, na ich kontynuację udało mi się uzyskać finansowanie w konkursie NCN SONATA 14 (grant zatytułowany “Badania strukturalne DNAzymów 8-17 i I-R2 metodami NMR”). W ramach tego projektu planowałem rozwiązanie struktury przestrzennej skróconego konstrukt DNAzymu 8-17 w obecności jonów Zn^{2+} . Zagadnienie to było bardzo istotne pomimo tego, że znane były już wówczas struktury krystalograficzne tego DNAzymu w formie apo oraz w obecności jonów ołowiu Pb^{2+} .¹⁹ Ponad 20 lat intensywnych badań tego układu wskazywało bowiem, że aż dwie różne jego struktury są aktywne katalitycznie.⁶⁴ Jedna z nich, identyczna z formą apo, miała być wykorzystywana przez DNAzym 8-17 w obecności jonów Pb^{2+} jako kofaktora (Rysunek 2.3.1a). Natomiast uważano, że obecność pozostałych kofaktorów tego układu, jak Zn^{2+} czy też istotny w kontekście komórkowym Mg^{2+} , wywołuje w nim globalną zmianę konformacyjną w kierunku drugiej, bardziej kompaktowej struktury aktywnej (Rysunek 2.3.1a). Model ten został zaproponowany na podstawie badań technikami o niższej rozdzielczości, takimi jak spektroskopia CD⁶⁵ oraz metody FRET.^{66,67} Ta niezwykła właściwość DNAzymu 8-17 oznaczała, że dostępne struktury krystalograficzne nie dostarczają informacji o konformacji aktywnej tego układu, istotnej dla warunków komórkowych, gdyż “kompaktowa” struktura indukowana przez m. in. jony Mg^{2+} pozostawała nieznana. Praca **H4** prezentuje znaczącą większość wyników uzyskanych przeze mnie dla DNAzymu 8-17 w trakcie realizacji projektu SONATA 14. Informacje uzyskiwane w toku prowadzonych badań prowadziły do stawiania nowych pytań, a w konsekwencji do rozszerzenia badań nad DNAzymem 8-17 znacząco poza zakres planowany oryginalnie w projekcie. Oprócz planowanego wyznaczenia wysokorozdzielczej struktury przestrzennej tego układu w obecności jonów Zn^{2+} , przeprowadziłem również jego badania metodami NMR w obecności serii innych kofaktorów: Pb^{2+} , Mg^{2+} oraz Na^{+} . Dodatkowo układ został ponownie przebadany za pomocą innych stosowanych już wcześniej w literaturze metod. Wspólna analiza wszystkich tych wyników pozwoliła mi na zaproponowanie nowego modelu oddziaływań DNAzymu 8-17 z jonami metali. Z tego powodu zdecydowałem się na publikację ich w formie jednego artykułu w czasopiśmie o wysokiej rozpoznawalności (praca **H4**), choć ich objętość i waga byłyby wystarczające do stworzenia całej serii publikacji.

Rysunek 2.3.1. Modele opisujące wpływ jonów metali na strukturę i aktywność DNAzemu 8-17. A) model przyjęty na podstawie wcześniejszych badań, B) model zaproponowany w pracy **H4**. Rysunek stanowi kompilację elementów Figur 1 i 8 z pracy **H4**.

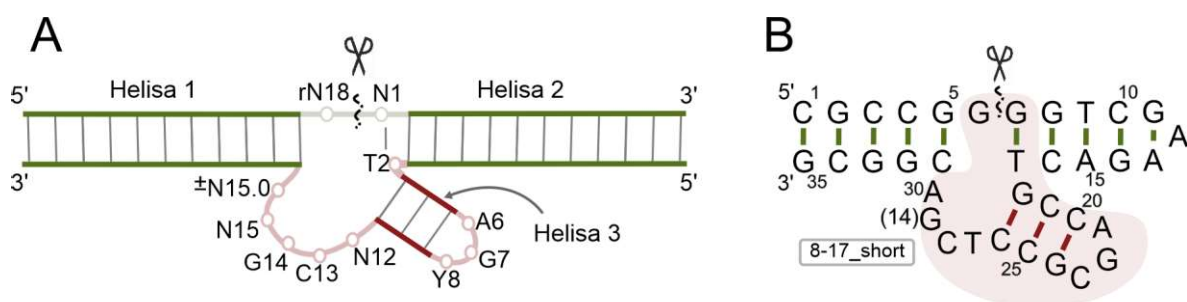


Wyznaczenie struktury DNAzemu 8-17 w obecności jonów Zn^{2+} metodami NMR

Podstawą badań prezentowanych w pracy **H4** jest wariant sekwencyjny DNAzemu 8-17 zoptymalizowany do badań strukturalnych metodami NMR. Za przeprowadzoną optymalizacją stoi obserwacja, że struktura przestrzenna domeny katalitycznej DNAzemu (czerwona i różowa na Rysunku 2.3.2a) powinna być niezależna od sekwencji ramion wiążących przecinaną przez ten układ nici RNA (zielone na Rysunku 2.3.2a). Dlatego też na wstępnym etapie badań podjąłem się poszukiwań wariantów sekwencyjnych DNAzemu o skróconych ramionach wiążących substrat RNA, jednak nadal zdolnych do ilościowego jego wiązania w warunkach NMR. Zmniejszenie wzajemnego powinowactwa nici DNAzymowej i substratowej, spowodowane ograniczeniem liczby tworzących się pomiędzy nimi par zasad, kompensować miało znaczące zwiększenie udziału par GC w rejonie ramion DNAzemu. Gdy okazało się, że ten prosty zabieg nie zapewnia wystarczającej skłonności skróconych nici do hybrydyzacji w strukturę aktywną, zdecydowałem się na połączenie obu nici w jeden konstrukt za pomocą stabilnej pętli trójnukleotydowej (Rysunek 2.3.2b). Jednoniciowy charakter uzyskanego konstrukt znacząco zmniejszał wartość kary entropowej towarzyszącej tworzeniu przez niego spodziewanej struktury, jednak w połączeniu z bardzo wysoką zawartością par GC stwarzał też ryzyko

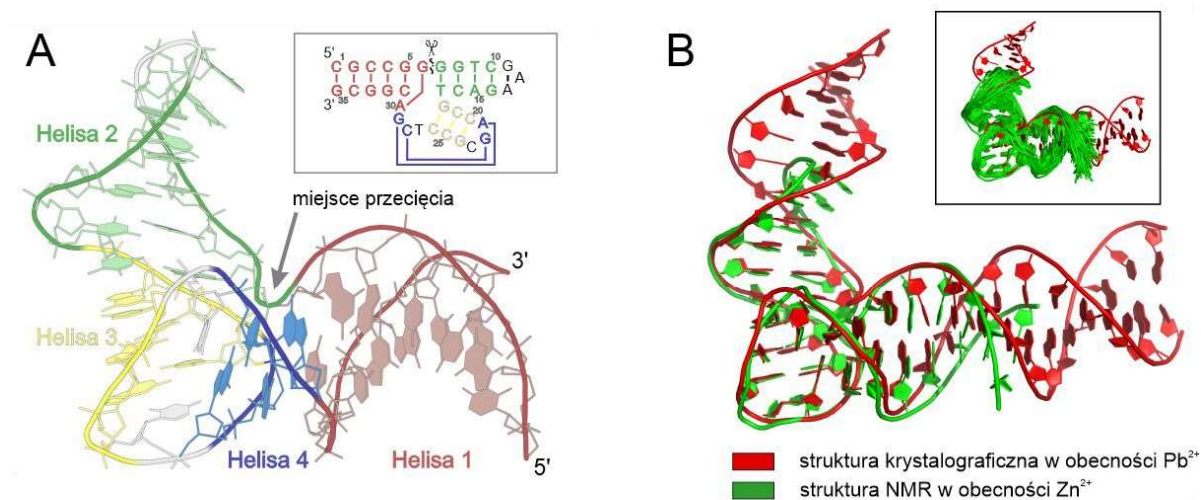
tworzenia się całej serii alternatywnych struktur przestrzennych opartych na konkurencyjnych parowaniach zasad. Z tego powodu zaprojektowałem całą serię konstruktów DNAzemu 8-17 opartych na opisanym schemacie. Posiłkowałem się przy tym programem UnaFold,⁶⁸ pozwalającym na szybką ocenę *in silico* skłonności danego konstruktu do przyjmowania klasycznej struktury drugorzędowej DNAzemu 8-17, jak również struktur alternatywnych. Seria najbardziej obiecujących konstruktów została następnie zsyntetyzowana i ich właściwości konformacyjne w obecności jonów Zn^{2+} wstępnie scharakteryzowane za pomocą spektroskopii NMR. Do dalszych badań wybrałem konstrukt przyjmujący w obecności Zn^{2+} tylko jedną formę spektralną i dodatkowo charakteryzujący się najwyższą stabilnością termiczną przyjmowanej struktury, oznaczany odtąd jako “8-17_short” (Rysunek 2.3.2b).

Rysunek 2.3.2. Struktura drugorzędowa DNAzemu 8-17. A) typowy konstrukt B) konstrukt zoptymalizowany do badań NMR – „8-17 short”. Domena katalityczna DNAzemu oznaczona kolorem czerwonym/różowym zaś ramiona wiążące substrat RNA kolorem zielonym. Rysunek zawiera elementy Figury 1 z pracy **H4**.



Nawet dla otrzymanego konstrukt o długości 35 nt wykonalność przypisania częstotliwości rezonansowych bez znakowania izotopowego nie była oczywista, ze względu na duże stłoczenie widmowe. Dzięki wspomnianej, względnie wysokiej stabilności termicznej “8-17_short”, możliwa była jednak rejestracja zestawów widm 2D NMR w szerokim zakresie temperatur, która pozwoliła na jednoznaczne przypisanie sygnałów nawet tych protonów, których częstotliwości rezonansowe nakładały się w części z badanych warunków. Zebrany zestaw więzów strukturalnych NMR okazał się wystarczający do jednoznacznego zdefiniowania struktury przestrzennej “8-17_short” w obecności jonów Zn^{2+} (Rysunek 2.3.3a), którą zdeponowałem w bazie PDB, pod kodem dostępu 8OR8.

Rysunek 2.3.3. Struktura przestrzenna DNAzemu 8-17. A) Struktura „8-17_short” wyznaczona w obecności jonów Zn^{2+} B) porównanie struktur wyznaczonych w obecności Zn^{2+} i Pb^{2+} . Rysunek zawiera elementy Figur 3 i 4 z pracy **H4**.



Badania NMR DNAzemu 8-17 w obecności innych jonów metali

Rozwiązana struktura przestrzenna DNAzemu 8-17 w obecności jonów Zn^{2+} stała się źródłem całej serii nowych pytań badawczych, gdyż wbrew wspomnianemu konsensusowi literaturowemu⁶⁴ okazała się ona praktycznie identyczna, z wyznaczoną wcześniej metodami krystalograficznymi, strukturą przyjmowaną przez ten układ w obecności jonów Pb^{2+} (pod względem konformacji domeny katalitycznej; Rysunek 2.3.3b). W celu wyjaśnienia tego niespodziewanego rezultatu zdecydowałem się zbadać DNAzem 8-17 w obecności jonów Mg^{2+} i Na^+ , które tak jak cynk wywoływać miały postulowaną wcześniej “kompaktową” formę DNAzemu oraz w obecności jonów ołowiu Pb^{2+} . Miareczkowanie “8-17_short” roztworami jonów Mg^{2+} , Na^+ oraz Pb^{2+} pozwoliło na obserwację dla każdego z nich przejścia układu od serii kilku współistniejących form strukturalnych w nieobecności metalu do jednej dobrze zdefiniowanej struktury. Analiza widm NMR dla każdego z tych warunków pozwoliła mi wykazać, że za każdym razem miareczkowanie jonem metalu prowadzi do utworzenia się tej samej struktury przestrzennej, jaką otrzymałem w obecności jonu Zn^{2+} . Wyniki te pokazały, że jony Pb^{2+} również indukują zmiany strukturalne prowadzące do przyjęcia przez ten układ kompaktowej struktury. Otwarte pozostały jednak pytania, dlaczego we wcześniejszych badaniach metodami niskorozdzielczymi nie zaobserwowano tego efektu oraz dlaczego rozwiązana wcześniej struktura krystalograficzna formy apo również ujawniła tę samą architekturę trzeciorzędową, którą w eksperymentach NMR indukowały dopiero jony metali. Analizując ponownie dostępne dane literaturowe dotyczące oddziaływań DNAzemu 8-17 z jonami metali, zauważyłem rażącą niezgodność pomiędzy wartościami stałych dysocjacji (K_d) otrzymywanych metodami opartymi na obserwacji zmian strukturalnych indukowanych przez wiązanie metalu (takimi jak spektroskopia CD lub pomiary FRET),^{65–67} a tymi wyznaczonymi z pomiarów aktywności katalitycznej DNAzemu w funkcji stężenia

tych jonów.^{66,69} Obserwacja ta sugerowała, że za fałdowanie oraz aktywację DNAzemu 8-17 odpowiadają dwa różne miejsca wiązania jonów metali różniące się znacząco powinowactwem do nich. W celu weryfikacji tej hipotezy konieczne okazało się wyznaczenie stałych wiązania wszystkich badanych jonów metali do “8-17_short” dwiema metodami: jedną opartą na obserwacji zmian strukturalnych oraz drugą na pomiarach aktywności. Te same pomiary zdecydowałem się powtórzyć również dla klasycznego konstruktu DNAzemu 8-17, aby wyeliminować podejrzenie, że uzyskane wyniki mogą być artefaktami skrócenia ramion DNAzemu. Scharakteryzowanie szybkości cięcia RNA przez dwa konstrukty DNAzemu 8-17 w szerokim spektrum stężeń Zn^{2+} , Pb^{2+} i Mg^{2+} oraz wykonanie miareczkowań tymi jonami monitorowanych za pomocą spektroskopii CD i NMR wymagało potężnego nakładu pracy laboratoryjnej. Była to praca przede wszystkim zatrudnionych w mojej grupie magistrantki Julii Wieruszewskiej oraz doktorantki Aleksandry Pawłowicz. Uzyskane wyniki potwierdziły przypuszczenia oparte na kwerendzie wartości literaturowych: dla obu konstruktyw stałe wiązania Zn^{2+} oraz Mg^{2+} szacowane na podstawie obserwacji zmian strukturalnych były kilka rzędów wielkości lepsze niż te wynikające z pomiarów aktywności katalitycznej. Sugerowało to, że dla obu tych jonów strukturyzacja DNAzemu 8-17 zachodzi całkowicie już w obecności dużo niższych stężeń kofaktorów, niż te wymagane do wywołania aktywności katalitycznej. W konsekwencji w warunkach, w których układ ten jest aktywny, a więc takich wykorzystywanych w większości badań, DNAzym 8-17 istnieje praktycznie wyłącznie w ustrukturyzowanej “kompaktowej” formie. Z drugiej strony dla jonów Pb^{2+} stałe wiązania wyznaczone obiema użytymi metodami okazały się być dużo bliższe - zgodne co do rzędu wielkości. Oznacza to, że dla tego kofaktora wysoka aktywność katalityczna jest obserwowana już w stężeniach metalu, w których forma “kompaktowa” DNAzemu współistnieje jeszcze z innymi, nieaktywnymi, jego konformacjami.

Zaproponowanie nowego modelu oddziaływań DNAzemu 8-17 z jonami metali

Opisane obserwacje stanowią podstawę nowego, zaproponowanego przeze mnie w pracy **H4**, modelu oddziaływań DNAzemu 8-17 z jonami metali. Zamiast postulowanych wcześniej dwóch struktur aktywnych DNAzemu (Rysunek 2.3.1a), zakłada on istnienie tylko jednej takiej struktury (wyznaczonej uprzednio krystalograficznie i ponownie w pracy **H4** metodami NMR). Obecność większości kofaktorów – jak Zn^{2+} czy Mg^{2+} – w stężeniach niezbędnych do wywołania obserwowalnej aktywności DNAzemu prowadzi do przyjęcia przez całą populację cząsteczek DNAzemu tej aktywnej konformacji (Rysunek 2.3.1b – prawa strona), natomiast jon Pb^{2+} jest w stanie indukować znaczącą aktywność katalityczną już w stężeniach nie wpływających jeszcze znacząco na równowagę konformacyjną układu – poprzez wiązanie się do obecnej frakcji formy aktywnej DNAzemu (Rysunek 2.3.1b – lewa strona). Różnica ta przekłada się na makroskopowo odmienny obraz cząsteczek DNA w obecności Pb^{2+} w stosunku do pozostałych kofaktorów. Podstawą tych różnic jest istnienie w strukturze aktywnej DNAzemu dwóch różnych miejsc wiązania jonów metali oznaczonych przeze

mnie odpowiednio jako miejsca “strukturalne” i “katalityczne” oraz różnic w powinowactwie poszczególnych jonów metali do tych miejsc. W modelu tym forma apo DNAzemu jest mieszaniną różnych jego form strukturalnych (Rysunek 2.3.1b – górny panel), zawierającą w sobie również pewną frakcję ustrukturyzowanej formy aktywnej (wynikającą choćby z obecności w roztworze jednowartościowych jonów metali zubożających ujemny ładunek DNA). Obraz taki pozwala również wytłumaczyć obserwację właściwie ułożonej formy DNAzemu w strukturze krystalograficznej, otrzymanej bez obecności jonów dwuwartościowych jako wynik jej selekcji konformacyjnej z roztworu przez sieć krystaliczną.

Identyfikacja istotnego strukturalnie miejsca wiązania Zn^{2+} do DNAzemu 8-17

Niezależnie od eksperymentów wykonywanych w obecności jonów Pb^{2+} , Mg^{2+} oraz Na^+ , kontynuowałem również badania oddziaływań konstruktu “8-17_short” z jonami Zn^{2+} metodami NMR. Celem tych badań było zaproponowanie geometrii oddziaływań dla postulowanego “strukturalnego” oraz “katalitycznego” miejsca wiązania Zn^{2+} . Z powodu, że Zn^{2+} jest jodem o właściwościach diamagnetycznych, jedynym dostępnym sposobem lokalizacji jego miejsc wiązania był pomiar zaburzeń przesunięć chemicznych (CSP) atomów DNA. Jak jednak zaznaczyłem już wcześniej (Rozdział 1.2), jej zastosowanie dla układów, w których wiązaniu jonu metalu towarzyszy zmiana strukturalna w cząsteczce DNA jest bardzo utrudnione, gdyż niemożliwe jest odróżnienie CSP wywołanych bezpośrednią bliskością jonu metalu od tych indukowanych przez samą zmianę w strukturze DNA. Dla DNAzemu 8-17 udało mi się jednak znaleźć sposób obejścia tego ograniczenia dzięki wykazaniu, że jony Na^+ indukują tę samą strukturę DNA jak jony Zn^{2+} , jednak wiążą się z rzędu wielkości gorszą stałą wiązania, przez co mogą być przez nie łatwo wyparte bez zaburzania struktury. Do lokalizacji miejsc wiązania jonów Zn^{2+} do DNAzemu 8-17 zastosowałem więc metodę CSP, poprzez uprzednie wysycenie przejścia strukturalnego za pomocą jonów Na^+ , a następnie miareczkowanie Zn^{2+} do już ustrukturyzowanego DNAzemu. Wykonane eksperymenty pozwoliły na zlokalizowanie “strukturalnego” miejsca wiązania jonów Zn^{2+} w okolicach pary zasad G-T obecnej na obrzeżach domeny katalitycznej DNAzemu. Miejsce to zidentyfikowałem jako “strukturalne” dzięki obserwacji charakterystycznej, wysokiej stałej wiązania. Niestety, zlokalizowanie w ten sam sposób miejsca “katalitycznego” okazało się niemożliwe, gdyż jego stała wiązania jest na tyle niska ($K_d > 10^{-3}$ M; na podstawie pomiarów aktywności katalitycznej), że równoległe z nim zaczęła wypełniać się cała seria innych, słabych miejsc wiązania. W związku z tym, na dalszych etapach miareczkowania Zn^{2+} , niezerowe CSP rejestrowałem już nawet w wielu odległych rejonach struktury DNAzemu, w tym w ramionach wiążących substrat RNA, co znacząco utrudniało ich interpretację.

Podsumowanie wyników badań DNAzemu 8-17 metodami NMR

Praca **H4** oprócz prezentacji struktury DNAzemu 8-17 indukowanej obecnością jonów Zn^{2+} , proponuje również całkowicie nową interpretację sposobu, w jaki oddziaływania z jonami dwuwartościowymi kształtują preferencje konformacyjne tego układu. Zaproponowany model pozwala na reinterpretację uzyskanych na przestrzeni ponad 20 lat wyników badań tego układu, wskazując, że do ich wyjaśnienia wystarczające jest istnienie tylko jednej struktury aktywnej katalitycznie. W ten sposób praca **H4** dostarcza również pierwszych danych strukturalnych potrzebnych do zrozumienia działania DNAzemu 8-17 w obecności jonów Mg^{2+} , najistotniejszych w kontekście wykorzystania tego układu w warunkach komórkowych.

Rozdział 3

Analiza porównawcza wyników uzyskanych dla trzech zbadanych układów oraz próba syntezy ich wkładu w rozwój dyscypliny badawczej

3.1 Krytyczna analiza metodologiczna prezentowanych badań

Podsumowanie metod użytych do charakterystyki strukturalnej miejsc wiązania jonów metali

Cel badań NMR we wszystkich prezentowanych w Rozdziale 2 pracach był ten sam – wyznaczenie niekanonicznej struktury przestrzennej DNA/RNA indukowanej jonami metali oraz identyfikacja i charakterystyka geometrii miejsca oddziaływań. Jednak w praktyce dla każdego z badanych układów – G-kwadrupleksu $r(UGGUGGU)_4$, aptameru LnA oraz DNAzemu 8-17 – wykorzystałem inny wycinek spośród opisanego w Rozdziale 1.2 wachlarza metod NMR dostępnych do badania tego typu układów, co przełożyło się w szczególności na bardzo różną dokładność z jaką udało mi się scharakteryzować pozycje jonów metali obecnych w ich strukturach. W pierwszej części obecnego rozdziału chciałbym przyrzeć się ponownie każdej z trzech badanych cząsteczek, porównać zestawy metod, które wykorzystałem w ich badaniach oraz dokonać krytycznej oceny w jakim stopniu dodatkowe, nie zawarte w publikowanych pracach, eksperymenty mogłyby poprawić stopień zrozumienia oddziaływań DNA/RNA-metal dla każdego z nich.

Krótkie podsumowanie informacji dotyczących położenia miejsc wiązania jonów metali uzyskanych dla każdego z badanych układów przedstawia się następująco:

- 1) W przypadku G-kwadrupleksu $r(UGGUGGU)_4$, choć samą jego strukturę przestrzenną udało mi się wyznaczyć metodami NMR z dobrą dokładnością, to jednak wszystkie informacje dotyczące położenia oddziałujących z nią jonów K^+ uzyskałem już za pomocą metod dynamiki molekularnej. Oznacza to, że wyznaczone położenia jonów potasu w kanale kwadrupleksu oraz nawet

sama obecność dodatkowych miejsc jego wiązania w brzdach G-kwadrupleksu mogą potencjalnie stanowić jedynie artefakty użytych metod obliczeniowych. Aby zmniejszyć szansę zaistnienia takiej ewentualności, symulacje dynamiki molekularnej G-kwadrupleksu $r(\text{UGGUGGU})_4$ powtarzałem kilkakrotnie wykorzystując serię różnych zestawów parametrów pola siłowego (praca **H1**), jednak eksperymentalne potwierdzenie obserwowanych w symulacjach geometrii oddziaływań stanowiłoby dużo bardziej przekonujący argument.

2) Rozwiązana w pracy **H3** struktura kompleksu aptameru LnA z jonem lantanowca stanowi przykład wyznaczenia pozycji związanego jonu metalu z rzadką, w kontekście spektroskopii NMR, precyzją (RMSD położenia jonu metalu pomiędzy dwudziestoma konformerami zdeponowanymi w PDB to jedynie 0.11 Å). Było to możliwe dzięki zastosowaniu kilkuset daleko-zasięgowych więzów PCS, z których każdy niósł informację o położeniu jonu metalu względem jednego z atomów należących do cząsteczki DNA. W przypadku tego układu dalsze udokładnianie pozycji jonu metalu trudno uznać za konieczne.

3) Wyniki uzyskane w pracy **H4** dotyczące oddziaływań DNAzemu 8-17 z jonami Zn^{2+} stanowią dość typowy przykład informacji, jakich spektroskopia NMR może dostarczyć w przypadku oddziaływań z jonami o właściwościach diamagnetycznych. Dla tego układu, wykorzystując dane CSP, udało mi się zidentyfikować zestaw reszt nukleotydowych najprawdopodobniej zaangażowanych w tworzenie miejsca wiązania jonu Zn^{2+} . Jednakże ustalenie dokładnej pozycji zajmowanej przez jon metalu lub też zidentyfikowanie konkretnych grup funkcyjnych tworzących z nim bezpośrednie oddziaływanie leży poza zakresem możliwości tej metody. Dlatego też o szczegółach oddziaływań musiałem w pracy **H4** spekulować na podstawie typowych trendów dotyczących koordynacji jonów metali przez ligandy DNA, znanych z danych literaturowych.

Czy w przypadku układów, dla których dokładne położenie miejsc wiązania jonów metali pozostaje niepewne, możliwe było uzyskanie dokładniejszych informacji? Jeśli tak to, dlaczego tego nie uczyniłem?

Metody uzupełniające – symulacje dynamiki molekularnej

Symulacje dynamiki molekularnej stosowałem jako jedną z metod badania pierwszych dwóch spośród dyskutowanych układów, jednak nie zrobiłem tego w pracy **H4** opisującej oddziaływanie DNAzemu 8-17 z jonami Zn^{2+} . Może to być szczególnie zastanawiające biorąc pod uwagę, że dla tego układu udało mi się zmierzyć zestaw danych CSP, które optymalnie jest uzupełnić symulacjami, w celu opisanie szczegółów geometrii zachodzących oddziaływań. Podczas zbierania materiałów do pracy **H4** podjąłem próbę wykorzystania tej metody, nie przyniosła ona jednak jednoznacznych rezultatów. Wykonałem serię symulacji dynamiki molekularnej, w których jon cynku był umieszczany albo w okolicach przewidywanego miejsca wiązania albo też w przypadkowej pozycji w bliskości

DNA. W każdej jednak niezależnej symulacji śledzony jon zatrzymywał się w pierwszym głębszym minimum lokalnym jakie napotykał (zazwyczaj w pierwszej geometrii, w której oddziaływał w pierwszej sferze z dowolną grupą należącą do DNA) i pozostawał tam, aż do końca obliczeń. Oznacza to, że osiągalne w symulacjach skale czasowe były rzędy wielkości za krótkie do uzyskania ich zbieżności pod względem preferowanych pozycji jonu metalu. Rozwiązanie tego problemu wymagałoby zastosowania bardziej zaawansowanych metod symulacji, pozwalających na poprawione próbkowanie przestrzeni konformacyjnej (ang. „enhanced sampling”) przez jon metalu. Wykonanie podobnej analizy mogłoby jednak stanowić temat osobnej publikacji, jak miało to miejsce w przypadku oddziaływań jonów Pb^{2+} z dostępną wcześniej strukturą krystalograficzną tego układu.⁷⁰ Dlatego też zdecydowałem się pozostawić ten temat grupom badawczym specjalizującym się w metodach obliczeniowych i zaniechać użycia symulacji w pracy **H4**.

Metody uzupełniające – pomiar zaburzeń przesunięć chemicznych (CSP)

Pomiar CSP zastosowałem natomiast tylko w przypadku pracy **H4**, choć eksperyment taki mógłby teoretycznie stanowić doskonały sposób uzyskania eksperymentalnego potwierdzenia obecności dodatkowych miejsc wiązania jonów K^+ w brzdach G-kwadrupleksu r(UGGUGGU)₄. Na etapie przygotowywania prac **H1** i **H2** nie zdecydowałem się jednak na próbę wykonania podobnych pomiarów co wynikało z faktu, że wszystkie badane próbki zawierały już w sobie kilkudziesięciokrotny nadmiar molowy tych jonów względem RNA - 50 mM KCl, wykorzystywany standardowo w badaniach G-kwadrupleksów, w celu wymuszania ilościowego tworzenia się ich struktur. Oznacza to, że nawet jeśli miejsca wiązania K^+ w brzdach są słabe (ze stałymi dysocjacji w zakresie milimolowym) to i tak będą one w znaczącym stopniu wypełnione już na początku dalszego miareczkowania. Dalszy dodatek KCl mógłby więc nie prowadzić do obserwacji CSP niezależnie od tego czy miejsca te rzeczywiście istnieją czy też nie. Obniżenie stężenia KCl na etapie przygotowania próbki interferowałoby z kolei z tworzeniem G-kwadrupleksu.

Metody uzupełniające – międzycząsteczkowe NOE

W potwierdzeniu geometrii miejsc wiązania w kanale G-kwadrupleksu potencjalnie pomóc mogłyby dodatkowe eksperymenty oparte na pomiarach międzycząsteczkowego efektu NOE, których nie stosowałem w żadnych z prezentowanych w tej rozprawie prac. Wymagałyby one użycia jonów amonowych NH_4^+ , jako zamienników dla jonów K^+ , podczas tworzenia struktury G-kwadrupleksu. Pozycje tych jonów w centralnym kanale mogłyby być bezpośrednio śledzone eksperymentalnie za pomocą więzów NOE,^{71,72} podobnie jak opisałem w Rozdziale 1 dla jonów $Co(NH_3)_6^{3+}$. Tego rodzaju pomiary musiałyby być jednak dodatkowo poprzedzone ponownymi badaniami strukturalnymi w celu sprawdzenia czy jony NH_4^+ indukują tę samą strukturę G-kwadrupleksu co K^+ i Na^+ (co wydaje się

prawdopodobne na podstawie wstępnych pomiarów NMR).⁵³ Innym ograniczeniem tej metody byłby jednak fakt, że geometrie oddziaływań jonów NH_4^+ i K^+ w kanałach nawet identycznych G-kwadrupleksów mogą być różne, więc nawet dokładne umiejscowienie jonów amonowych w kanale nie daje gwarancji, że uzyskane wyniki będą przekładalne na istotne biologicznie jony K^+ .

W teorii podobny eksperyment mógłby być również wykonany dla DNAzemu 8-17 stosując jon $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$, stanowiący substytut w pełni hydratowanego jonu Mg^{2+} . W tym przypadku istotną niewiadomą pozostaje jednak pytanie na ile jony oddziałujące zazwyczaj z DNAzymem 8-17 rzeczywiście pozostają hydratowane. Jeśli wiązanie tych kofaktorów przebiega z częściową ich dehydratacją, wówczas geometria oddziaływań zaobserwowana dla $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ mogłaby nie stanowić dobrego przybliżenia dla kompleksów metali, rzeczywiście istotnych dla aktywności tego układu.

Metody uzupełniające – efekty paramagnetyczne

Ciekawą kwestią pozostaje potencjał zastosowania efektów paramagnetycznych, PRE i PCS, w badaniach oddziaływań G-kwadrupleksu $r(\text{UGGUGGU})_4$ oraz DNAzemu 8-17 z jonami metali. Choć istnieją przykłady literaturowe wiązania się jonów lantanowców zarówno w bruzdach,⁷³ jak i w centralnym kanale wybranych G-kwadrupleksów,⁷⁴ jednak obecność takich oddziaływań dla $r(\text{UGGUGGU})_4$ nie była badana. Ponadto, podobnie jak dla opisanych powyżej eksperymentów z użyciem NH_4^+ , znaczącym ograniczeniem przydatności uzyskanych danych byłaby niemożliwość weryfikacji na ile obserwowane geometrie oddziaływań są rzeczywiście podobne do tych przyjmowanych przez jony K^+ .

Bardziej obiecującą wydawała się natomiast perspektywa wykorzystania efektów paramagnetycznych w badaniach DNAzemu 8-17. Jednym ze znanych kofaktorów tego układu są jony kobaltu Co^{2+} ,⁶⁴ zdolne do wywoływania silnych przesunięć paramagnetycznych, gdy wiążą się one do biomolekuły z dobrze zdefiniowaną geometrią pierwszej sfery koordynacyjnej. Potwierdzone jest również wiązanie jonów lantanowców do tego DNAzemu.⁷⁵ Działają one jednak jako inhibitory jego aktywności, nie jest więc jasne czy oddziałują z nim w ten sam sposób jak pozostałe jony. Tym niemniej, w ramach badań poprzedzających przygotowanie pracy **H4**, przeprowadziłem analizę NMR oddziaływań DNAzemu 8-17 zarówno z Co^{2+} , jak i z kilkoma jonami należącymi do grupy lantanowców. We wszystkich przypadkach jedynym efektem jaki obserwowałem było jedynie poszerzenie sygnałów (efekt PRE). Brak obserwowalnych przesunięć paramagnetycznych (PCS) oznaczał, że jony te oddziałując z DNAzymem 8-17 charakteryzują się $\Delta\chi$ bliskim 0, a więc nie przyjmują stabilnej geometrii oddziaływań i/lub pozostają w znaczącym stopniu hydratowane. Obserwowane poszerzenia sygnałów były najbardziej istotne dla reszt nukleotydowych tworzących domenę katalityczną DNAzemu, co samo w sobie stanowiło potwierdzenie preferencyjnych oddziaływań jonów paramagnetycznych z tą częścią cząsteczki. Ilościowy pomiar obserwowanych

PRE dla próbek nieznakowanych izotopowo jest jednak trudny,³⁹ co sprawiło, że nie byłem w stanie wykorzystać tych efektów jako więzów strukturalnych. Ponowna synteza cząsteczki DNAzymu całkowicie znakowanej izotopami ^{13}C i ^{15}N pozwoliłaby prawdopodobnie na wyznaczenie dla niej więzów PRE z widm korelacyjnych typu HSQC, jednakże nie zdecydowałem się na to z uwagi na ogromne koszty takiej syntezy.

Poszerzenia paramagnetyczne, potencjalnie przekładalne na więzy PRE obserwowałem również, obok efektów PCS, dla cząsteczki aptameru LnA, badanej w pracy **H3**. Również w tej publikacji nie interpretowałem ich jednak w sposób ilościowy (jako więzy strukturalne), gdyż znowu dysponowałem jedynie nieznakowanymi izotopowo próbkami. W tym wypadku jednak użycie tych dodatkowych więzów nie było konieczne, gdyż pozycja związanego jonu metalu była już zdefiniowana z doskonałą dokładnością za pomocą więzów PCS.

Podsumowanie porównawczej analizy metodologicznej

Dostępność szerokiego repertuaru metod NMR wrażliwych na oddziaływania badanej biomolekuły z jonami metali, pozostawia w przypadku każdego badanego układu pole do planowania dodatkowych eksperymentów mogących potencjalnie poprawić jakość opisu tych oddziaływań. Jednakże, jak pokazują przytoczone przykłady, praktyczna wykonalność tych dodatkowych pomiarów, jak również rzeczywista przydatność dostarczonych przez nie wyników, są często niemożliwe do jednoznacznej oceny *a priori*. W badaniach, jakie prowadziłem w ramach prac **H1-H4**, wyboru użytych metod dokonywałem zawsze kierując się specyficznymi właściwościami fizycznymi każdej z badanych cząsteczek, determinującymi prawdopodobieństwo powodzenia danego typu eksperymentu. Nie oznacza to jednak, że publikowane w tych pracach wyniki wyczerpują pełen zakres informacji możliwy do uzyskania metodami NMR dla każdego z układów.

3.2 Wkład uzyskanych wyników w rozwój dyscypliny badawczej

Badane przeze mnie układy należą do dwóch typów istotnych biologicznie niekanonicznych architektur kwasów nukleinowych: G-kwadrupleksów oraz tzw. ang. “multiple way junctions”, a więc struktur zawierających centralną pętlę, do której przyłączone są elementy helikalne.

G-kwadrupleksy stały się w ostatnich dekadach najszerzej badanym typem niekanonicznych struktur kwasów nukleinowych, z uwagi zarówno na liczne role, jakie układy te pełnią w organizmach żywych,⁴³ jak i ze względu na ich niezwykle różnorodność strukturalną, która sprawia, że nawet pomimo wyznaczenia setek wysokorozdzielczych struktur G-kwadrupleksów nadal odkrywane są nowe typy architektur tych układów. Takim nowo odkrytym elementem strukturalnym jest na przykład motyw “odwróconej U-tetrady”, którego identyfikację oraz charakterystykę opisują prace **H1**

i **H2**. Element ten jest blokiem budulcowym dostępnym wyłącznie dla G-kwadrupleksów RNA, co czyni go dość wyjątkowym w kontekście całego pejzażu różnorodności konformacyjnej G-kwadrupleksów, gdyż znanych jest wiele motywów strukturalnych obserwowanych jedynie dla G-kwadrupleksów DNA,^{47,48} lecz sytuacje odwrotne są rzadkością (Rozdział 2.1). Z drugiej strony motyw ten może tworzyć się jedynie w strukturach G-kwadrupleksów czterocząsteczkowych, których istotność w kontekście biologicznym jest nadal niejasna. Dlatego też, poza ciekawostką strukturalną, widzę w nim raczej element potencjalnie istotny w kontekście nanotechnologii kwasów nukleinowych, dziedziny zajmującej się projektowaniem układów opartych na cząsteczkach DNA/RNA, które dzięki właściwie dobranym szczegółom swoich preferencji strukturalnych są w stanie wykonywać określone zadania. Motyw “odwróconej U-tetrazy”, z uwagi na wywoływaną przez niego silną stabilizację architektury czterocząsteczkowego G-kwadrupleksu RNA, może być użyty na przykład do promowania samoasocjacji czterech nici RNA w odpowiedzi na bodziec w postaci wzrostu stężenia jonów K^+ lub Na^+ w roztworze. Indukowanie jego tworzenia potencjalnie wymagałoby jedynie umieszczenia sekwencji GGU na 3'-końcu docelowego RNA, gdyż jest to minimalny motyw sekwencyjny wspólny dla wszystkich układów, dla których obserwowano do tej pory obecność “odwróconej U-tetrazy”.

Pozostałe dwa układy, choć oba dzielą architektury typu “multiple way junction”, pod względem wkładu, jaki poznanie ich struktur wniosło w rozwój praktykowanej przeze mnie dyscypliny badawczej należy rozpatrywać osobno. Przeprowadzone przeze mnie badania wpływu jonów dwuwartościowych na strukturę DNAzemu 8-17 pozwoliły na reinterpretację wyników uzyskanych w ciągu ponad 20 lat badań strukturalnych tego układu⁶⁴ i potencjalnie utorowały drogę do głębszego zrozumienia mechanizmu jego działania w obecności biologicznie istotnego kofaktora Mg^{2+} , a być może nawet do racjonalnego projektowania jego wariantów bardziej aktywnych w warunkach komórkowych. Wykazanie, że DNAzym 8-17 tworzy tylko jedną strukturę aktywną, niezależnie od typu obecnego kofaktora, uporządkowało obecne do tej pory w literaturze informacje strukturalne dotyczące tego układu oraz pokazało, że zarówno struktura NMR wyznaczona w obecności Zn^{2+} jak i dostępna wcześniej struktura krystalograficzna zawierająca związany jon Pb^{2+} mogą być bezpośrednio wykorzystane jako punkty wyjścia do zrozumienia mechanizmu działania tego układu również w obecności innych jonów metali - jak biologicznie istotny Mg^{2+} . Wagę zaprezentowanych w pracy **H4** wyników dobrze ilustruje fakt, że stała się ona tematem osobnego komentarza opublikowanego na łamach Nature Communications⁷⁶ i w niecały rok od ukazania się była już cytowana ponad dziesięciokrotnie. Dużą niewiadomą pozostaje nadal geometria istotnego katalitycznie miejsca wiązania jonów Zn^{2+} czy Mg^{2+} . Jednakże zakładając, że nie jest ona bardzo odległa od tej obserwowanej w kryształach oraz w symulacjach dla Pb^{2+} ,⁷⁰ dostępne obecnie dane strukturalne są wystarczające do podjęcia badań mających na celu poprawę zdolności DNAzemu 8-17 do wiązania jonów magnezu poprzez racjonalne – oparte na informacjach strukturalnych –

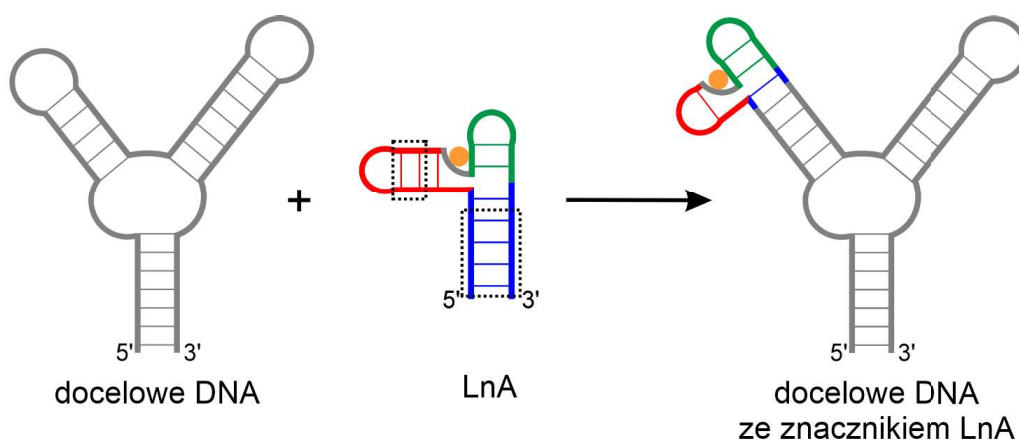
wprowadzanie modyfikowanych chemicznie jednostek nukleotydowych do jego sekwencji. Badania tego typu są obecnie prowadzone w kierowanej przeze mnie grupie badawczej jako bezpośrednia kontynuacja opisanych w pracy **H4** badań strukturalnych.

Opublikowane wyniki mają też duże znaczenie w kontekście wiedzy dotyczącej preferencji strukturalnych cząsteczek DNAzymów w ogóle, gdyż poznane struktury tego typu układów pozostają nadal bardzo nieliczne. Poza strukturami krystalograficznymi DNAzymów 9DB1¹⁸ i 8-17,¹⁹ oraz opisaną w pracy **H4** strukturą NMR tego układu, w międzyczasie pojawiła się w literaturze tylko jedna dodatkowa wysokorozdzielcza struktura cząsteczki DNAzymu – wyznaczona metodami NMR struktura przestrzenna DNAzymu 10-23.²⁰ Już ta bardzo ograniczona seria struktur przestrzennych zmieniła diametralnie nasze postrzeganie tego typu układów. Przed rokiem 2016 (gdy wyznaczona została pierwsza struktura przestrzenna tego typu cząsteczki) bezskuteczne próby poznania struktur trójwymiarowych DNAzymów doprowadziły do pojawienia się w literaturze przekonania, że cząsteczki te prawdopodobnie nie przyjmują dobrze zdefiniowanych struktur przestrzennych, a nawet, że obecność dłuższych fragmentów jednoniciowych może być kluczowa dla mechanizmów ich działania.⁶⁰ Dostępny obecnie zestaw struktur przestrzennych diametralnie odmienił ten paradygmat, gdyż wszystkie spośród nich ujawniły skomplikowane, sztywne architektury trzeciorzędowe. Czy możliwe jest jednak, że ten nowy obraz jest równie niepełny? Potencjalne cząsteczki DNAzymów nieprzyjmujące sztywnych struktur trzeciorzędowych będą naturalnie trudniej poddawały się badaniom metodami biologii strukturalnej, gdyż ta właściwość z jednej strony uniemożliwiała będzie ich krystalizację, z drugiej zaś do jej obserwacji w roztworze niezbędne są więzy strukturalne NMR dalekiego zasięgu, trudno dostępne dla cząsteczek DNA/RNA. Problem ten dotyczy tak naprawdę wszystkich struktur DNA i RNA opartych na elementach typu “multiple way junction”. Elementy tego typu stanowią podstawowy blok budulcowy struktur drugorzędowych przyjmowanych przez najistotniejsze biologicznie, złożone cząsteczki RNA, takie jak mRNA, lncRNA (ang. “long non-coding RNA”) czy też genomowe RNA patogenów wirusowych.^{77–81} Brak metod eksperymentalnych do szybkiej oceny, które spośród obecnych “multiple way junctions” pozostają konformacyjnie labilne, które zaś tworzą sztywne elementy strukturalne oraz jak te preferencje zależą od warunków zewnętrznych (obecność białek, jonów metali itp.) pozostaje w moim odczuciu jedną z istotniejszych barier w przewidywaniu struktur trzeciorzędowych skomplikowanych cząsteczek RNA.

W tym kontekście bardzo istotny, choć jeszcze niezrealizowany, jest potencjał wyników uzyskanych przeze mnie w ramach pracy **H3**. Identyfikacja elementu strukturalnego DNA, zdolnego do indukowania w widmach NMR przesunięć paramagnetycznych, przekładanych na wysokiej jakości dalekozasięgowe więzy strukturalne PCS, otwiera możliwości wykorzystania tych wartościowych efektów w badaniach strukturalnych szerokiego spektrum innych układów DNA oraz RNA. Podstawą takich badań byłaby, jak zaproponowałem już w pracy **H3**, izolacja z rozwiązywanej struktury aptameru LnA miejsca wiązania jonu lantanowca i następnie jego “przeszczepianie” do innych cząsteczek DNA

lub RNA, których właściwości konformacyjne chcielibyśmy zbadać. Operacja taka pozwalałaby na pomiar dalekozasięgowych więzów PCS dla szerokiego spektrum układów DNA/RNA, które w normalnych warunkach nie oddziałują z jonami lantanowców, co znacząco ułatwiłoby badania strukturalne tych układów metodami biomolekularnego NMR.

Rysunek 3.2.1. Schemat mechanizmu „przeszczepiania” znacznika paramagnetycznego opartego na aptamerze LnA do innych cząsteczek DNA w miejsce pętli apikalnych obecnych w ich strukturach. Przerywanymi ramkami oznaczyłem fragmenty struktury LnA potencjalnie możliwe do pominięcia w tym procesie. Rysunek stanowi zmodyfikowaną wersję Figury 9 z pracy **H3**.



Wyznaczone w pracy **H3** cechy miejsca wiązania obecnego w aptamerze LnA czynią je najbardziej właściwym do “przeszczepiania” w miejsce pętli apikalnych obecnych oryginalnie w docelowej cząsteczce DNA, co ilustruje Rysunek 3.2.1. Oznacza to, że do układów, dla których można potencjalnie wprowadzić znaczniki paramagnetyczne oparte na architekturze LnA należą dyskutowane przed momentem cząsteczki DNAzymów, jak również biologicznie istotne cząsteczki RNA o strukturach typu “multiple way junction”. Należy podkreślić, że zmierzone dla takich układów więzy PCS niosłyby kluczowe informacje o ich preferencjach konformacyjnych, niezależnie od tego czy badana cząsteczka przyjmuje sztywną strukturę czy też nie. Bowiem w przypadku obecności zmienności konformacyjnej w układzie, efekty PCS – w odróżnieniu od właściwości widmowych opartych na relaksacji jądrowej takich jak NOE czy PRE – ulegają prostemu uśrednieniu po zestawie konformacji przyjmowanych przez biomolekułę.⁸² Pozwala to na ich wykorzystanie do jednoznacznego wykazania czy obecne w cząsteczce elementy strukturalne tworzą jedną sztywną architekturę trzeciorzędową czy też poruszają się względem siebie i w jakim stopniu, jak wykazano już wielokrotnie dla układów białkowych.⁸³ Zastosowanie więzów PCS pozwoliłoby więc znacząco rozszerzyć możliwości badań strukturalnych NMR dla tak skomplikowanych cząsteczek DNA i RNA. Pilotażowe badania tego typu prowadzone są obecnie w moim zespole. Równolegle prowadzę również badania strukturalne serii innych cząsteczek DNA, dla których wcześniejsze dane literaturowe wykazały zdolność do silnego oddziaływania z jonami lantanowców, lecz nieznane pozostają

położenie i geometria miejsc tych oddziaływań. Celem tych badań jest znalezienie układów zdolnych do wywoływania silnych efektów PCS, potencjalnie o strukturach znacząco innych od LnA. Pozwoliłoby to na stworzenie biblioteki znaczników paramagnetycznych możliwych do wprowadzenia do jeszcze większej liczby docelowych cząsteczek DNA i RNA.

Podsumowując, wykonane przeze mnie badania pozwoliły na identyfikację nowego elementu strukturalnego G-kwadrupleksów RNA, poznanie budowy miejsca oddziaływań jonów lantanowców z DNA, charakteryzującego się rzadko spotykaną siłą i selektywnością oddziaływań oraz na dostarczenie kluczowych informacji strukturalnych niezbędnych do dalszych badań mechanistycznych DNAzemu 8-17. Wniosły więc one, w moim odczuciu, zauważalny wkład w poznanie właściwości struktur kwasów nukleinowych indukowanych wiązaniem jonów metali. Ponadto, dzięki wykazaniu, że jony lantanowców związane do LnA wywołują silne efekty PCS w widmach NMR moje badania otwierają drogę do szerszego zastosowania efektów paramagnetycznych w biologii strukturalnej kwasów nukleinowych.

Bibliografia

1. Schnabl, J. & Sigel, R. K. Controlling ribozyme activity by metal ions. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **14**, 269–275 (2010).
2. Lipfert, J., Doniach, S., Das, R. & Herschlag, D. Understanding nucleic acid-ion interactions. *Annu. Rev. Biochem.* **83**, 813–841 (2014).
3. Draper, D. E. A guide to ions and RNA structure. *RNA* **10**, 335–343 (2004).
4. Zheng, H., Shabalín, I. G., Handing, K. B., Bujnicki, J. M. & Minor, W. Magnesium-binding architectures in RNA crystal structures: validation, binding preferences, classification and motif detection. *Nucleic Acids Res.* **43**, 3789–3801 (2015).
5. Sigel, R. K. O. & Pyle, A. M. Alternative roles for metal ions in enzyme catalysis and the implications for ribozyme chemistry. *Chem. Rev.* **107**, 97–113 (2007).
6. François, J. M., Gerday, C., Prendergast, F. G. & Potter, J. D. Determination of the Ca^{2+} and Mg^{2+} affinity constants of troponin C from eel skeletal muscle and positioning of the single tryptophan in the primary structure. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **14**, 585–593 (1993).
7. Crow, J. P., Sampson, J. B., Zhuang, Y., Thompson, J. A. & Beckman, J. S. Decreased Zinc Affinity of Amyotrophic Lateral Sclerosis-Associated Superoxide Dismutase Mutants Leads to Enhanced Catalysis of Tyrosine Nitration by Peroxynitrite. *J. Neurochem.* **69**, 1936–1944 (1997).
8. Noeske, J., Schwalbe, H. & Wöhnert, J. Metal-ion binding and metal-ion induced folding of the adenine-sensing riboswitch aptamer domain. *Nucleic Acids Res.* **35**, 5262–5273 (2007).
9. Koizumi, M. & Ohtsuka, E. Effects of phosphorothioate and 2-amino groups in hammerhead ribozymes on cleavage rates and Mg^{2+} binding. *Biochemistry* **30**, 5145–5150 (1991).
10. Chowrira, B. M., Berzal-Herranz, A., Keller, C. F. & Burke, J. M. Four ribose 2'-hydroxyl groups essential for catalytic function of the hairpin ribozyme. *J. Biol. Chem.* **268**, 19458–19462 (1993).

11. Erat, M. C. & Sigel, R. K. O. Determination of the Intrinsic Affinities of Multiple Site-Specific Mg^{2+} Ions Coordinated to Domain 6 of a Group II Intron Ribozyme. *Inorg. Chem.* **46**, 11224–11234 (2007).
12. Pan, T., Long, D. M. & Uhlenbeck, O. C. Divalent Metal Ions in RNA Folding and Catalysis. *Cold Spring Harb. Monogr. Arch.* **24**, 271–302 (1993).
13. Qu, H. *et al.* Rapid and label-free strategy to isolate aptamers for metal ions. *ACS Nano* **10**, 7558–7565 (2016).
14. Hofmann, H. P., Limmer, S., Hornung, V. & Sprinzl, M. Ni^{2+} -binding RNA motifs with an asymmetric purine-rich internal loop and a G-A base pair. *RNA* **3**, 1289–1300 (1997).
15. Rajendran, M. & Ellington, A. D. Selection of fluorescent aptamer beacons that light up in the presence of zinc. *Anal. Bioanal. Chem.* **390**, 1067–1075 (2007).
16. Johnson-Buck, A. E., McDowell, S. E. & Walter, N. G. Metal Ions: Supporting Actors in the Playbook of Small Ribozymes. *Struct. Catal. Roles Met. Ions RNA* 175–196 (2011).
17. Murray, J. B., Seyhan, A. A., Walter, N. G., Burke, J. M. & Scott, W. G. The hammerhead, hairpin and VS ribozymes are catalytically proficient in monovalent cations alone. *Chem. Biol.* **5**, 587–595 (1998).
18. Ponce-Salatierra, A., Wawrzyniak-Turek, K., Steuerwald, U., Höbartner, C. & Pena, V. Crystal structure of a DNA catalyst. *Nature* **529**, 231–234 (2016).
19. Liu, H. *et al.* Crystal structure of an RNA-cleaving DNAzyme. *Nat. Commun.* **8**, 2006 (2017).
20. Borggräfe, J. *et al.* Time-resolved structural analysis of an RNA-cleaving DNA catalyst. *Nature* **601**, 144–149 (2021).
21. Bhattacharyya, D., Arachchilage, G. M. & Basu, S. Metal Cations in G-Quadruplex Folding and Stability. *Front. Chem.* **4**, 38 (2016).
22. Miyake, Y. *et al.* MercuryII-mediated formation of thymine-HgII-thymine base pairs in DNA duplexes. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 2172–2173 (2006).
23. Ono, A. *et al.* Specific interactions between silver(I) ions and cytosine–cytosine pairs in DNA duplexes. *Chem. Commun.* 4825–4827 (2008).
24. Huang, P.-J. J., Vazin, M., Lin, J. J., Pautler, R. & Liu, J. Distinction of individual lanthanide ions with a DNAzyme beacon array. *ACS Sensors* **1**, 732–738 (2016).
25. Feig, A. L., Scott, W. G. & Uhlenbeck, O. C. Inhibition of the hammerhead ribozyme cleavage reaction by site-specific binding of Tb(III). *Science* **279**, 81–84 (1998).
26. Edogun, O., Nguyen, N. H. & Halim, M. Fluorescent single-stranded DNA-based assay for detecting unchelated gadolinium(III) ions in aqueous solution. *Anal. Bioanal. Chem.* **408**, 4121–4131 (2016).
27. Wijmenga, S. S. & van Buuren, B. N. M. The use of NMR methods for conformational studies of nucleic acids. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **32**, 287–387 (1998).
28. Otting, G. Protein NMR using paramagnetic ions. *Annu. Rev. Biophys.* **39**, 387–405 (2010).
29. Tjandra, N., Garrett, D. S., Gronenborn, A. M., Bax, A. & Clore, G. M. Defining long range order in NMR structure determination from the dependence of heteronuclear relaxation times on rotational diffusion anisotropy. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 443–449 (1997).
30. Chen, K. & Tjandra, N. The use of residual dipolar coupling in studying proteins by NMR. *Top. Curr. Chem.* **326**, 47–67 (2012).
31. Miao, Q. *et al.* Paramagnetic Chemical Probes for Studying Biological Macromolecules. *Chem. Rev.*

- 122**, 9571–9642 (2021).
32. Täubert, S. *et al.* Lanthanide Tagging of Oligonucleotides to Nucleobase for Paramagnetic NMR. *ChemBioChem* **21**, 3333–3337 (2020).
 33. Wu, Z. *et al.* New lanthanide tag for the generation of pseudocontact shifts in DNA by site-specific ligation to a phosphorothioate group. *Bioconjug. Chem.* **28**, 1741–1748 (2017).
 34. Shelke, S. A. & Sigurdsson, S. T. Site-Directed Spin Labelling of Nucleic Acids. *European J. Org. Chem.* **2012**, 2291–2301 (2012).
 35. Williamson, M. P. Using chemical shift perturbation to characterise ligand binding. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **73**, 1–16 (2013).
 36. Krepl, M. *et al.* An intricate balance of hydrogen bonding, ion atmosphere and dynamics facilitates a seamless uracil to cytosine substitution in the U-turn of the neomycin-sensing riboswitch. *Nucleic Acids Res.* **46**, 6528–6543 (2018).
 37. Colmenarejo, G. & Tinoco, I. Structure and thermodynamics of metal binding in the P5 helix of a group I intron ribozyme. *J. Mol. Biol.* **290**, 119–135 (1999).
 38. Marathias, V. M. *et al.* Determination of the Number and Location of the Manganese Binding Sites of DNA Quadruplexes in Solution by EPR and NMR in the Presence and Absence of Thrombin. *J. Mol. Biol.* **260**, 378–394 (1996).
 39. Cetiner, E. C. *et al.* Paramagnetic-iterative relaxation matrix approach: extracting PRE-restraints from NOESY spectra for 3D structure elucidation of biomolecules. *J. Biomol. NMR* **73**, 699–712 (2019).
 40. Bertini, I., Luchinat, C., Nagulapalli, M., Parigi, G. & Ravera, E. Paramagnetic relaxation enhancement for the characterization of the conformational heterogeneity in two-domain proteins. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **14**, 9149–9156 (2012).
 41. Gochin, M. A high-resolution structure of a DNA-chromomycin-co(II) complex determined from pseudocontact shifts in nuclear magnetic resonance. *Structure* **8**, 441–452 (2000).
 42. Di Antonio, M. *et al.* Single-molecule visualization of DNA G-quadruplex formation in live cells. *Nat. Chem.* **12**, 832–837 (2020).
 43. Hänsel-Hertsch, R., Di Antonio, M. & Balasubramanian, S. DNA G-quadruplexes in the human genome: detection, functions and therapeutic potential. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 279–284 (2017).
 44. Webba da Silva, M. Geometric Formalism for DNA Quadruplex Folding. *Chem. - A Eur. J.* **13**, 9738–9745 (2007).
 45. Largy, E., Mergny, J. L. & Gabelica, V. Role of Alkali Metal Ions in G-Quadruplex Nucleic Acid Structure and Stability. *Met. Ions Life Sci.* **16**, 203–258 (2016).
 46. Karsisiotis, A. I., O’Kane, C. & Webba da Silva, M. DNA quadruplex folding formalism – A tutorial on quadruplex topologies. *Methods* **64**, 28–35 (2013).
 47. Malgowska, M., Czajczynska, K., Gudanis, D., Tworak, A. & Gdaniec, Z. Overview of the RNA G-quadruplex structures. *Acta Biochim. Pol.* **63**, 609–621 (2016).
 48. Mendoza, O., Porrini, M., Salgado, G. F., Gabelica, V. & Mergny, J.-L. Orienting Tetramolecular G-Quadruplex Formation: The Quest for the Elusive RNA Antiparallel Quadruplex. *Chem. - A Eur. J.* **21**, 6732–6739 (2015).
 49. Pan, B., Xiong, Y., Shi, K., Deng, J. & Sundaralingam, M. Crystal Structure of an RNA Purine-Rich

- Tetraplex Containing Adenine Tetrads: Implications for Specific Binding in RNA Tetraplexes. *Structure* **11**, 815–823 (2003).
50. Patel, P. K., Bhavesh, N. S. & Hosur, R. V. NMR Observation of a Novel C-Tetrad in the Structure of the SV40 Repeat Sequence GGGCGG. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **270**, 967–971 (2000).
 51. Patel, P. & Hosur, R. V. NMR observation of T-tetrads in a parallel stranded DNA quadruplex formed by *Saccharomyces cerevisiae* telomere repeats. *Nucleic Acids Res.* **27**, 2457–2464 (1999).
 52. Cheong, C. & Moore, P. B. Solution structure of an unusually stable RNA tetraplex containing G- and U-quartet structures. *Biochemistry* **31**, 8406–8414 (1992).
 53. Malgowska, M. *et al.* Distinctive structural motifs of RNA G-quadruplexes composed of AGG, CGG and UGG trinucleotide repeats. *Nucleic Acids Res.* **42**, 10196–10207 (2014).
 54. Fyfe, A. C., Dunten, P. W., Martick, M. M. & Scott, W. G. Structural Variations and Solvent Structure of r(UGGGGU) Quadruplexes Stabilized by Sr^{2+} Ions. *J. Mol. Biol.* **427**, 2205–2219 (2015).
 55. Xu, Y., Ishizuka, T., Kimura, T. & Komiyama, M. A U-Tetrad Stabilizes Human Telomeric RNA G-Quadruplex Structure. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 7231–7233 (2010).
 56. Zhou, J. *et al.* Unexpected Position-Dependent Effects of Ribose G-Quartets in G-Quadruplexes. *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 7768–7779 (2017).
 57. Tuerk, C. & Gold, L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* **249**, 505–510 (1990).
 58. Ellington, A. D. & Szostak, J. W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* **346**, 818–822 (1990).
 59. Fu, P. K.-L. & Turro, C. Energy transfer from nucleic acids to Tb(III): selective emission enhancement by single DNA mismatches. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 1–7 (1998).
 60. Silverman, S. K. Catalytic DNA (deoxyribozymes) for synthetic applications—current abilities and future prospects. *Chem. Commun.* **30**, 3467–3485 (2008).
 61. Silverman, S. K. Catalytic DNA: Scope, Applications, and Biochemistry of Deoxyribozymes. *Trends Biochem. Sci.* **41**, 595–609 (2016).
 62. Zhou, W., Ding, J. & Liu, J. Theranostic DNAzymes. *Theranostics* **7**, 1010–1025 (2017).
 63. Wang, F., Saran, R. & Liu, J. Tandem DNAzymes for mRNA cleavage: Choice of enzyme, metal ions and the antisense effect. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **25**, 1460–1463 (2015).
 64. Schlosser, K. & Li, Y. A Versatile Endoribonuclease Mimic Made of DNA: Characteristics and Applications of the 8-17 RNA-Cleaving DNAzyme. *ChemBioChem* **11**, 866–879 (2010).
 65. Mazumdar, D. *et al.* Activity, Folding and Z-DNA Formation of the 8-17 DNAzyme in the Presence of Monovalent Ions. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 5506–5515 (2009).
 66. Kim, H.-K. *et al.* Metal-Dependent Global Folding and Activity of the 8-17 DNAzyme Studied by Fluorescence Resonance Energy Transfer. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 6896–6902 (2007).
 67. Kim, H. K., Rasnik, I., Liu, J., Ha, T. & Lu, Y. Dissecting metal ion-dependent folding and catalysis of a single DNAzyme. *Nat. Chem. Biol.* **3**, 763–768 (2007).
 68. Zuker, M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* **31**, 3406–3415 (2003).
 69. Brown, A. K., Li, J., Pavot, C. M.-B. & Lu, Y. A Lead-Dependent DNAzyme with a Two-Step

- Mechanism. *Biochemistry* **42**, 7152–7161 (2003).
70. Ekesan, Ş. & York, D. M. Dynamical ensemble of the active state and transition state mimic for the RNA-cleaving 8–17 DNAzyme in solution. *Nucleic Acids Res.* **47**, 10282–10295 (2019).
 71. Winnerdy, F. R. *et al.* Unprecedented hour-long residence time of a cation in a left-handed G-quadruplex. *Chem. Sci.* **12**, 7151–7157 (2021).
 72. Trajkovski, M., Ket, P. & Plavec, J. Cation localization and movement within DNA thrombin binding aptamer in solution. *Org. Biomol. Chem.* **7**, 4677–4684 (2009).
 73. Beger, R. D., Marathias, V. M., Volkman, B. F. & Bolton, P. H. Determination of internuclear angles of DNA using paramagnetic-assisted magnetic alignment. *J. Magn. Reson.* **135**, 256–259 (1998).
 74. Galezowska, E., Gluszyńska, A. & Juskowiak, B. Luminescence study of G-quadruplex formation in the presence of Tb³⁺ ion. *J. Inorg. Biochem.* **101**, 678–685 (2007).
 75. Kim, H.-K., Li, J., Nagraj, N. & Lu, Y. Probing metal binding in the 8-17 DNAzyme by Tb III luminescence spectroscopy. *Chem. - A Eur. J.* **14**, 8696–8703 (2008).
 76. Schmuck, J. F., Borggräfe, J. & Etzkorn, M. The dynamic world of the 8–17 DNAzyme. *Nat. Commun.* **15**, 1–3 (2024).
 77. Cao, C. *et al.* The architecture of the SARS-CoV-2 RNA genome inside virion. *Nat. Commun.* **12**, 1–14 (2021).
 78. Imai, S., Suzuki, H., Fujiyoshi, Y. & Shimada, I. Dynamically regulated two-site interaction of viral RNA to capture host translation initiation factor. *Nat. Commun.* **14**, 1–14 (2023).
 79. Walter, F., Murchie, A. I. H. & Lilley, D. M. J. Folding of the four-way RNA junction of the hairpin ribozyme. *Biochemistry* **37**, 17629–17636 (1998).
 80. Novikova, I. V., Hennelly, S. P., Tung, C. S. & Sanbonmatsu, K. Y. Rise of the RNA Machines: Exploring the Structure of Long Non-Coding RNAs. *J. Mol. Biol.* **425**, 3731–3746 (2013).
 81. AbuQattam, A., Serrano-Quílez, J., Rodríguez-Navarro, S. & Gallego, J. An exon three-way junction structure modulates splicing and degradation of the SUS1 yeast pre-mRNA. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* **1861**, 673–686 (2018).
 82. Andrałojć, W. *et al.* Information content of long-range NMR data for the characterization of conformational heterogeneity. *J. Biomol. NMR* **62**, (2015).
 83. Bertini, I. *et al.* Conformational space of flexible biological macromolecules from average data. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 13553–13558 (2010).

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

Na przestrzeni dotychczasowej kariery naukowej prowadziłem badania w jednej krajowej instytucji badawczej - Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN - oraz w trzech instytucjach zagranicznych - Uniwersytecie we Florencji (Włochy), Synchrotronie SOLEIL (Francja) oraz

Uniwersytecie w Lejdzie (Holandia). Poniżej przedstawiam krótkie podsumowanie tematyki i wyników działalności w poszczególnych instytucjach:

Instytut Chemii Bioorganicznej PAN (zatrudnienie 2017-)

Moja działalność naukowa w IChB PAN koncentruje się na badaniach struktury, funkcji i oddziaływań kwasów nukleinowych za pomocą spektroskopii NMR oraz szeregu pomocniczych technik biofizycznych. Prowadzone przeze mnie badania dotyczą szerokiego spektrum zagadnień i typów struktur DNA i RNA. Na przestrzeni lat zajmowałem się badaniem m. in. czynników determinujących stabilność G-kwadrupleksów RNA, wpływu modyfikowanych jednostek nukleotydowych na struktury dupleksów i spinek RNA oraz oddziaływań małych cząsteczek z dupleksami DNA. W ostatnim czasie najistotniejszymi tematami przewodnimi mojej działalności jest poszukiwanie i charakterystyka strukturalna motywów strukturalnych DNA zdolnych do specyficznego wiązania jonów lantanowców oraz wysokorozdzielcze badania strukturalne cząsteczek DNAzymów mające na celu zrozumienie mechanizmów ich działania. Efektem mojej pracy badawczej w IChB PAN jest 15 publikacji naukowych (pozycje 8-22 na liście publikacji w punkcie I.4 wykazu osiągnięć).

Uniwersytet we Florencji (zatrudnienie 2013-2016)

Podczas pracy na Uniwersytecie we Florencji moja działalność naukowa związana była z tematyką wykorzystania efektów paramagnetycznych w badaniach struktury i dynamiki biomolekuł za pomocą spektroskopii NMR. Najważniejszym osiągnięciem z tego okresu pracy i podstawą mojej pracy doktorskiej było rozwinięcie metody pozwalającej na częściową rekonstrukcję zbioru konformacji przyjmowanych przez wielodomenowe polimery biologiczne, na podstawie zmierzonych dla nich uśrednionych przez ruch danych NMR. Metoda ta została zastosowana m.in. do ustalenia preferowanych konformacji białka dwudomenowego kalmoduliny oraz elementu HIV1 TAR RNA o strukturze tzw. "two-way junction", jak również do zidentyfikowania stanów przejściowych o bardzo niskiej populacji, w kompleksie białko-białko. Efektem tego etapu mojej pracy naukowej jest 6 publikacji naukowych (pozycje 2-7 na liście publikacji w punkcie I.4 wykazu osiągnięć) oraz jeden rozdział w książce.

Synchrotron SOLEIL (staż magisterski 2013)

Podczas stażu magisterskiego w Synchrotronie SOLEIL moja praca badawcza związana była z próbą eksperymentalnej obserwacji tzw. rotacyjnego efektu Dopplera w widmach spektroskopii fotoelektronów. Efektem tych badań jest jedna publikacja naukowa (pozycja 1 na liście publikacji w punkcie I.4 wykazu osiągnięć). Moim najważniejszym wkładem w tę pracę było opracowanie metody dekonwolucji widm fotoelektronów cząsteczki HCl na pasma pochodzące od poszczególnych stanów rotacyjnych.

Uniwersytet w Lejdzie (dwa staże 2014 i 2016, w sumie ponad 6 miesięcy)

Mój pobyt na Uniwersytecie w Lejdzie odbywał się w ramach stażów zaplanowanych w programie studiów doktorskich i związany był z zastosowaniem rozwijanej przeze mnie metody analizy danych paramagnetycznego NMR do zidentyfikowania serii konformacji o niskiej populacji (ang. *minor states*) w kompleksie białko-białko. Efektem tych badań jest jedna publikacja naukowa (pozycja 6 na liście publikacji w punkcie I.4 wykazu osiągnięć).

6. *Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.*

Prowadzenie wykładów i zajęć ze studentami:

Stanowiska, na których byłem zatrudniony na przestrzeni dotychczasowej kariery naukowej nie przewidywały prowadzenia działalności dydaktycznej w ramach obowiązków służbowych. Tym niemniej z własnej inicjatywy na przestrzeni lat angażowałem się w organizację i prowadzenie zajęć dydaktycznych związanych z tematyką spektroskopii NMR. Zajęcia te odbywały się zarówno w ramach cykli nauczania poznańskich uczelni i instytutów badawczych (punkty 1-3 poniżej) jak

- 1) Politechnika Poznańska, wykłady i zajęcia laboratoryjne ze spektroskopii NMR na kierunku Inżynieria Farmaceutyczna w ramach przedmiotu „*Metody spektroskopowe produktów naturalnych*” w latach akademickich 2019/2020, 2020/2021, 2021/2022, 2022/2023
- 2) Uniwersytet im. Adama Mickiewicza - Centrum NanoBioMedyczne, wykład i ćwiczenia ze spektroskopii NMR dla uczestników „*Środowiskowych interdyscyplinarnych studiów doktoranckich w zakresie nanotechnologii*” (POWR.03.02.00-00-I032/16), w latach akademickich 2018/2019 i 2019/2020
- 3) Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, wykłady „*Modern Methods of NMR Spectroscopy*” dla słuchaczy Środowiskowego Studium Doktoranckiego ICHB PAN / Poznańskiej Szkoły Doktorskiej Instytutów Polskiej Akademii Nauk; w latach akademickich 2020/2021 i 2024/2025
- 4) „AMPERE Nuclear Magnetic Resonance Summer School” (organizowana przez Centrum NanoBioMedyczne UAM), warsztaty pod tytułem: “*Two-dimensional NMR spectroscopy – an introduction*”, edycje: 2018, 2019, 2022
- 5) Instytut Chemii Bioorganicznej PAN (Zakład Biomolekularnego NMR), warsztaty „*Jednodniowa szkoła 2D NMR*”, współorganizacja i prowadzenie wykładu oraz ćwiczeń praktycznych, 24-26.04.2019 (trzy edycje)

Opieka naukowa nad magistrantami i doktorantami:

- Julia Wieruszewska, promotor pracy magisterskiej (obecnie w recenzjach):
„Wyznaczenie struktury przestrzennej DNAzemu 8-17 w celu zrozumienia jego mechanizmu działania”, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Fizyki
- mgr Aleksandra Pawłowicz, opieka naukowa nad doktorantem jako promotor pomocniczy, 2021-
- mgr Ewa Połomska, opieka naukowa nad doktorantem jako promotor pomocniczy, 2022-
- mgr Mikołaj Podlewski, opieka naukowa nad doktorantem jako promotor pomocniczy, 2022-

Wymieniona trójka doktorantów została zatrudniona w całości ze środków pozyskanych przeze mnie z NCN w ramach konkursów OPUS19 i OPUS22.



.....
(podpis wnioskodawcy)