

Instytut Chemii Bioorganicznej
Polskiej Akademii Nauk

***Badania równowag konformacyjnych
cząsteczek RNA zbudowanych z
trójnukleotydowych powtórzeń CGG***

Dorota Gudanis

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

Poznań, 2012

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania Prof. dr hab. Zofii Gdaniec za wskazanie interesującego tematu niniejszej pracy, wszechstronną pomoc i okazaną cierpliwość w trakcie jej realizacji.

Dziękuję także wszystkim członkom Pracowni Chemii Strukturalnej Kwasów Nukleinowych, zwłaszcza współpracownikom z Zespołu Biomolekularnego NMR za pomoc podczas wykonywania niniejszej pracy

Mojej rodzinie za nieustające wsparcie

Badania prowadzone w ramach niniejszej pracy doktorskiej finansowane były z grantów:

Grant MNiSW „Struktura, równowagi konformacyjne i oddziaływanie z jonami metalu cząsteczek RNA utworzonych z trójnukleotydowych powtórzeń typu CXG” Nr 3 T09A 071 29

Grant promotorski „Badania równowag konformacyjnych cząsteczek RNA zbudowanych z trójnukleotydowych powtórzeń CGG”, Nr N N301 255536

Część prezentowanych przeze mnie wyników została zawarta w komunikatach:

- 1). D. Gudanis, R. Kierzek, G. Dominiak, Z. Gdaniec
Conformational equilibria of RNA fragments containing CNG trinucleotide repeats.
II Sympozjum „Magnetyczny Rezonans Jądrowy w Chemii, Biologii i Medycynie, Warszawa, 2006
- 2). Z. Gdaniec, D. Gudanis, G. Dominiak, R. Kierzek
Conformational equilibria of RNA fragments containing CNG trinucleotide repeats.
Advanced Materials as Studied by Spectroscopic and Diffraction Techniques, Wilno, 2006
- 3). D. Gudanis, R. Kierzek, Z. Gdaniec
Impact of base substitutions on the stability of RNA fragments containing trinucleotide CGG repeats.
III Sympozjum „Magnetyczny Rezonans Jądrowy w Chemii, Biologii i Medycynie”, Warszawa, 2007
- 4). D. Gudanis, R. Kierzek, Z. Gdaniec
Impact of base substitutions on the stability of RNA fragments containing trinucleotide CGG repeats.
XL Ogólnopolskie Seminarium „Magnetyczny Rezonans Jądrowy i Jego Zastosowania, Kraków, 2007
- 5). D. Gudanis, R. Kierzek, Z. Gdaniec
Conformational Analysis of RNA Trinucleotide CGG repeats.
Magnetic Resonance Conference- Euromar , St. Petersburg, 2008
- 6). D. Gudanis, R. Kierzek, Z. Gdaniec
Influence of base modification on the stability of RNA tetramolecular quadruplexes.
IV Sympozjum „Magnetyczny Rezonans Jądrowy w Chemii, Biologii i Medycynie”, Warszawa, 2008
- 7). D. Gudanis, R. Kierzek, Z. Gdaniec
Structural effect of chemical modification of CGG trinucleotide repeats.
Symposium Magnetic Moments in Central Europe, Otočec, 2009
- 8). D. Gudanis, R. Kierzek, Z. Gdaniec
Influence of phosphate on RNA quadruplex formation.
V Sympozjum „Magnetyczny Rezonans Jądrowy w Chemii, Biologii i Medycynie”, Warszawa, 2009
- 9). D. Gudanis, M. Małgowska, Z. Gdaniec
The effect of chain length, modification and solution conditions on the structure of oligoribonucleotides tandem NGG repeats.
"Frontiers in Structural Biology of RNAs and RNPs" , Poznań, 2010
- 10). D. Gudanis, M. Małgowska, Z. Gdaniec
Influence of different 5' and 3' caps on RNA quadruplex formation.
VI Sympozjum „Magnetyczny Rezonans Jądrowy w Chemii, Biologii i Medycynie”, Warszawa, 2010
- 11). D. Gudanis, Z. Gdaniec
Influence of concentration of r(CG G) trinucleotide repeats on duplex-quadruplex equilibria.
2nd International training school on G-quadruplexes, “Self-assembled guanosine structures for molecular electronic devices”, Domaine de Sol Cress, 2011
- 12). M. Małgowska, D. Gudanis, Z. Gdaniec
Structural Polymorphism of RNA Quadruplexes formed by trinucleotide CGG, AGG and UGG repeats
2nd International training school on G-quadruplexes, “Self-assembled guanosine structures for molecular electronic devices”, Domaine de Sol Cress, 2011

SPIS TREŚCI

Spis stosowanych skrótów	7
I. CEL PRACY DOKTORSKIEJ	9
II. CZĘŚĆ LITERATUROWA	13
II.1. Budowa i różnorodność struktur RNA	13
II.2. Kwadrupleksy DNA i RNA – definicja, topologia, występowanie, ich funkcja oraz identyfikacja	22
II.2.1. Topologia G-kwadrupleksów	24
II.2.2. Czynniki wpływające na stabilność kwadrupleksów	20
II.2.3. Występowanie kwadrupleksów	30
II.2.4. Nietypowe tetrazy, pentady i heksady występujące w kwadrupleksach	43
II.2.5. Inne, nietypowe struktury kwadrupleksów	47
II.2.6. Podsumowanie	49
II.3. Metody stosowane do badań kwadrupleksów	50
II.3.1. Metody spektroskopii NMR w analizie strukturalnej kwadrupleksów	50
II.3.2. Krystalografia	61
II.3.3. Dynamika molekularna	61
II.3.4. Metody spektroskopii UV i CD w analizie strukturalnej kwadrupleksów	61
II.3.5. Spektrometria mas	66
II.3.6. Metody biochemiczne	68
II.4. Choroby neurologiczne wywołane ekspansją trójnukleotydowych powtórzeń CGG	70
II.4.1. Zespół drżenia i ataksji związany z zespołem łamliwego chromosomu X (FXTAS)	74
II.4.2. Przedwczesne wygaszanie czynności jajników (POF)	75
II.4.3. Zespół łamliwego chromosomu X (FXS)	75
II.5. Struktury drugorzędowe cząsteczek zbudowanych z trójnukleotydowych powtórzeń r(CG_n)	75
II.6. Struktury trzeciorzędowe cząsteczek zbudowanych z trójnukleotydowych powtórzeń r(CG_n)	81
II.7. Struktury drugorzędowe cząsteczek zbudowanych z trójnukleotydowych powtórzeń d(CG_n)	83
II.8. Struktury trzeciorzędowe cząsteczek zbudowanych z trójnukleotydowych powtórzeń d(CG_n)	84
II.9. Właściwości termodynamiczne powtórzeń CGG	86
III. OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ WŁASNYCH	89
III.1. Synteza i analiza NMR nukleozydów modyfikowanych w pozycji C8	89
III.2. Analiza cząsteczek RNA zawierających modyfikowane reszty ^{Br}G oraz ^{Me}G	92
III.2.1. Analiza widm ¹ H NMR cząsteczek RNA zawierających modyfikację ^{Br} G lub ^{Me} G	101

III.2.2.	Zależność temperaturowa widm ^1H NMR cząsteczek RNA zawierających modyfikację $^{\text{Me}}\text{G}$ lub $^{\text{Br}}\text{G}$	120
III.2.3.	Wpływ typu soli i siły jonowej roztworu na widma ^1H NMR cząsteczek RNA zawierających modyfikację $^{\text{Me}}\text{G}$ lub $^{\text{Br}}\text{G}$	122
III.2.4.	Wpływ stężenia RNA na widma ^1H NMR cząsteczek RNA zawierających modyfikację $^{\text{Me}}\text{G}$ lub $^{\text{Br}}\text{G}$	126
III.2.5.	Widma masowe cząsteczek RNA zawierających modyfikację $^{\text{Me}}\text{G}$ lub $^{\text{Br}}\text{G}$	128
III.2.6.	Model struktury antyrównoległego kwadrupleksu	131
III.3.	Analiza cząsteczek RNA zawierających oprócz modyfikacji $^{\text{Me}}\text{G}$ i $^{\text{Br}}\text{G}$ dodatkowo resztę inozyny lub grupę fosforanową na końcu 5'	133
III.4.	Analiza cząsteczki RNA zbudowanej z powtórzeń CGG, zawierającej modyfikację $^{\text{Br}}\text{G}$ oraz pętle.	143
III.5.	Analiza cząsteczek zbudowanych z dwóch powtórzeń CGG, zawierających różne sekwencje flankujące	146
III.6.	Analiza cząsteczki RNA zawierającej dodatkową grupę fosforanową na końcu 5'	167
III.7.	Analiza równowag konformacyjnych cząsteczek $\text{G}(\text{CCG})_n\text{C}$, $\text{G}(\text{CGG})_n\text{C}$ oraz $\text{G}(\text{CGG})_n\text{C}/\text{G}(\text{CCG})_n\text{C}$ ($n = 2-4$)	169
IV.	PODSUMOWANIE	173
V.	DYSKUSJA	179
VI.	MATERIAŁY I METODY	193
VI.1.	Synteza chemiczna	193
VI.2.	Przygotowanie RNA do badań	194
VI.2.1.	Usunięcie grup ochronnych oraz rozdzielenie cząsteczek RNA	194
VI.2.2.	Oczyszczenie cząsteczek RNA od niskocząsteczkowych związków	197
VI.3.	Bufory i metody standardowe stosowane w spektroskopii NMR	199
VI.4.	Materiały i metody standardowe stosowane do elektroforezy	209
VI.4.1.	Znakowanie kwasów nukleinowych	210
VI.4.2.	Elektroforeza kwasów rybonukleinowych w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących	211
VI.4.3.	Elektroforeza kwasów rybonukleinowych w żelu poliakrylamidowym w warunkach niedenaturujących	211
VI.5.	Pomiary termodynamiczne oraz krzywe topnienia przy 295 nm	212
VI.6.	Absorpcyjne widma różnicowe (TDS)	213
VI.7.	Widma dichroizmu kołowego (CD)	213
VI.8.	Spektrometria mas (MS)	214
VI.9.	X-plor	215
VI.10.	Ważniejsza aparatura	216
VII.	LITERATURA	217

Spis najczęściej stosowanych skrótów

ALT	- alternatywny mechanizm wydłużania telomerów (ang. <i>alternative lengthening of telomeres</i>)
APS	- nadsiarczan amonu, (ang. <i>ammonium persulfate</i>)
BRACO-19	- cząsteczka stabilizująca kwadrupeksy
^{Br}G	- 8-bromoguanozyna
CD	- spektroskopia dichroizmu kołowego (ang. <i>circular dichroism</i>)
COSY	- widmo dwuwymiarowe (ang. <i>COrrrelation SpectroscopY</i>)
c.p.m.	- zliczenia rozpadów promieniotwórczych na minutę
DEPC	- ester dietylowy kwasu pirowęglowego
DMF	- dimetyloformamid
DMS	- siarczek dimetylu
DOSY	- widmo pseudo-2D (ang. <i>Diffusion Ordered Spectroscopy</i>)
DQF-COSY	- COSY z filtrem dwukwantowym (ang. <i>Double Quantum Filtered Correlation SpectroscopY</i>)
DNA	- kwas deoksyrybonukleinowy
B-DNA	- forma B kwasu deoksyrybonukleinowego
Z-DNA	- forma Z (lewoskrętna) kwasu deoksyrybonukleinowego
EDTA	- kwas wersenowy (ang. <i>EthyleneDiamineTetraacetic Acid</i>)
ESI-MS	- spektrometria mas, metoda jonizacji elektrorozpylenie (ang. <i>electrospray mass spectrometry</i>)
FMR1	- gen (ang. <i>Fragile X Mental Retardation 1</i>)
FMRP	- białko (ang. <i>Fragile X Mental Retardation Protein</i>)
FXTAS	- zespół drżenia i ataksji związany z zespołem łamliwego chromosomu X (ang. <i>Fragile X Associated Tremor/Ataxia Syndrome</i>)
FXS	- zespół łamliwego chromosomu X (ang. <i>Fragile X Syndrome</i>)
GIST	- guz podścieliskowy przewodu pokarmowego
HMBC	- widmo dwuwymiarowe (ang. <i>Heteronuclear Multiple Bond Coherence</i>)
HPLC	- wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HSQC	- widmo dwuwymiarowe (ang. <i>Heteronuclear single quantum correlation</i>)
hTERT	- podjednostka białkowa ludzkiej telomerazy
LNA	- reszty nukleozydowe o zamkniętej konformacji pierścienia cukrowego (ang. <i>locked nucleic acid</i>)
MALDI-TOF	- jonizacja przez resorpcję laserową w stałej matrycy - czas przelotu (ang. <i>matrix-assisted laser desorption/ionization - time of flight</i>)

^{Me}G	- 8-metyloguanozyna
6MI	- 6-metyloizoksantoferyna
MS	- spektrometria mas (ang. <i>mass spectrometry</i>)
WMCO	- wartości graniczne masy cząsteczkowej
NHE III	- element kontrolujący transkrypcję (ang. <i>nuclease hypersensitivity element III</i>)
NMR	- spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (ang. <i>nuclear magnetic resonance Spectroscopy</i>)
NOE	- efekt Overhausera
NOESY	- widmo dwuwymiarowe (ang. <i>Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>)
OD	- gęstość optyczna (ang. <i>optical density</i>)
ORF	- otwarta ramka odczytu (ang. <i>Open Reading Frame</i>)
PAGE	- elektroforeza w żelu poliakrylamidowym (ang. <i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
PDB	- baza danych (ang. <i>Protein Data Bank</i>)
PEG	- glikol polietylenowy
PNA	- kwas peptydonukleinowy (ang. <i>Peptide Nucleic Acid</i>)
POF	- przedwczesne wygaszenie czynności jajników (ang. <i>Premature Ovarian Failure</i>)
POT1	- białko (ang. <i>protection of telomeres</i>)
RNA	- kwas rybonukleinowy
A-RNA	- forma A kwasu rybonukleinowego
mRNA	- matrycowy RNA (ang. <i>messenger RNA</i>)
siRNA	- małe interferencyjne RNA (ang. <i>small interfering RNA</i>)
Z-RNA	- forma Z (lewoskrętna) kwasu rybonukleinowego
SSR	- proste powtórzenia sekwencji (ang. <i>Simple Sequence Repeats</i>)
STR	- krótkie powtórzenia tandemowe (ang. <i>Short Tandem Repeats</i>)
TBE	- bufor boranowy (Tris-boran-EDTA)
TDS	- absorpcyjne widma różnicowe (ang. <i>Thermal Difference Spectra</i>)
TEBPα, β	- białka (ang. <i>telomere end binding proteins</i>)
TEMED	- N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina
TERPA	- RNA, które zawiera powtórzenia telomerowe (ang. <i>telomeric repeat-containing RNA</i>)
THF	- tetrahydrofuran
TLC	- cienkowarstwowa chromatografia cieczowa (ang. <i>thin layer chromatography</i>)
TNRs	- trójnukleotydowe powtórzenia (ang. <i>Trinucleotide Repeats</i>)
TOCSY	- widmo dwuwymiarowe (ang. <i>Total COrrelation Spectroscopy</i>)
TREDS	- grupa chorób neurodegeneracyjnych (ang. <i>Triplet Repeat Expansion Diseases</i>)
UTR	- niepodlegające translacji końcowe rejony RNA (ang. <i>untranslated region</i>)
UV	- promieniowanie ultrafioletowe

I. CEL PRACY DOKTORSKIEJ

Badania, których wyniki stały się podstawą prezentowanej rozprawy doktorskiej wykonałam w Zespole Biomolekularnego NMR, Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu pod kierunkiem prof. dr hab. Zofia Gdaniec. Badania prowadzone w tym zespole związane są między innymi z właściwościami cząsteczek RNA, zbudowanych z powtórzeń CNG oraz NGG.

Celem nadrzędnym mojej rozprawy było poznanie preferowanych struktur w roztworze dla cząsteczek RNA zbudowanych z 2 i 4 powtórzeń CGG (tab. 1). W dupleksach powstałych w wyniku asocjacji dwóch identycznych cząsteczek występuje szereg pojedynczych niedopasowań G:G, oddzielonych od siebie tylko o dwie pary G:C. Dla cząsteczek zbudowanych z powtórzeń CGG brak było danych, które pozwoliłyby ustalić, jakiego typu oddziaływania występują w roztworze pomiędzy niedopasowaniami G:G. W kryształach cząsteczki G-C^{Br}GGCGG-C oraz G-CGGCGG-C tworzą dupлексы (1), jednak ich profil strukturalny może różnić się w roztworze. Dotychczas nie jest znana żadna struktura trzeciorzędowa cząsteczek RNA, zbudowanych z powtórzeń CGG w roztworze. Wiedza o tym, jakie struktury są preferowane dla takich cząsteczek w roztworze, w warunkach zbliżonych do fizjologicznych, jest kluczowa dla projektowania efektywnej terapii zespołu łamliwego chromosomu X (FXS, ang. *Fragile X Syndrome*), jak także zespołu drżenia i ataksji związanych z zespołem łamliwego chromosomu X (FXTAS, ang. *Fragile X Associated Tremor/Ataxia Syndrome*). Obie te choroby należą do grupy neurodegeneracyjnych chorób TREDs (ang. *Triplet Repeat Expansion Diseases*), wywołanych przez międzypokoleniową ekspansję powtórzeń trójnukleotydomów.

W swojej pracy początkowo planowałam ustalić strukturę dupleksów zbudowanych głównie z dwóch powtórzeń CGG oraz zbadać wpływ różnych modyfikacji chemicznych (^{Me}G, ^{Br}G, I) na ich strukturę. Już podczas pierwszych eksperymentów zauważyłam jednak, że nie wszystkie dane eksperymentalne są zgodne z przewidywaną teoretycznie oraz powstającą w kryształach strukturą dupleksu. Wykorzystując możliwość syntezy modyfikowanych oligorybonukleotydów (2), stosując dwuwymiarowe techniki NMR (3-6), zamierzałam określić preferencje strukturalne badanych przeze mnie cząsteczek. Okazało się, że cząsteczki pokazane w tabeli 1, z wyjątkiem cząsteczek utworzonych z powtórzeń CCG (16-18), tworzyły głównie formy czteroniciowe.

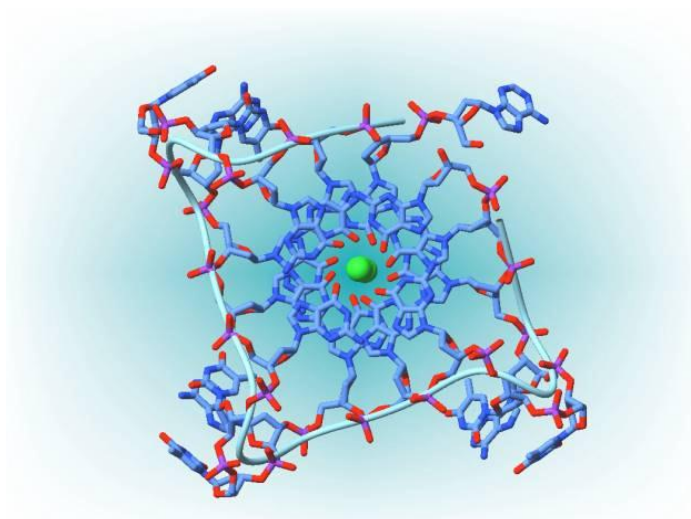
Tabela 1. Zestawienie kluczowych sekwencji omawianych w rozprawie

sekwencje zawierające modyfikowaną resztę		sekwencje bez modyfikowanych reszt	
G-C ^{Br} GGCGG-C	(1)	CGGCGG-C	(10)
G-CGGC ^{Br} GG-C	(2)	CGGCGG-CG	(11)
G-C ^{Me} GGCGG-C	(3)	G-CGGCGG-C	(12)
G-C ^{Me} GGCIG-C	(4)	pG-CGGCGG-C	(13)
G-C ^{Br} GGCIG-C	(5)	G-CGGCGGCGG-C	(14)
G-CIGC ^{Br} GG-C	(6)	G-CGGCGGCGGCGG-C	(15)
pG-C ^{Me} GGCGG-C	(7)	G-CGGCGG-C	(16)
pG-C ^{Br} GGCGG-C	(8)	G-CGGCGGCGG-C	(17)
G-C ^L GGCGG-C	(9)	G-CGGCGGCGGCGG-C	(18)

Na podstawie otrzymanych przeze mnie wyników zamierzałam:

- określić wpływ modyfikacji chemicznej (^{Me}G, I) na trwałość termodynamiczną cząsteczek
- wyznaczyć optymalne warunki środowiska (stężenie i rodzaj kationu, temperatura) dla tworzenia stabilnych struktur do badań metodami NMR
- opracować metodę umożliwiającą wstępną klasyfikację tworzonej struktury
- określić atomy zaangażowane w tworzenie wiązań wodorowych w tetradach różnego typu
- poznać czynniki decydujące o topologii kwadrupleksów, zbudowanych z dwóch i więcej powtórzeń CGG (wpływ modyfikacji chemicznych, sekwencja, stężenie RNA)
- zaproponować, w oparciu o dane uzyskane ze spektroskopii NMR, modele kwadrupleksów tworzących się z cząsteczek G-C^{Me}GGCGG-C oraz G-CGGCGG-C
- przeprowadzić spektralną charakterystykę nieznanych dotąd struktur kwadrupleksów RNA

II. Część literaturowa



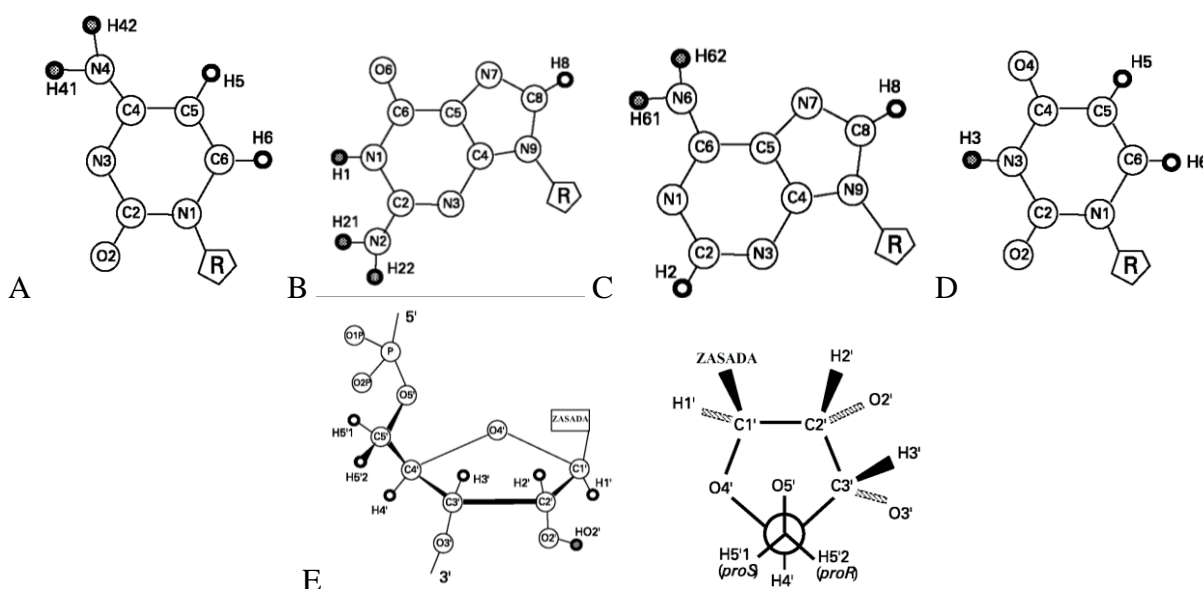
II.1. Budowa i różnorodność struktur RNA	13
II.2. Kwadrupleksy DNA i RNA – definicja, topologia, występowanie, ich funkcja oraz identyfikacja	17
II.2.1. Topologia G-kwadrupleksów	22
II.2.2. Czynniki wpływające na stabilność kwadrupleksów	24
Wpływ kationów	25
Wpływ cząsteczek wody i czynników dehydratujących	26
Modyfikacje szkieletu fosfocukrowego	27
Wpływ sekwencji i długości pętli	28
Wpływ sekwencji flankujących	28
Wpływ liczby reszt guanozyny w G-trakcie	29
Wpływ temperatury	29
Wpływ ligandów	29
II.2.3. Występowanie kwadrupleksów	30
Sekwencje telomerowe	32
Struktury oparte o pojedyncze powtórzenia sekwencji	33
Struktury oparte o dwukrotne powtórzenia sekwencji	34
Struktury oparte o trójrotne powtórzenia sekwencji	36
Struktury oparte o czterokrotne powtórzenia sekwencji	36
Sekwencje promotorowe genów	39
Struktury oparte o sekwencje genu <i>c-myc</i>	39
Struktury oparte o sekwencje genu <i>c-kit</i>	40
Struktury oparte o sekwencje genu <i>bcl-2</i>	41
Struktury oparte o sekwencje genu <i>chl1</i>	42
Sekwencje mRNA	42
II.2.4. Nietypowe tetrazy, pentady i heksady występujące w kwadrupleksach	43
Tetrazy	43
Pentady oraz heksady	46
II.2.5. Inne, nietypowe struktury kwadrupleksów	47
Dimery	47
Zazębiające się kwadrupleksy (ang. <i>interlocked</i>)	48
II.2.6. Podsumowanie	49

II.3. Metody stosowane do badań kwadrupleksów	50
II.3.1. Metody spektroskopii NMR w analizie strukturalnej kwadrupleksów	50
Pomiary współczynnika dyfuzji translacyjnej	60
II.3.2. Krystalografia	61
II.3.3. Dynamika molekularna	61
II.3.4. Metody spektroskopii UV i CD w analizie strukturalnej kwadrupleksów	61
Widma różnicowe	62
Krzywe topnienia	62
Dichroizm kołowy	64
II.3.5. Spektrometria mas	66
II.3.6. Metody biochemiczne	68
II.4. Choroby neurologiczne wywołane ekspansją trójnukleotydowych powtórzeń CGG	70
II.4.1. Zespół drżenia i ataksji związany z zespołem łamliwego chromosomu X (FXTAS)	74
II.4.2. Przedwczesne wygaszanie czynności jajników (POF)	75
II.4.3. Zespół łamliwego chromosomu X (FXS)	75
II.5. Struktury drugorzędowe cząsteczek zbudowanych z trójnukleotydowych powtórzeń r(CGG)n	75
II.6. Struktury trzeciorzędowe cząsteczek zbudowanych z trójnukleotydowych powtórzeń r(CGG)n	81
II.7. Struktury drugorzędowe cząsteczek zbudowanych z trójnukleotydowych powtórzeń d(CGG)n	83
II.8. Struktury trzeciorzędowe cząsteczek zbudowanych z trójnukleotydowych powtórzeń d(CGG)n	84
II.9. Właściwości termodynamiczne powtórzeń CGG	86

II. CZĘŚĆ LITERATUROWA

II.1. Budowa i różnorodność struktur RNA

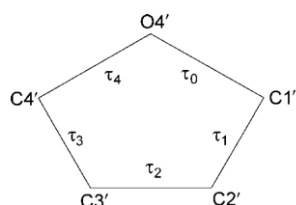
Kwasy rybonukleinowe są polimerami jednostek rybonukleotydowych. Każda jednostka rybonukleotydowa składa się z trzech bloków budulcowych: zasady azotowej (guanina, cytozyna, adenina oraz uracyl), cukru (rybozy) oraz grupy fosforanowej. Każda grupa fosforanowa łączy ze sobą rybonukleozydy przez wiązania 5',3'-fosfodiesterowe oraz niesie ładunek ujemny, który może być zubożniony różnymi kationami. Wzory strukturalne zasad występujących w RNA oraz rybozy wraz ze sposobem ich numeracji przedstawiono na rys. 1.



Rys. 1. Wzory strukturalne: cytozyny (A), guanozyny (B), adeniny (C), uracylu (D) oraz rybozy wraz z numeracją atomów azotu, tlenu, węgla oraz wodoru (E)

Ważną rolę strukturalną i funkcjonalną w cząsteczkach RNA pełnią niekanoniczne pary zasad oraz modyfikacje reszt nukleotydowych. W znanych strukturach RNA kanoniczne pary zasad Watsona–Cricka pomiędzy resztami G:C i A:U oraz pary G:U stanowią tylko około 60% wszystkich par zasad.

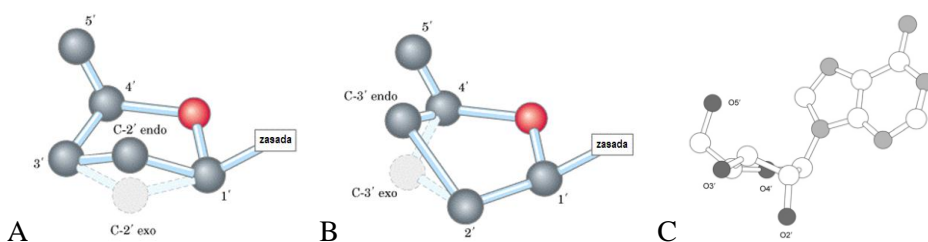
Związki pięciocykliczne z natury występują w formie pofałdowanej. Mogą przyjmować konformację półkrzesła (T, ang. *twist*) lub koperty (E, ang. *envelope*). Każdy z atomów rybozy może być wychylony z płaszczyzny pierścienia na dwa sposoby (pozycja *endo* lub *egzo*) co sprawia, iż jest możliwych po 10 konformacji typu półkrzesła oraz koperty. W kwasach nukleinowych pofałdowanie pierścienia rybozy określają dwa parametry: kąt fazowy pseudorotacji P, który opisuje pofałdowanie pierścienia rybozy oraz amplituda pofałdowania cukru τ_m , określająca maksymalny kąt pofałdowania pierścienia. Parametry te zależą od wartości pięciu endocyklicznych kątów torsyjnych: τ_0 (C4'-O4'-C1'-C2'), τ_1 (O4'-C1'-C2'-C3'), τ_2 (C1'-C2'-C3'-C4'), τ_3 (C2'-C3'-C4'-O4') oraz τ_4 (C3'-C4'-O4'-C1') (rys. 2). Parametry P oraz τ_m opisane są wzorami:



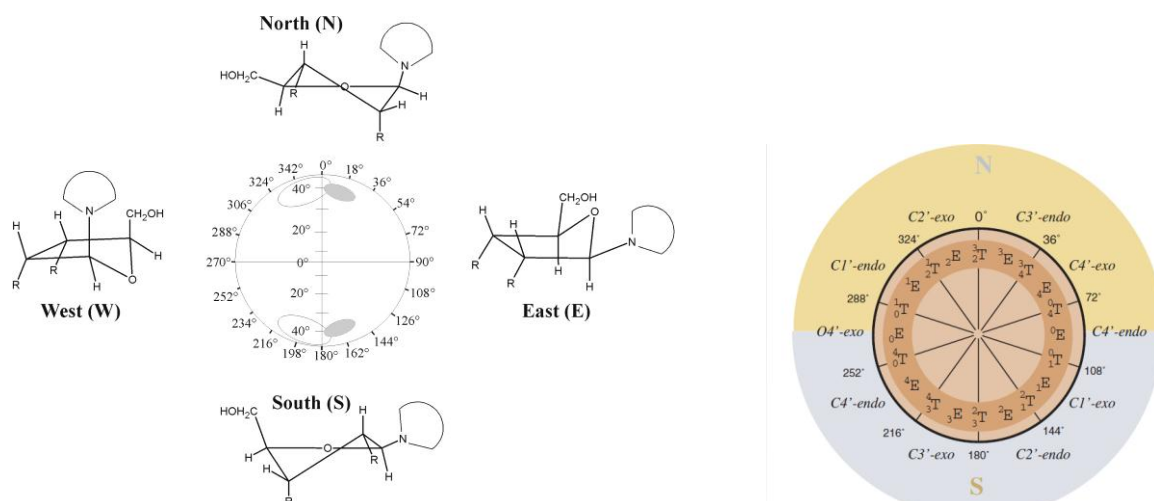
$$\tan P = \frac{(\tau_4 + \tau_1) - (\tau_3 + \tau_0)}{2 * \tau_2 * (\sin 36^\circ + \sin 72^\circ)} \quad \tau_m = \frac{\tau_2}{\cos P}$$

Rys. 2. Definicja kątów endocyklicznych rybozy, kąta fazowego pseudorotacji P oraz amplitudy pofałdowania τ_m (5)

Kąt fazowy pseudorotacji P , może przyjmować wartości od 0° do 360° , jednak obecność podstawników na atomach $C1'$, $C2'$, $C3'$ oraz $C4'$ pierścienia ogranicza przejścia konformacyjne rybozy, w związku z czym występuje wyraźna przewaga niektórych rotamerów. Kąt fazowy pseudorotacji P , dla większości znanych struktur nukleozydów jest usytuowany wokół geometrii North (N, $C3'$ -endo) oraz South (S, $C2'$ -endo). Natomiast typowe dla struktur typu A-RNA konformacje reszty cukrowej $C3'$ -endo znajdują się w regionie North (rys. 3, 4). W znanych strukturach cząsteczek typu Z-RNA jednostki guanozyny występują w konformacji $C4'$ -egzo, natomiast reszty cytydyny przyjmują konformację $C2'$ -endo. W serii rybo średnia wartość amplitudy pofałdowania cukru τ_m , przyjmuje wartości $\sim 35,2^\circ$.



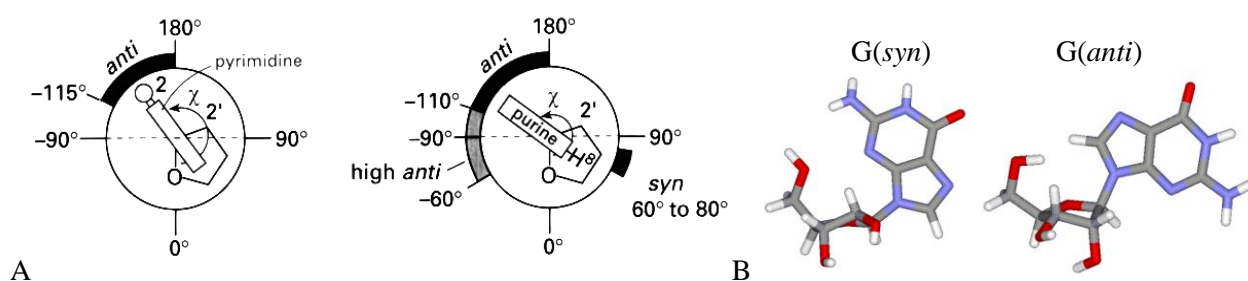
Rys. 3. Konformacja rybozy $C2'$ -endo: atom węgla $C2'$ wychylony poza płaszczyznę pierścienia w tą samą stronę co atom węgla $C5'$, (konformacja rybozy $C2'$ -egzo: atom $C2'$ wychylony poza płaszczyznę pierścienia w przeciwną stronę niż atom $C5'$) (A), konformacja $C3'$ -endo (B), rybonukleozyd w typowej dla formy A-RNA konformacji $C3'$ -endo (C)



Rys. 4. Koło pseudorotacji z przedstawionymi czterema głównymi rotamerami: North (N, $P \approx 0^\circ$), East (E, $P \approx 90^\circ$), South (S, $P \approx 180^\circ$) oraz West (W, $P \approx 270^\circ$).

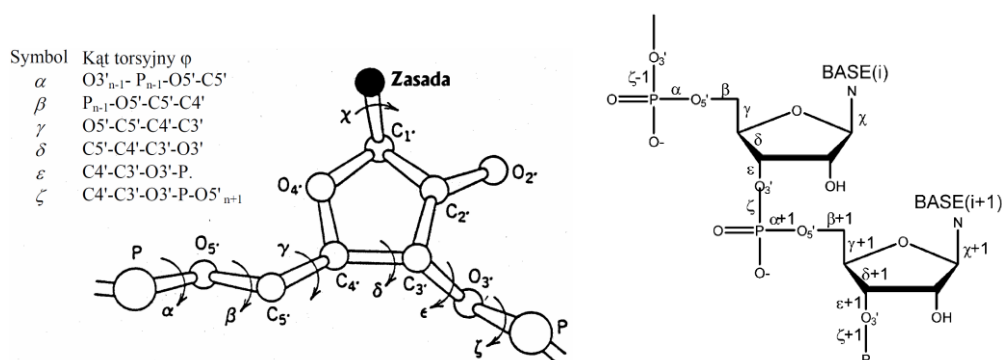
Dwie główne orientacje zasady heterocyklicznej w stosunku do pierścienia cukrowego określane mianem konformacji *syn* i *anti* (rys. 5) opisane są przez kąt torsyjny χ O4'-C1'-N9-C4 (dla zasad purynowych) lub O4'-C1'-N1-C2 (dla zasad pirymidynowych). W konformacji *syn* grupa karbonylowa atomu C2 pirymidyny, bądź atom N3 układu purynowego, leżą nad pierścieniem cukrowym. W orientacji *anti* nad pierścieniem rybozy znajduje się atom C6 pirymidyny lub atom C8 reszty puryny.

W znanych strukturach RNA reszty nukleotydowe rzadko przyjmują konformację *syn*. Modyfikacje chemiczne zasad heterocyklicznych polegające na wprowadzeniu objętościowego podstawnika, takiego jak grupa metylowa lub atom bromu w pozycję C8 reszty guanozyny, mogą wymuszać konformację *syn* (4;7).



Rys. 5. Zakres kątów χ dla konformacji *anti* ($-120^\circ < \chi < 180^\circ$) oraz *syn* ($0^\circ < \chi < 90^\circ$) (A), dwie konformacje dla reszt guanozyny: *G(syn)* oraz *G(anti)* (B)

Konformacja łańcucha fosfodiesterowego w kwasach nukleinowych jest określona poprzez sześć egzocyklicznych kątów torsyjnych: α , β , γ , δ , ϵ , ζ oraz χ (rys. 6, tab. 2) (8).



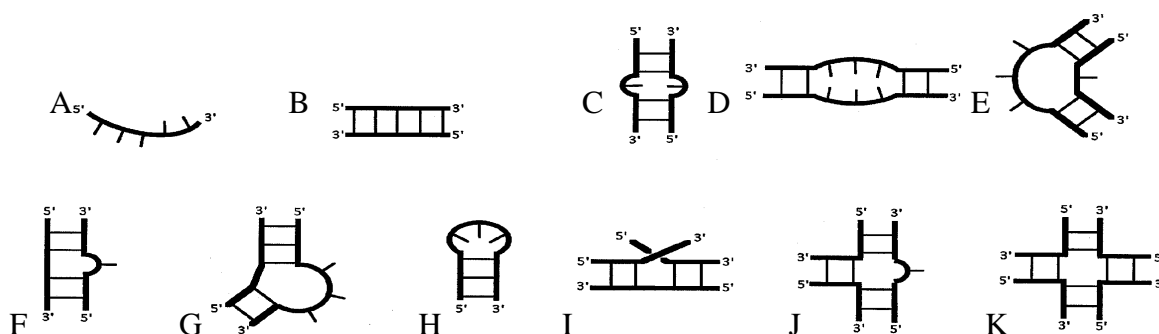
Rys. 6. Schematyczne przedstawienie kątów torsyjnych w łańcuchu fosfodiesterowym

W tabeli 2 podane są wartości typowe dla kątów torsyjnych łańcucha fosfodiesterowego otrzymane dla regularnych dwuniciowych form A-RNA. Wartość kąta δ jest powiązana z konformacją rybozy, ponieważ endocykliczny kąt torsyjny τ_3 wokół tego samego wiązania C3'-C4' ma różne wartości dla konformacji *C2'-endo* oraz *C3'-endo*. Konformacji *C3'-endo* odpowiada wartość kąta δ około 85° , natomiast konformacji *C2'-endo* $\delta \sim 160^\circ$.

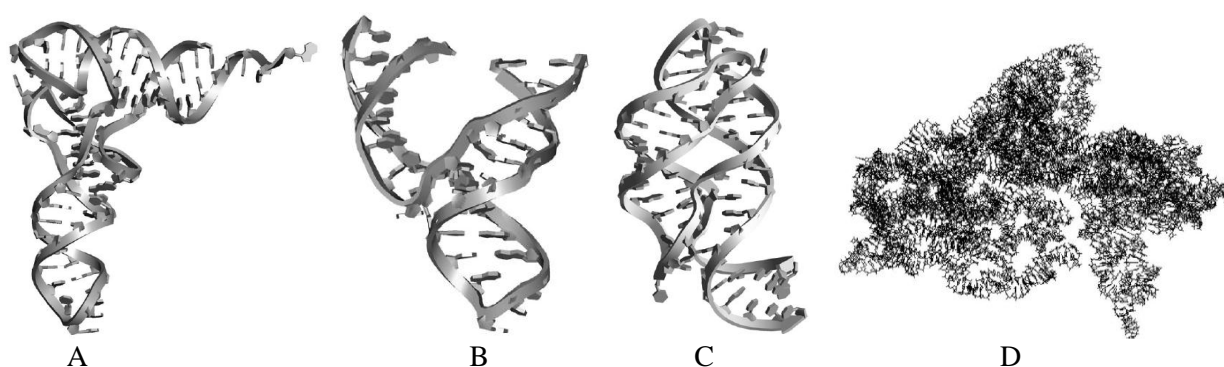
Tabela. 2. Średnia wartość kątów torsyjnych w łańcuchu fosfodiestrowym dla regularnych dwuniciowych form A-RNA w kryształach (8).

		α	β	γ	δ	ϵ	ζ	χ
A-RNA	średnia	295	173	54	80	210	287	226

Zmienność strukturalna cząsteczek DNA występujących głównie w postaci dwuniciowej helisy, w dużej mierze jest ograniczona poprzez podporządkowanie prawom, jakie narzuca forma helikalna. Cząsteczki RNA nie podlegają takim ograniczeniom. Różnorodność motywów strukturalnych RNA jest zdecydowanie większa. Cząsteczki RNA z łatwością tworzą niekanoniczne pary zasad oraz regiony jednoniciowe w obrębie typowej struktury helikalnej. Charakterystyczne dla cząsteczek RNA motywy struktury drugorzędowej przedstawiłam na rysunku 8. Motywy spinki oraz wybrzuszeń nukleotydowych występują we wszystkich dużych strukturach RNA (rys. 9) i wraz z oddziaływaniami warstwowymi stabilizują strukturę trzeciorzędową (5).



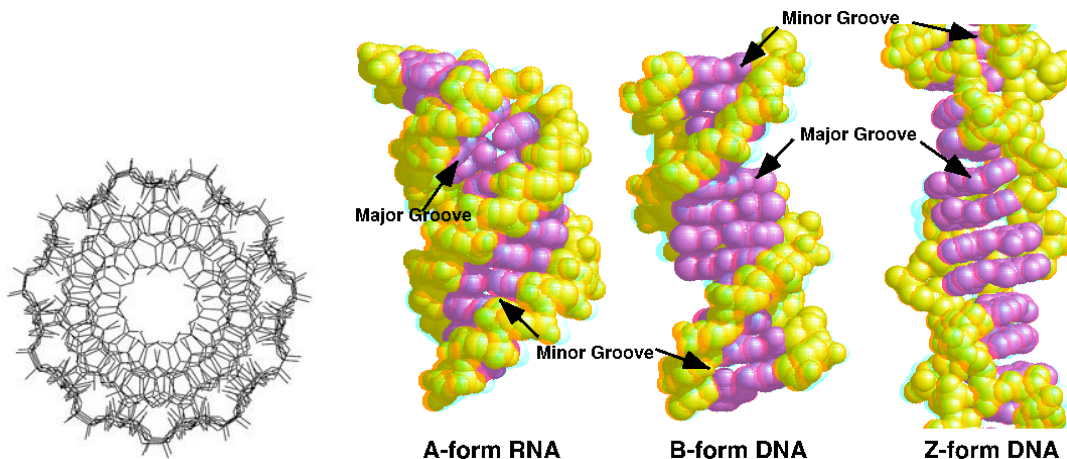
Rys. 8. Typowe motywy struktury drugorzędowej RNA: forma jednoniciowa (A), dupleks (B), pętla wewnętrzna z nietypową parą zasad (ang. mismatch loop) (C), symetryczna pętla wewnętrzna 3:3 (D), asymetryczna pętla wewnętrzna 3:1 (E), jednonukleotydowe wybrzuszenie (ang. single-base bulge) (F), wielonukleotydowe wybrzuszenie (ang. multiple-base bulge) (G), spinka (ang. hairpin loop) (H), dwuczłonowy styk (ang. two-stem junction) (I), trójczłonowy styk (ang. three-stem junction) (J), czteroczłonowy styk (ang. four-stem junction) (K)



Rys. 9. Typowe struktury przestrzenne cząsteczek RNA: $tRNA^{phe}$ (A), rybozomu typu hammerhead (B), ryboprzełącznika (C), podjednostki rybosomalnej 30S (D)

RNA różni się od DNA tylko obecnością dodatkowej grupy hydroksylowej w pozycji C2' pierścienia rybozy oraz brakiem grupy metylowej na atomie C5 w reszcie urydyny, w stosunku do tymidyny. Podczas gdy struktury DNA tworzą więcej typów helis (A, B i Z), obecność rybozy wpływa na powstawanie tylko jednej formy dupleksu RNA (A-RNA). Konserwatywność formy

A-RNA może być wynikiem powstawania wiązania wodorowego pomiędzy atomem wodoru grupy 2'-OH, a atomem O4' sąsiedniej reszty rybozy (9) lub, jak postulują Westhof i współpracownicy (10), stabilizacji osiowej helisy w wyniku tworzenia wiązań wodorowych pomiędzy atomami C2'-H_{2'(n)}:O4'_(n+1). W tym drugim przypadku grupa 2'-OH usytuowana w wąskiej bruzdzie może wzajemnie oddziaływać z cząsteczkami wody, RNA lub białkiem.



Rys. 10. Porównanie struktur helikalnych A-RNA oraz B-DNA i Z-DNA

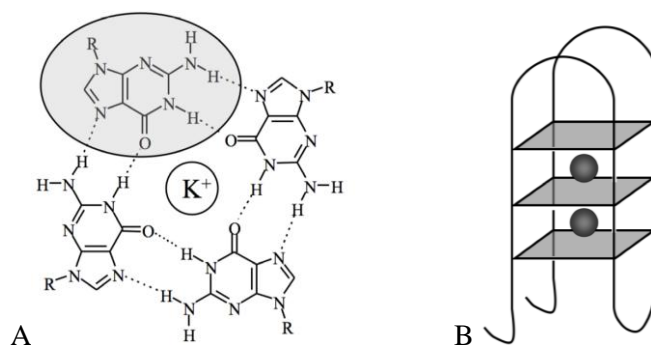
Helisa A-RNA jest krótsza, sztywniejsza oraz szersza od helisy B-DNA i Z-DNA (rys. 10). Obecność grupy hydroksylowej C2'-OH sprawia, iż duża bruzda jest wąska i głęboka a mała bruzda płytka i szeroka. Jony sodu albo potasu mają tendencję do gromadzenia się w dużej bruzdzie helisy A-RNA (11), natomiast w strukturze B-DNA lokują się one w małej bruzdzie. W klasycznej helisie A-RNA kąt skręcenia pomiędzy kolejnymi parami zasad wynosi 33°, co odpowiada ok. 10.9 parom zasad na skręt, a skok helisy wynosi 2.8 Å (12).

Liczba znanych struktur trzeciorzędowych kwasów nukleinowych jest dużo mniejsza niż białek. Kwasy nukleinowe (DNA, RNA) stanowią tylko około 2,9 % struktur zdeponowanych w bazie PDB (Protein Data Bank, <http://www.rcsb.org/>, stan na styczeń 2012) co stanowi 2238 struktur. Metodami magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) wyznaczono 41,4 % tych struktur, jednak w większości są to struktury cząsteczek DNA.

II.2. Kwadrupleksy DNA i RNA – definicja, topologia, występowanie, ich funkcja oraz identyfikacja

G-kwadrupleksy (inna nazwa G-tetrapleksy) to struktury utworzone z sekwencji polinukleotydowych bogatych w reszty guanozyny, które formują specyficzną strukturę tetrad guanozynowych, stabilizowanych przez oddziaływania warstwowe w środowisku zawierającym kationy jednowartościowe. Oprócz kwadrupleksów DNA i RNA znane są także przykłady kwadrupleksów zbudowanych z reszt LNA (13) lub PNA (14). W G-tetradzie (rys. 11) zawiązuje się aż osiem wiązań wodorowych, a każda reszta guanozyny jest zarówno donorem, jak

i akceptorem dwóch wiązań wodorowych, odpowiednio wzdłuż krawędzi Watsona-Cricka i wzdłuż krawędzi Hoogsteena. Wiązania wodorowe zawiązują się pomiędzy atomem tlenu grupy karbonylowej O6, a atomem azotu N1 oraz pomiędzy atomami azotu N2 i N7.



Rys. 11. G-tetrada stabilizowana przez osiem wiązań wodorowych i centralnie umieszczony kation potasu (A). Schematyczny model jednoniciowego kwadrupleksu zawierającego trzy oddziałujące warstwowo G-tetrazy (B).

Struktury przestrzenne kwadrupleksów RNA są dotychczas mniej poznane od analogicznych struktur DNA. W bazie danych PDB zdeponowano 112 takich struktur DNA uzyskanych metodami NMR oraz krystalografii i tylko 12 struktur RNA (tab. 3, 4). Jak uwidacznia analiz tabel, w ostatnich latach, szczególnie po 2000 roku, stale wzrasta zainteresowanie sekwencjami telomerowymi oraz występującymi w obszarze promotorów genów, które zdolne są do tworzenia kwadrupleksów. Jest to jeden z wiodących kierunków badań, gdyż kwadrupleksy rozpatruje się jako cel molekularny w projektowaniu leków przeciwnowotworowych oraz w regulacji ekspresji genów.

Wiedza pozyskana w badaniach kwadrupleksów DNA nie może być bezpośrednio wykorzystana dla zrozumienia natury kwadrupleksów RNA. Przeprowadzone badania porównawcze pomiędzy strukturami DNA i RNA wykazały istotne różnice. Kwadrupleksy RNA i DNA wykazują odmienną trwałość termodynamiczną, powstają z różną kinetyką oraz, w przeciwieństwie do RNA, cząsteczki DNA wykazują znaczny polimorfizm strukturalny (15;16).

Tabela 3. Wykaz struktur kwadrupleksów RNA i DNA znajdujących się w bazie PDB (stan na czerwiec 2012) i otrzymanych metodami spektroskopii NMR.¹

Lp.	Identyfikator	Sekwencja	Rok
RNA – otrzymane metodami NMR			
1	2RQJ (17)	r(GGAGGAGGAGGA)	2009
2	2KBP (18)	r(UAGGGUUAGGGU)	2009
3	1S9L (19)	l(TGGGT)	2004
4	1MY9 (20)	r(GGAGGUUUUGGAGG)	2003
5	1RAU (21)	r(UGGGGU)	1994

¹ Przy tworzeniu tabeli 2 oraz 3, na podstawie struktur zdeponowanych w bazie PDB, nie uwzględniłam struktur tzw. i-motywów oraz kompleksów typu kwadrupleks:ligand

DNA – otrzymane metodami NMR

1	2LED	d(TAGGGCGGGAGGGAGGGAA)		2012
2	2LEE	d(TAGGGCGGGAGGGAGGGAA)		2012
3	2LOD	d(GGGATGGGACACAGGGGACGGG)		2012
4	2LPW	d(AAGGGTGGGTGTAAGTGTGGGTGGGT)		2012
5	2LBY	d(TAGGGAGGGTAGGGAGGGT)		2012
6	2LE6	d(GIGTGGGTGGGTGGGT)		2011
7	2LD8	d(TAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG)		2011
8	2L88	d(GGGGCGGGCGGGGCGGGGT)		2011
9	2KZD	d(AGGGIAGGGGCTGGGAGGGC)		2010
10	2KZE	d(AIGGGAGGGICTGGGAGGGC)		2010
11	2KYO	d(CGGGCGGGCGCGAGGGAGGGT)		2010
12	2KYP	d(CGGGCGGGCGCTAGGGAGGGT)		2010
13	2KPR	d(GGGTGGGGAAGGGGTGGGT)		2010
14	2KKA	d(AGGGTTAGGGTTAIGTTAGGGT)		2009
15	2KQG	d(CGGGCGGGCACGAGGGAGGGT)		2009
16	2KQH	d(CGGGCGGGCGCGAGGGAGGGT)		2009
17	2WCN	d(G ^L GG ^L GTTTTG ^L GG ^L G)	^L : reszty typu LNA	2009
18	2KOW	d(TAGGGTAGGGTAGGGTAIGG)		2009
19	2KM3	d(AGGGCTAGGGCTAGGGCTAGGG)		2009
20	2K8Z	d(TCGTTGCT)	tetrada C:G:G:C	2009
21	2K90	d(TGCTTCGT)	tetrada C:G:G:C	2009
22	2K97	d(pCGCTCCGT)	cykliczny oligomer, tetrada C:G:G:C	2009
23	2KF7	d(GGGTTA(^{Br} G)GGTTAGGGTTAGGGT)		2009
24	2KF8	d(GGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGT)		2009
25	2KAZ	d(GGGACGTAGTGGG)		2008
26	2JSL	d(TAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTT)		2008
27	2JSQ	d(TAGGGTTAGGGTTA(^{Br} G)GGTTAGGGTT)		2008
28	2JSK	d(TAGGGTTAGGGTTAG(^{Br} G)GTTAGGG)		2008
29	2JSM	d(TAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG)		2008
30	2E4I	d(A(^{Br} G)GGTTA(^{Br} G)GGTTA(^{Br} G)(^{Br} G)GTTA(^{Br} G)GG)		2007
31	2JPZ	d(TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTT)		2007
32	2O3M	d(AGGGAGGGCGCTGGGAGGAGGG)		2007
33	2HY9	d(AAAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGAA)		2007
34	2HK4	d(pCCGTCCGT)	cykliczny oligomer, tetrada G:C:G:C	2007
35	2IDN	3'-d(GGT)-5'-5'-d(TGGTGTGGTTGG)-3'		2007
36	1F8U	d(GGGCGGGGAGGAATTGGGCGGG)		2006
37	2GKU	d(TTGGGTAGGGTTAGGGTTAGGGA)		2006

38	2CHJ	d(TG ^L GG ^L GT)	^L : reszty typu LNA	2006
39	2CHK	d(T ^L G ^L G ^L G ^L GT)	^L : reszty typu LNA	2006
40	2AQY	d(GIGTTAGGGTTAGGGT)		2006
41	2AKG	d(GGGGTTTTGGGG)		2005
42	2A5P	d(TGAGGGTGGIGAGGGTGGGGAAGG)		2005
43	1XCE	d(GCGGTTGGAT)	tetrada G:C:G:C	2005
44	1XAV	d(TGAGGGTGGGTAGGGTGGGTAA)		2005
45	1Y8D	d(GGGGTGGGAGGAGGGT)		2005
46	1U64	d(GGGTTTTGGGG)		2004
47	1NYD	d(GCGGTTGGAT)	tetrada G:C:G:C	2004
48	1OZ8	d(GGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGA)		2004
49	1RDE	d(GGTTGGTGTGGTTGG)		2003
50	1NP9	d(TTAGGGT)		2003
51	1N96	d(pCGCTCATT)	cykliczny oligomer, tetrada G:C:A:T	2003
52	1MYQ	d(GGAGGAGGAGGA)		2002
53	1LVS	d(GGGGTTTTGGG)		2002
54	1JVC	d(GAGCAGGT)	tetrada G:C:G:C	2001
55	1JJP	d(GGGAGGTTTGGGAT)		2001
56	1I34	d(GGTTTTGGCAGGGTTTTGGT)		2001
57	1EU2	d(pTGCTCGCT)	cykliczny oligomer, tetrada G:C:G:C	2001
58	1F3S	d(GGGTTCAGG)		2000
59	1EVM	d(AGGGT)	tetrada A:A:A:A	2000
60	1EVN	d(AGGGT)	tetrada A:A:A:A	2000
61	1EVO	d(TGGGCGGT)	tetrada C:C:C:C	2000
62	1EMQ	d(TGGTGGC)		2000
63	1EEG	d(GGAGGA)		2000
64	1D6D	d(AAGGTTTTAAGG)		2000
65	1C38	d(GGTTGGTGTGGTTGG)		1999
66	1C32	d(GGTTGGTGTGGTTGG)		1999
67	1C34	d(GGTTGGTGTGGTTGG)		1999
68	1C35	d(GGTTGGTGTGGTTGG)		1999
69	1K4X	d(GGGGTTTTGGGG)		1999
70	1A8N	d(GGGCTTTTGGGC)		1998
71	1A8W	d(GGGCTTTTGGGC)		1998
72	1A6H	d(GCGGTTTGC ^L GG)		1998
73	1AFF	d(TAGG)		1997
74	1FQP	d(GGGTTTTGGG)		1997
75	1QDF	d(GGTTGGTGTGGTTGG)		1996

76	1QDH	d(GGTTGGTGTGGTTGG)	1996
77	1QDI	d(GGGGTTTTGGGG)	1996
78	1QDK	d(GGGGTTTTGGGG)	1996
79	230D	d(GGGGTUTUGGGGTTTTGGGGUUTTGGGI)	1995
80	201D	d(GGGGTTTTGGGGTTTTGGGGTTTTGGGG)	1995
81	143D	d(AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG)	1994
82	148D	d(GGTTGGTGTGGTTGG)	1994
83	156D	d(GGGGTTTTGGGG)	1994
84	139D	d(TTGGGGT)	1994
85	186D	d(TTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGG)	1994

Tabela 4. Wykaz struktur kwadrupleksów RNA i DNA znajdujących się w bazie PDB (stan na czerwiec 2012) i otrzymanych metodami rentgenowskimi.

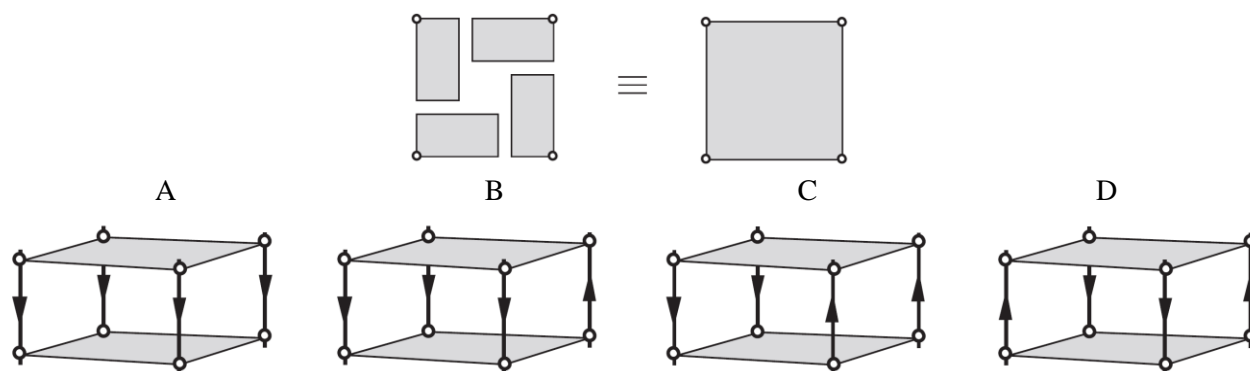
Lp.	Identyfikator	Sekwencja		Rok
RNA – otrzymane metodami rentgenowskimi				
1	3IBK (22)	r(^{Br} UAGGGUUAAGGGU)		2010
2	2GRB (23)	d(^{Br} U)r(GIGGU)		2006
3	2AWE (24)	rU(d ^{Br} G)r(GUGU)	oktapleks	2006
4	1J6S (25)	d(^{Br} U)r(GAGGU)	G-U oktady	2003
5	1MDG (26)	rU(d ^{Br} G)r(AGGU)	oktapleks	2003
6	1P79 (27)	rU(d ^{Br} G)-r(UGGU)		2003
7	1J8G (28)	(UGGGGU)		2001
DNA – otrzymane metodami rentgenowskimi				
1	3QXR	d(AGGGAGGGCGC(^{Br} U)GGGAGGAGGG)		2012
2	2GWE	d(GGGGTTTTGGGG)		2007
3	2GWQ	d(GGGGTTTTGGGG)		2007
4	2O4F	d(TGGGGT)		2007
5	2GWO	d(TGGGGT)		2007
6	2HBN	d(GGGGTTTTGGGG)		2006
7	2AVH	d(GGGGTTTTGGGG)		2006
8	2AVJ	d(GGGG(^{Br} U)TTGGGG)		2006
9	1V3N	d(G(^{Br} C)GAGAGC)		2004
10	1V3O	d(G(¹³ C)GAGAGC)	¹³ C: 5-jodocytydyna	2004
11	1V3P	d(G(¹³ C)GAGAGC)		2004
12	1OZ8	d(GGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGA)		2004
13	1S45	d(TGGGGT)		2004
14	1S47	d(TGGGGT)		2004
15	1QYK	d(GCATGCT) Ba ²⁺		2003

16	1QYL	d(GCATGCT) V ³⁺	2003
17	1QZL	d(GCATGCT) Co ²⁺	2003
18	1R2O	d(GCATGCT) Ni ²⁺	2003
19	1MF5	d(GCATGCT) Co ²⁺	2003
20	1JPQ	d(GGGG(^{Br} U)TTTGGGG)	2002
21	1JRN	d(GGGGTTTTGGGG)	2002
22	1K8P	d(^{Br} U)AGGG(^{Br} U)TAGGGT)	2002
23	1KF1	d(AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG)	2002
24	352D	d(TGGGGT)	1997
25	184D	d(GCATGCT)	1995
26	244D	d(TGGGGT)	1995
27	1D59	d(GGGGTTTTGGGG)	1993

II.2.1. Topologia G-kwadrupleksów

Zależnie od liczby nici zaangażowanych w powstawanie G-kwadrupleksów wyróżniamy kwadrupleksy jednocząsteczkowe, dwucząsteczkowe lub czterocząsteczkowe. Struktury kwadrupleksów wykazują polimorfizm strukturalny ze względu na: kierunkowość nici, aranżację G-tetrad oraz sposób ułożenia pętli. Kierunkowość nici jest powiązana z konformacją *syn/anti* wokół wiązania *N*-glikozydowego reszty guanozyny, co z kolei determinuje rozmiar powstających bruzd. W kwadrupleksach istnieją cztery możliwe ułożenia nici względem siebie:

- cztery nici są zorientowane w jednym kierunku (tzw. kwadrupleks równoległy – rys. 12 A),
- trzy nici są zorientowane w jednym kierunku, czwarta w przeciwnym (tzw. kwadrupleks typu (3+1) lub hybrydowy – rys. 12 B),
- dwie przyległe nici są zorientowane w tym samym kierunku, a dwie pozostałe w przeciwnym (tzw. kwadrupleks antyrównoległy lub typu góra-góra-dół-dół – rys. 12 C),
- dwie nici naprzeciwległe są zorientowane w tym samym kierunku, a dwie pozostałe w przeciwnym (tzw. kwadrupleks antyrównoległy lub typu góra-dół-góra-dół – rys. 12 D)

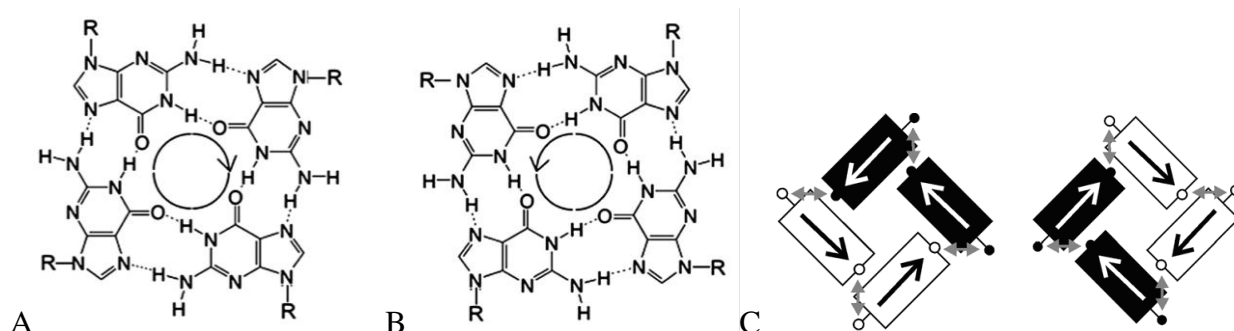


Rys. 12. Typy kwadrupleksów: kwadrupleks równoległy (A), kwadrupleks typu (3+1) (B), kwadrupleks antyrównoległy typu góra-góra-dół-dół (C), kwadrupleks antyrównoległy typu góra-dół-góra-dół; strzałki wskazują orientację nici od końca 5' → 3' (D)

Kierunkowość nici oraz konformacja reszt guanozynowych w G-tetradzie są wzajemnie zależne. Jeśli cztery nici są równoległe, to wszystkie reszty guanozyn tworzące G-tetradę muszą mieć tę samą orientację (*anti* lub *syn*), natomiast antyrównoległe ułożenie nici wymusza występowanie mieszanych konformacji *anti/syn*. Dla przedstawionych na rys. 12 A-D typów kwadrupleksów możliwe są następujące orientacje zasad w tetradach (24;29-32):

- *anti*•*anti*•*anti*•*anti* lub *syn*•*syn*•*syn*•*syn* (rys. 12 A),
- *syn*•*anti*•*anti*•*anti* lub *anti*•*syn*•*syn*•*syn* (rys. 12 B),
- *syn*•*syn*•*anti*•*anti* (rys. 12 C),
- *syn*•*anti*•*syn*•*anti* (rys. 12 D),

Kolejny aspekt topologii kwadrupleksów to kierunkowość wiązań wodorowych w G-tetradzie, która może być zgodna z ruchem wskazówek zegara lub przeciwna (rys. 13) i jest bezpośrednio powiązana z konformacją *syn/anti* reszt guanozyny w obrębie tworzonej G-tetrady (33). Dla każdej reszty guanozyny kierunkowość wiązania jest wyznaczona od atomu H8 do NH1 (rys. 13 C). Oddziaływania warstwowe pomiędzy dwiema przyległymi G-tetradami o tej samej kierunkowości wiązań wodorowych różnią się od oddziaływań pomiędzy takim samym układem G-tetrad, ale o przeciwnej kierunkowości wiązań wodorowych.

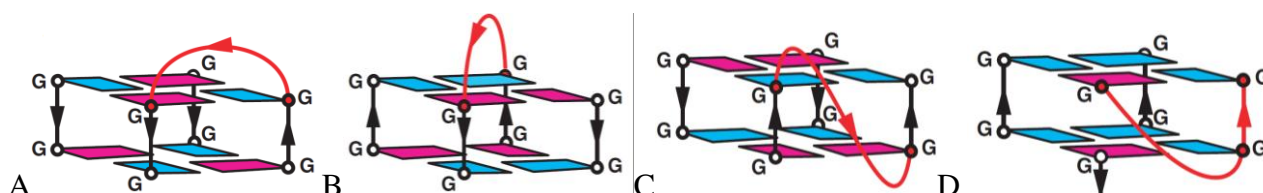


Rys. 13. G-tetradą o kierunkowości wiązań wodorowych zgodnej z ruchem wskazówek zegara (A), G-tetradą o kierunkowości wiązań wodorowych przeciwnej do ruchu wskazówek zegara (B), Względna orientacja reszt guaniny w dwóch typach G-tetrad (pozycje NH1 oraz H8 w zasadzie oznaczono kółkiem, grot strzałki odpowiada grupie NH1; G(*syn*)-kolor czarny, G(*anti*)-kolor biały) (C)

Reszty nukleotydydowe, które nie są zaangażowane w powstawanie tetrad tworzą łączące je pętle. Wyróżniamy cztery rodzaje pętli (30;32;34;35):

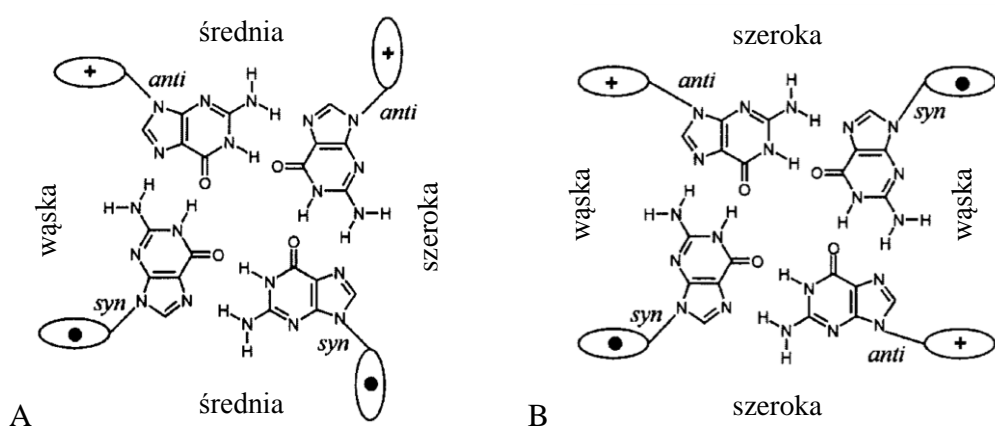
- pętla boczna (ang. *lateral, edge wise loop*) - łączy dwie przyległe, antyrównoległe nici. Najczęściej złożona jest z co najmniej dwóch reszt nukleotydydowych (rys. 14 A).
- pętla przekątna lub diagonalna (ang. *diagonal*) – łączy dwie przeciwległe, antyrównoległe nici. Najczęściej złożona jest z co najmniej trzech reszt nukleotydydowych (rys. 14 B).

- pętla zewnętrzna (ang. *external, propeller, side, double-chain-reversal loop*) - łączy dwie sąsiednie, równoległe nici. Może być bardzo krótka (np. złożona z jednej reszty) lub długa na sześć i więcej reszt (rys. 14 C).
- pętla w kształcie litery V (ang. *V-shaped loop*) – łączy dwa przekątne wierzchołki sąsiednich G-tetrad, w których jeden z wierzchołków nie jest usztywniony odcinkiem łańcucha fosfordiestrowego (rys. 14 D)



Rys. 14. Cztery typy pętli w kwadrupleksach: pętla boczna (A), pętla przekątna (B), pętla zewnętrzna (C), pętla w kształcie litery V (D)

Wszystkie kwadrupleksy posiadają cztery bruzdy, różniące się między sobą parametrami, w zależności od typu przyjmowanej struktury. Konformacja szkieletu fosfordiestrowego wpływa na ich głębokość, natomiast szerokość bruzd zależy od topologii kwadrupleksów, natury pętli oraz wartości kąta *N*-glikozydowego (rys. 15). Obecność pętli bocznych i przekątnych nie ma wpływu na architekturę bruzd, natomiast konformacja pętli zewnętrznych, które znajdują się w obszarze bruzd może przyczyniać się do ich ostatecznego kształtu.



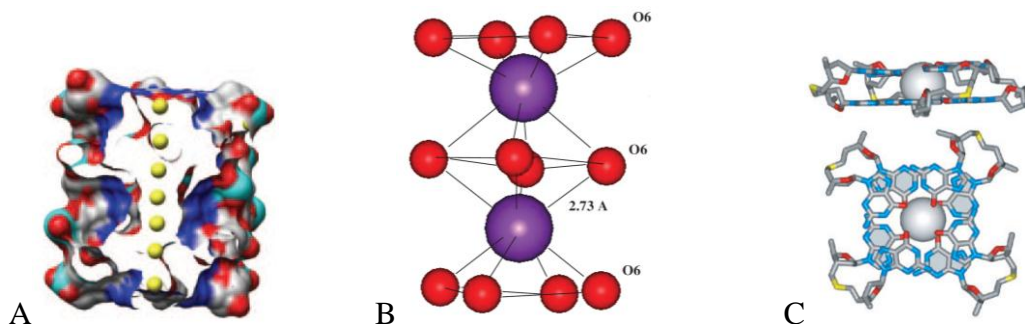
Rys. 15. Przykładowe szerokości bruzd dla antyrównoległych kwadrupleksów w układzie G-tetrad: *syn•anti•anti•syn* (A), *syn•anti•syn•anti* (B)

II.2.2. Czynniki wpływające na stabilność kwadrupleksów

Końcowa topologia kwadrupleksu zależy od wielu czynników, między innymi od stężenia oraz typu kationu, pH roztworu, typu reszt nukleotydowych w pętli i jej długości, sekwencji zasad, temperatury, obecności drugiego rozpuszczalnika oraz obecności ligandów. Chociaż coraz więcej wiadomo na temat wpływu poszczególnych czynników na strukturę kwadrupleksów, nadal nie są znane reguły, które pozwoliłyby przewidzieć ich końcową topologię.

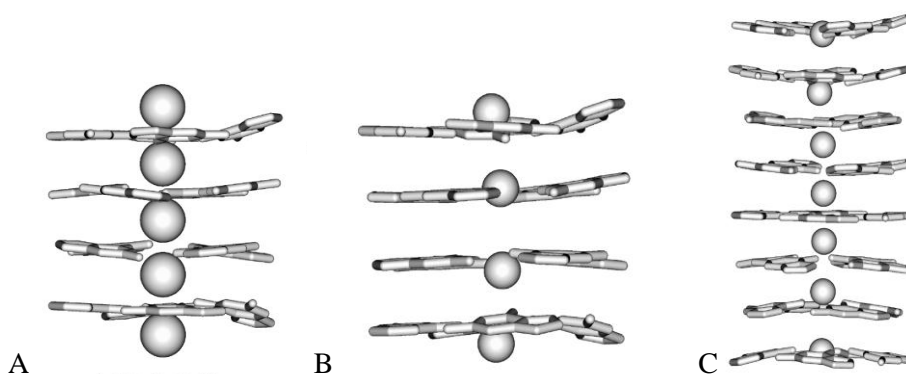
Wpływ kationów

Utworzenie kwadrupleksu wymaga obecności kationów jednowartościowych, które są zlokalizowane centralnie w kanale utworzonym przez oddziałujące warstwowo G-tetrazy (rys. 16 A).



Rys. 16. Przekrój przez strukturę ośmiu G-tetrad ukazujący kationy metalu umieszczone w centralnym kanale (A), kation potasu koordynuje osiem atomów tlenu (B), kation potasu koordynujący przyległe G-tetrazy (C)

Na podstawie badań krystalograficznych wiadomo, że najczęściej stosowany w badaniach kwadrupleksów kation potasu koordynuje osiem karbonylowych atomów tlenu sąsiadujących tetrad, natomiast mniejszy kation sodu - cztery lub osiem takich atomów (36). Kationy sodu mogą być umiejscowione zarówno w płaszczyźnie G-tetrazy, jak również symetrycznie pomiędzy dwiema G-płaszczyznami (rys. 17 B, C).



Rys. 17. Lokalizacja kationów sodu i potasu w strukturach krystalograficznych kwadrupleksów: (A), kationy K^+ , cząsteczka $d(G_4T_4G_4)_2$, (PDB ID: 1JRN), (B), kationy Na^+ , cząsteczka $d(G_4T_4G_4)_2$, (PDB ID: 1JB7), (C), kationy Na^+ , cząsteczka $d(TG_4T)_4$, (PDB ID: 352D)

W zależności od wielkości i ładunku kationów obserwujemy ich zróżnicowany wpływ na stabilizację kwadrupleksów. Jony potasu, które znajdują się w odległości około 2.7 Å od każdego atomu tlenu oraz posiadają optymalny promień jonowy, efektywnie koordynują i najsilniej stabilizują G-tetrazy (rys. 16 B, C). Jony sodu mają znacznie mniejszy promień jonowy (tab. 5) i efekt stabilizacji G-tetrazy jest zazwyczaj znacznie słabszy. W zależności od rodzaju kationu obecnego w roztworze może nastąpić zmiana połaćowania struktury; na przykład takimi „przełącznikami” mogą być kationy sodu (29) oraz potasu (37).

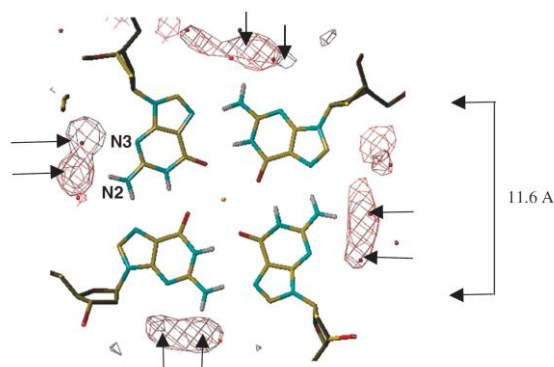
Tabela 5. Promienie jonowe kationów stabilizujących kwadrupleksy (38)

kation	K ⁺	Na ⁺	NH ₄ ⁺	Rb ⁺	Cs ⁺	Li ⁺	Ca ²⁺
promień jonowy [Å]	1.52	1.16 (0.97)	1.43	1.66	1.81	0.9	0.99

Inne znane kationy, które mogą promować tworzenie kwadrupleksów to Rb⁺, Cs⁺, NH₄⁺, Tl⁺ oraz dwuwartościowe, takie jak Sr²⁺, Ba²⁺, Pb²⁺, ale tylko w niskim stężeniu. Kationy dwuwartościowe są najczęściej spotykane w strukturach krystalograficznych, np. w kryształach czteroniciowego kwadrupleksu zbudowanego z nici d(^{Br}U)_r(GAGGU). Strukturę tę stabilizują zarówno kationy Ba²⁺ oraz Na⁺ (25). Rodzaj kationów wpływa także na szybkość tworzenia czterocząsteczkowych kwadrupleksów, zarówno niemodyfikowanych, jak i zawierających modyfikacje chemiczne. Kwadrupleksy tego typu najszybciej powstają w obecności kationów K⁺, a najwolniej w buforze zawierającym jony NH₄⁺, zgodnie z szeregiem (K⁺)>(Na⁺)>(NH₄⁺) (39).

Wpływ cząsteczek wody i czynników dehydratujących

Struktura kwadrupleksów DNA wydaje się być destabilizowana przez hydratację. Jak pokazano, termodynamiczna stabilność tych struktur wzrasta, kiedy aktywność wody jest zredukowana (40). Obecność czynników dehydratujących takich jak glikol polietylenowy (PEG), acetonitryl lub etanol może ponadto wpływać na zmianę struktury kwadrupleksów. Jak pokazano za pomocą widm dichroizmu kołowego (CD), dodatek tych czynników dehydratujących wpływa na zmianę konformacji kwadrupleksu z antyrównoległej na bardziej termodynamicznie stabilną formę równoległą (40-42). W przypadku kwadrupleksów RNA preferowana struktura w roztworze nie zmienia się pod wpływem zmiany uwodnienia. Wszystkie znane dotychczas kwadrupleksy RNA tworzą równoległe struktury niezależnie od warunków środowiska, w tym obecności PEG lub acetonitrylu. Obecność PEG może również stabilizować kwadrupleksy RNA. Na przykład dla sekwencji GGGCCGUGGGGUGGGAGCUGGG (bcl-RNA) pokazano, że obecność 40% PEG podnosi temperaturę topnienia o ok. 20°C (43). W RNA grupa hydroksylowa 2'-OH odgrywa ważną rolę w procesie hydratacji stanowiąc „rusztowanie” dla sieci wiązań wodorowych tworzonych przez wodę usytuowaną w bruzdach. Dodatkowy wpływ do stabilizacji kwadrupleksów RNA pochodzi od oddziaływań pomiędzy grupą 2'-OH, a grupami akceptorowymi: grupą aminową (N2) dla konformacji C2'-endo oraz atomem tlenu O4' dla konformacji C3'-endo (22). Cząsteczki wody znajdujące się w bruzdach równoległych kwadrupleksów, usytuowane są wokół donorowych grup oraz akceptorowych atomów wiązania wodorowego, odpowiednio oznaczonych na rysunku 18 jako N2 oraz N3. Ponieważ równoległe kwadrupleksy są symetryczne, również rozmieszczenie wody w bruzdach jest równomierne. W antyrównoległych kwadrupleksach, zawierających reszty guanozyny w konformacji *syn*, hydratacja struktury jest bardziej złożona i mniej uporządkowana (38).



Rys. 18. Lokalizacja cząsteczek wody w szerokich bruzdach w strukturze równoległego kwadrupleksu. Na rysunku oznaczono akceptorowy atom N2 oraz donorowy N3

Modyfikacje szkieletu fosfocukrowego

- *Analogi grupy fosfodiesterowej*

Zastąpienie jednego z atomów tlenu w grupie fosforanowej grupą metylową (P-CH₃) prowadzi do utraty ładunku ujemnego, co skutkuje destabilizacją powstającego kwadrupleksu niezależnie od jego topologii. Promień jonowy atomów szkieletu fosforocukrowego ma również wpływ na stabilność kwadrupleksów; analog fosfotioestrowy (>P-S⁻), który posiada większy promień jonowy w stosunku do naturalnej grupy >P-O⁻ destabilizuje kwadrupleksy dwu- i czteroniciowe, ale nie zmienia znacząco trwałości jednocząsteczkowych kwadrupleksów (15).

- *Analogi z modyfikacją w pozycji C2'*

Badania porównawcze trwałości kwadrupleksów o identycznej sekwencji zasad, ale różniących się podstawieniem w pozycji C2' (-H, -OH, -OMe) (15) pokazały, że obecność grupy 2'-OMe destabilizuje wszystkie typy kwadrupleksów, z wyjątkiem krótkich czteroniciowych. Dla krótkich, czteroniciowych kwadrupleksów stwierdzono, że obecność reszt 2'-OH, 2'-OMe jak i LNA (ang. *locked nucleic acid*) wpływa na wzrost ich stabilności (13).

- *Analogi z modyfikacją chemiczną zasad azotowych*

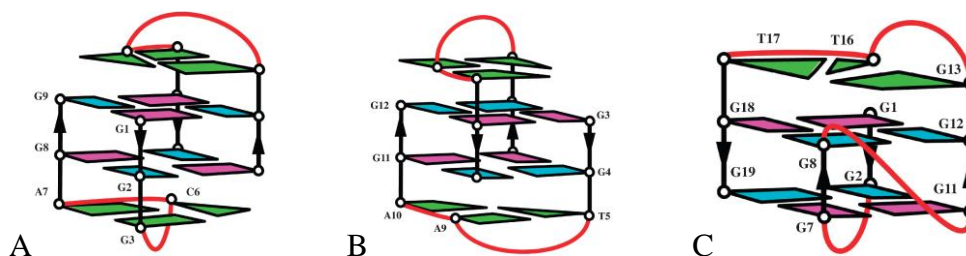
Modyfikacje wprowadzane w pozycję atomów zaangażowanych w tworzenie wiązań wodorowych w reszcie ganozyny (O⁶, N¹, N² oraz N⁷) wpływają niekorzystnie na powstawanie kwadrupleksów. Oprócz typu modyfikacji duży wpływ na stabilność i kinetykę tworzenia kwadrupleksów wywiera także pozycja modyfikacji w sekwencji. Przykładowo, modyfikowane reszty 8-bromoguanozyny (^{Br}G) lub 6-metyloizoksantoferyny (6MI) przyspieszają powstawanie kwadrupleksów, zwłaszcza kiedy są wprowadzone od strony końca 5' traktu guanozynowego (39). Analogi guanozyny z objętościowymi atomami lub grupami w pozycji C8 zazwyczaj wymuszają konformację *syn* wokół wiązania *N*-glikozydowego. Niezwykle interesująca obserwacja dotyczy przypadku 8-metyloguanozyny (^{Me}G), która podobnie jak ^{Br}G silnie wpływa na stabilność struktury kwadrupleksu. 8-Metyloguanozyna, w zależności od miejsca jej wprowadzenia w sekwencji, może przyjmować konformację *syn* lub *anti* wokół wiązania *N*-glikozydowego (7). Jak pokazano,

cząsteczki $d(TG^{Me}GGT)_4$ i $d(TGG^{Me}GT)_4$, różniące się pozycją ^{Me}G w sekwencji, przyjmują strukturę kwadrupleksu, w którym wszystkie nici są równoległe. Różnica pomiędzy nimi polega na tym, że w przypadku pierwszej z nich, w obrębie tetrady zbudowanej z czterech reszt ^{Me}G , wszystkie reszty są w konformacji *syn*, natomiast w drugim przypadku reszty te są w konformacji *anti*.

Wpływ sekwencji i długości pętli

Pętle w kwadrupleksach najczęściej zbudowane są z reszt tymidyny lub adenozyiny. Są one ważnym elementem decydującym o stabilności i topologii kwadrupleksu (44;45). Stabilność kwadrupleksu zależy między innymi od długości pętli. Stabilne jednocząsteczkowe struktury zawierają pętle składające się zazwyczaj z 3 do 7 reszt nukleotydowych (46), znane są również przykłady pętli zbudowanych z jednej, bądź ze znacznie większej liczby reszt (47;48). Systematyczne badania potwierdzają, iż jednonukleotydowe pętle korelują z równoległym ułożeniem nici w kwadrupleksach DNA oraz występowaniem pętli zewnętrznych, w których preferowane są reszty pirymidynowe (49;50). Takie jednonukleotydowe pętle często występują w ludzkim genomie, szczególnie w obszarze promotorowym genów.

Reszty nukleotydowe pętli bocznych i przekątnych mogą tworzyć tzw. triady zasad, które oddziałują warstwowo z końcowymi G-tetradami, dodatkowo stabilizując struktury kwadrupleksów (51-53). Triadą zasad nazywa się umieszczone w jednej płaszczyźnie trzy reszty nukleotydowe, gdzie jedna z zasad pętli zawiązuje wiązania wodorowe z dwiema przyległymi zasadami tej samej nici (rys. 19).



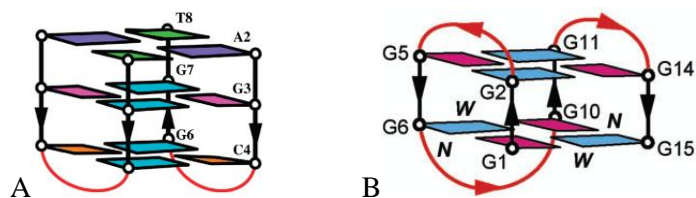
Rys. 19. Schematyczne struktury kwadrupleksów z triadami zasad: triada zasad G-(C-A) w obrębie pętli GTTCA, (51) (A), triada zasad T-(A-A) w obrębie pętli AATTTT, (52) (B), triada zasad G-(T-T) w obrębie pętli GT_4 , (53) (C)

Wpływ sekwencji flankujących

W roztworze na ogół istnieją w równowadze różne formy kwadrupleksów. Jak pokazują widma dichroizmu kołowego dla powtórzeń telomerowych $G_3(T_2AG_3)_3$, obecność różnych sekwencji flankujących z końca 5' i/lub 3' wpływa na stabilność i równowagę pomiędzy formą antyrównoległą a równoległą (54). Zmiana długości sekwencji flankujących może prowadzić niekiedy do istotnych zmian strukturalnych. Na przykład dla oligomeru $d(GGGAGGGCGCTGGGAGGAGGG)$ (*c-kit*) wraz z wydłużaniem sekwencji flankującej z obu końców, 5' i 3', zaobserwowano powstawanie dupleksu, jako struktury konkurencyjnej do kwadrupleksu (55).

Wpływ liczby reszt guanozyny w G-trakcie

Typowe i stabilne G-kwadrupleksy zawierają co najmniej dwie sąsiadujące ze sobą G-tetrazy. Niemniej znana jest nietypowa struktura kwadrupleksu (56), która zawiera tylko jedną tetradę G:G:G:G otoczoną dwiema mieszanymi tetradami A:T:A:T i G:C:G:C (rys. 20 A). Kwadrupleks ten utworzony jest z dwóch nici o sekwencji d(GAGCAGGT), w której występują obok siebie jedynie dwie reszty guanozyny.



Rys. 20. Schematyczne struktury kwadrupleksów z: pojedynczą (A) i podwójną (B) tetradą; Kolor niebieski odpowiada konformacji G(anti), różowy konformacji G(syn)

W organizmach żywych wśród sekwencji bogatych w trakty guanozynowe przeważają takie, które zawierają co najmniej trzy kolejne reszty guanozyny. Jednym z wyjątków jest koniec 3' telomeru u *Bombyx Mori* zbudowany z powtórzeń d(TTAGG)_n. Cząsteczki te przyjmują nieco inną topologię, niż te zbudowane z powtórzeń d(TTAGGG)_n występujących w ludzkich sekwencjach telomerowych. Dla sekwencji z dwiema tylko kolejnymi resztami guanozyny oraz dla sekwencji subtelomerowej d(CTAGGG)_n charakterystyczna jest struktura z trzema pętlami bocznymi (rys. 20 B). Taki szkielet kwadrupleksu zaobserwowano na przykład dla cząsteczki o sekwencji d[TAGGTTAGGTTAGGTU₁₆AGG] (57) jak również dla aptameru trombinowego d(GGTTGGTGTGGTTGG) (58) (rys. 20 B).

W niektórych przypadkach możliwość alternatywnie zawiązujących się par zasad oraz oddziaływań warstwowych w obrębie pętli powoduje, iż bardziej uprzywilejowane jest powstanie kwadrupleksu z mniejszą liczbą G-tetrad, niż wskazywałaby na to liczba powtórzeń reszt guanozyny w G-trakcie. Taki efekt zaobserwowano na przykład dla cząsteczki telomerowej o sekwencji d(GGGTTA)₃GGGT, która tworzy kwadrupleks tylko z dwiema G-tetradami (59).

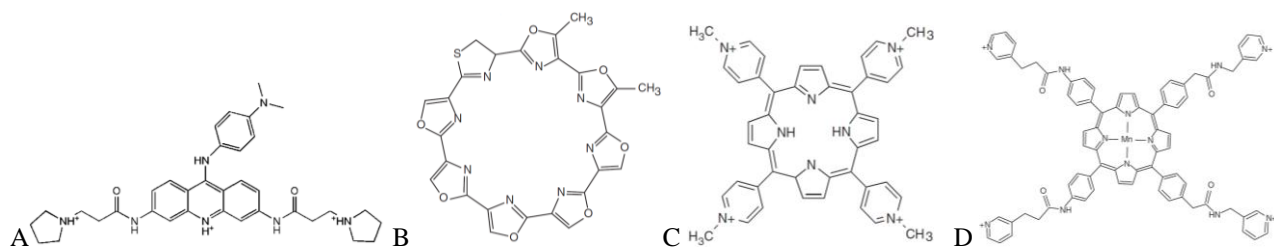
Wpływ temperatury

Zmiana temperatury, podobnie jak obecność kationów sodu lub potasu może również indukować zmiany strukturalne kwadrupleksów. I tak na przykład zaobserwowano, że podwyższenie temperatury powyżej 50°C dla cząsteczki o sekwencji d(UAG₃T^{Br}UAG₃T) spowodowało zmianę pofałdowania kwadrupleksu z formy antyrównoległej do równoległej (60).

Wpływ ligandów

Ligandy o małej masie cząsteczkowej mogą wiązać i stabilizować czteroniciowe struktury DNA. Dla celów terapeutycznych bardzo ważne jest stosowanie ligandów o selektywnym i silnym powinowactwie do kwadrupleksów. Ligandy takie zbudowane są najczęściej z poliaromatycznych

heterocyklicznych pierścieni i mogą asocjować do kwadrupleksów w różny sposób. Najbardziej uprzywilejowane jest oddziaływanie warstwowe pomiędzy ligandem a terminalną G-tetradą, jednak ligandy mogą wiązać się także w brzdach, oddziaływać ze szkieletem fosfodiesterowym lub zasadami w pętłach.



Rys. 21. Wzór strukturalny: BRACO-19 (A), telomestytyny (B), TMPyP4 (C), pochodnej porfiryny zawierającej mangan oraz łańcuchy obdarzone ładunkiem dodatnim (D)

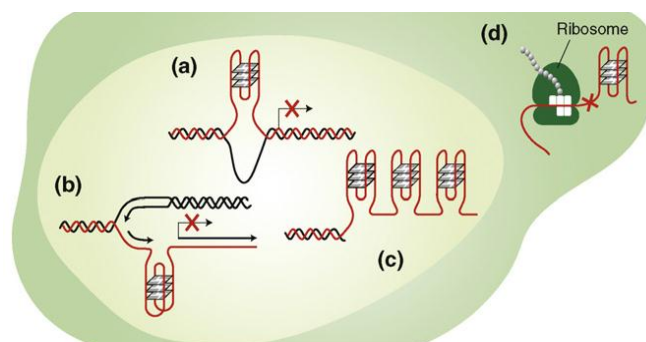
Obecnie prowadzone są zaawansowane badania dotyczące wpływu stabilizatora kwadrupleksów, jakim jest cząsteczka o nazwie BRACO-19 (rys. 21 A), na komórki pochodzące z nowotworów prostaty i macicy (61). Inny typ stabilizatora kwadrupleksów, telomestatina (rys. 22 B), wydaje się być obiecującym lekiem w leczeniu ostrej białaczki (62). Cechy wspólne obu tych cząsteczek to niewielki wpływ toksyczny na normalne komórki, blokowanie podziałów komórek nowotworowych z aktywną telomerazą oraz komórek, w których mechanizm wydłużania telomerów jest niezależny od telomerazy (ALT, ang. *alternative lengthening of telomeres*), szybkie hamowanie podziałów i apoptozy niezależnie od długości telomerów oraz brak jawnych klinicznie skutków ubocznych. Te cechy obu stabilizatorów umożliwią w niedalekiej przyszłości rozpoczęcie badań klinicznych.

Inną grupą związków o silnym powinowactwie do kwadrupleksów są pochodne porfiryny. Wiadomo na przykład że pochodna TMPyP4 (rys. 22 C) stabilizuje kwadrupleksy powstające na końcach telomerów, blokując aktywność telomerazy *in vitro* (63), natomiast destabilizuje kwadrupleksy powstające z tandemowych powtórzeń d(CGG)_n (64). Inna pochodna porfiryny (rys. 21 D), która wiąże Mn(III), wykazuje bardzo silne i niezwykle selektywne wiązanie kwadrupleksów (65).

II.2.3. Występowanie kwadrupleksów

W komórce kwas deoksyrybonukleinowy pełni głównie funkcję nośnika informacji genetycznej. Występuje zazwyczaj w formie dwuniciowej oraz ulega kondensacji łącząc się z białkami tworząc nić chromatynową, która organizuje się w struktury wyższego rzędu – solenoidy i domeny spięte niehistonowymi białkami. Gdy DNA aktywnie uczestniczy w replikacji, transkrypcji, rekombinacji i naprawie uszkodzeń może przyjmować inne struktury niż podwójna helisa. Szczególnie interesujące są regiony bogate w reszty guanozyny, które mogą przyjmować

struktury kwadrupleksów. Analiza bioinformatyczna wskazuje, iż kwadrupleksy mogą być powszechne w genomie (66). Takie struktury w DNA mogą tworzyć się w kluczowych biologicznie regionach obejmujących głównie końce chromosomów (telomery), regiony promotorowe genów onkogennych, krótkie powtórzenia mikro- oraz minisatelitarne. Z kolei, jak pokazuje analiza bioinformatyczna, kwadrupleksy RNA mogą występować w różnych regionach mRNA, najczęściej jednak w regionie 5'-UTR w pobliżu miejsca startu translacji. Obecnie uważa się, że kwadrupleksy RNA także odgrywają ważne biologiczne role, jak chociażby uczestnictwo w regulacji translacji (67).



Rys. 22. *Możliwe miejsca występowania kwadrupleksów w komórce:*

- (a) *w obrębie dwuniciowego DNA, w regionie promotorowym genu; komplementarna nić tworzy tzw. G-pętlę*
- (b) *w obrębie dwuniciowego DNA, podczas replikacji*
- (c) *w obrębie jednoniciowego DNA, w regionie telomerowego końca 3'*
- (d) *poza jądrem, w regionie 5'-UTR mRNA*

W ostatnim czasie znacznie wzrosła liczba dowodów na istnienie G-kwadrupleksów *in vivo* (rys. 22) oraz ich rolę w szeregu procesów biochemicznych (68). Pokazano na przykład, że:

- a) kwadrupleksy znajdujące się na końcach chromosomów specyficznie wiążą przeciwciała u *Stylonychia* (69;70) oraz ligandy (71),
- b) motywy kwadrupleksów to elementy cis-regulatorowe w regulacji transkrypcji i rekombinacji genu (72),
- c) zmieniona ekspresja genu w syndromie Wernera i Blooma wpływa na zaburzenia funkcji helikaz; kodowana przez ten gen helikaza RecQ rozplata strukturę kwadrupleksu (73),
- d) wewnątrz komórki, w obszarze dwuniciowym, utworzenie kwadrupleksu indukuje powstawanie tak zwanych G-pętli (rys. 22 a), które są widoczne pod mikroskopem (74),
- e) istnieją białka, które w komórce oddziałują specyficznie z kwadrupleksami (75); białka te wiążą się do kwadrupleksów, promują ich powstawanie lub destabilizują, rozwijają je lub tną,
- f) sekwencje podatne na tworzenie struktur kwadrupleksów występują w miejscach genomowej niestabilności; przykładowo helikaza Pif1 kontrolująca struktury kwadrupleksów tworzonych przez tandemowe powtórzenia CEB1, jest konieczna dla stabilności powtórzeń minisatelitarnych u drożdży (76),

g) oligonukleotyd (aptamer AS1411) przyjmując strukturę kwadrupleksu wiąże białko nukleolinę na powierzchni komórki rakowej i indukuje apoptozę; ten terapeutyk jest w II fazie badań klinicznych (77),

h) mutacja w obszarze promotorowym genu zdolnego do tworzenia kwadrupleksu wpływa na jego ekspresję u *Neisseria gonorrhoeae* (78)

Sekwencje telomerowe

Telomer, element strukturalny chromosomu zapewniający jego stabilność, zbudowany jest z kilku tysięcy reszt nukleotydowych i związanych z nim białek. Telomer nie zawiera żadnych genów i nie koduje białek, jego funkcja polega na zabezpieczeniu chromosomowego DNA przed degradacją i rekombinacją. Telomer skraca się podczas każdego podziału komórki. Proces ten, będący "licznikiem podziałów" chroni komórki przed nowotworzeniem, ale przekłada się na proces starzenia się. Telomer jest syntetyzowany przez enzym telomerazę, który składa się z komponentu białkowego odwrotnej transkryptazy (hTERT) i nici RNA (hTERC/hTR) służącej za matrycę przy syntezie telomeru. Telomeraza występuje w intensywnie dzielących się komórkach, a aktywność tego enzymu zmniejsza się z wiekiem, co przekłada się na starzenie komórek. W komórkach nowotworowych aktywność tego enzymu jest zwykle podwyższona; telomeraza jest obecna w ok. 90% komórek rakowych. Cechą charakterystyczną telomerów są wystające, jednoniciowe końce bogate w reszty guanozyny. Na przykład ludzki telomerowy DNA zawiera ok. 100-200 reszt nukleotydowych na końcu 3' (79). Cecha ta ułatwia tworzenie kwadrupleksów, ponieważ ich powstawanie nie jest zakłócone przez obecność drugiej, komplementarnej nici.

Jeden z istniejących modeli zakłada, że pojedyncza nić z końca 3' może wyprzeć jedną z nici dupleksu w końcowym fragmencie chromosomu i utworzyć pary zasad z komplementarną w tym regionie sekwencją, tworząc tak zwaną D-pętlę oraz strukturę t-pętli (80). Oddziaływanie to może polegać na utworzeniu nowego dupleksu lub kwadrupleksu o topologii (3+1). Schematyczne modele struktur telomeru pokazane są na rysunku 23 A i B.



Rys. 23. Schematyczny model struktury telomeru: oparty o strukturę dupleksu (A), oparty o strukturę kwadrupleksu typu (3+1) (81), (B); niebieskie i żółte dyski – białka stabilizujące t-pętlę

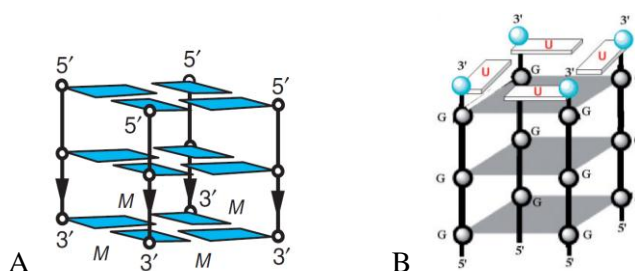
Tandemowo powtórzone sekwencje bogate w guanozyny znajdujące się na końcach chromosomów, są odmienne u różnych gatunków, jednak zawsze mają skłonność do tworzenia kwadrupleksów. Przykładowo, u ludzi i innych kregowców, telomery zawierają powtórzenia typu d(TTAGGG)_n (60), natomiast u *Tetrahymena* - d(TTGGGG)_n, (82) a u *Oxytricha nova* - d(TTTTGGGG)_n (30). Powtórzenia te tworzą *in vitro* stabilne struktury kwadrupleksów. Obecność

takich struktur *in vivo* może mieć szczególne znaczenie, gdyż może prowadzić do inhibicji telomerazy, co próbuje się wykorzystać w leczeniu raka (83;84). Dla utworzenia jednocząsteczkowego kwadrupleksu wymagane są co najmniej 4 powtórzenia telomerowe, więc końce chromosomów mogą teoretycznie zawierać od 4 do 8 tandemowych kwadrupleksów (54). Obecnie uważa się, że formowanie na końcach chromosomów kwadrupleksów *in vivo* jest regulowane w czasie cyklu komórki oraz jest zależne od obecności dwóch białek, TEBP α oraz TEBP β . Z kolei fosforylacja białka TEBP β w fazie S cyklu komórkowego jest konieczna dla rozplecenia struktury kwadrupleksu (85), a jednoniciowa forma końców telomerowych jest utrzymywana przez białko POT1 (86).

U ssaków telomerowe DNA ulega transkrypcji do RNA, które zawiera powtórzenia telomerowe typu r(UUAGGG) (87). TERRA (ang. *telomeric repeat-containing RNA*), podobnie jak telomerowe DNA, może tworzyć struktury kwadrupleksów. Potencjalnie obecność takich struktur może chronić RNA przed trawieniem enzymatycznym (88). W badaniach *in vitro* TERRA wiąże się z telomerazą oraz jest jej inhibitorem (89).

Struktury oparte o pojedyncze powtórzenie sekwencji

Najprostsze, czteroniciowe kwadrupleksy powstają w wyniku asocjacji cząsteczek o sekwencjach typu: $X_nG_pX_n$ (X_n : X – dowolne reszty nukleotydowe, n - liczba reszt, G_p : G – reszty guanozyny, p - ich liczba). Analiza takich struktur otrzymanych metodami spektroskopii NMR oraz krystalografii pokazuje, iż cząsteczki zbudowane z pojedynczych powtórzeń ludzkiej telomerowej sekwencji d(TTAGGG), d(TTAGGGT) oraz sekwencji d(TTGGGG) z *Tetrahymena* tworzą struktury równoległych kwadrupleksów z trzema tetradami o orientacji *anti* wszystkich reszt guanozyny (31) (rys. 24 A).



Rys. 24. Schematyczna struktura kwadrupleksu o sekwencji d(TTAGGGT) (PDB ID: 1NP9) (A), model kwadrupleksu RNA o sekwencji r(UAGGGU) (B)

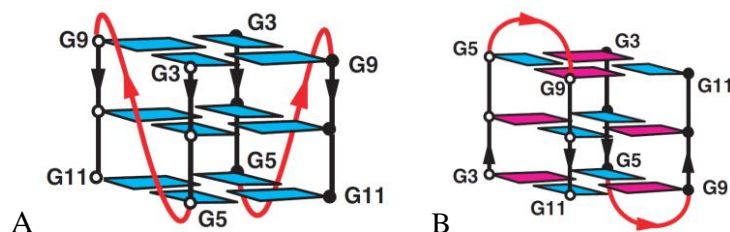
Inne znane, proste sekwencje bogate w reszty guanozyny, nie posiadające biologicznego odniesienia również formują czteroniciowe, równoległe kwadrupleksy DNA jak np. cząsteczka d(TGGGGT) (90;91). Taki typ topologii jest dominujący zarówno dla krótkich sekwencji DNA jak i RNA. W strukturze kwadrupleksu RNA zbudowanego z telomerowego powtórzenia r(UAGGGU) zaobserwowano oprócz trzech typowych G-tetrad tworzenie się tetrady zbudowanej z reszt urydyny (rys. 24 B), której obecność przyczynia się do znacznej stabilności tej cząsteczki (92;93).

Bardziej złożone topologie mogą powstawać z cząsteczek o sekwencjach zawierających co najmniej dwa rejony powtórzeń guanozynowych rozdzielonych łącznikiem nieguanozynowym. Sekwencje typu (I) $X_nGoXpGoX_n$, (II) $X_nGoXpGoXpGoX_n$ lub (III) $X_nGoXpGoXpGoXpGoX_n$ (X_n : X – dowolne reszty nukleotydowe, n - liczba reszt, Go : G – reszty guanozyny, o - ich liczba, Xp : X – dowolne reszty nukleotydowe zaangażowane w tworzenie pętli, p - liczba reszt) mogą asocjować na dwa sposoby. Z cząsteczek o sekwencjach zawierających dwa lub trzy G-trakty (I i II) powstają dwuniciowe kwadrupleksy, natomiast oligonukleotydy zbudowane z czterech powtórzeń (III) tworzą zazwyczaj jednoniciowe kwadrupleksy posiadające różne typy pętli.

Struktury oparte o dwukrotne powtórzenie sekwencji

Charakterystyczną cechą kwadrupleksów DNA jest ich polimorfizm strukturalny. Często dla tej samej cząsteczki DNA, ale badanej w różnych warunkach środowiska, obserwuje się powstawanie różnych form. Dlatego też, projektując ligandy selektywnie oddziałujące ze strukturą kwadrupleksów i testując ich wiązanie do cząsteczek DNA *in vitro*, należy mieć na uwadze, iż w komórce fragment nici o takiej samej sekwencji DNA, jak wybrany do badań wstępnych *in vitro*, może przyjmować całkowicie inną formę. W dalszej części tego rozdziału pokażę, iż nie istnieją żadne reguły, które pozwoliłyby na zaprojektowanie struktury kwadrupleksu na podstawie sekwencji zasad. Wprowadzenie jakichkolwiek zmian do sekwencji DNA skutkuje najczęściej powstaniem nowej, unikalnej struktury kwadrupleksu. Szeroki zakres zmienności struktur DNA uzasadnia prowadzenie systematycznych badań, w których wprowadza się niewielkie zmiany do sekwencji, a następnie analizuje potencjał podstawowej sekwencji do tworzenia wariantowych struktur. Jest to obecnie jedyna metoda, która może w przyszłości doprowadzić do zrozumienia oraz przewidywania struktur kwadrupleksów *in vivo*.

Przykładem cząsteczki wykazującej polimorfizm strukturalny jest oligonukleotyd o sekwencji ludzkiego telomerowego DNA (34). W kryształach, w obecności kationów potasu, cząsteczka d(TAGGGTTAGGGT) przyjmuje formę dwuniciowego kwadrupleksu typu równoległego, w którym G-tetrazy połączone są pętlami zewnętrznymi, a wszystkie reszty guanozyny są w konformacji *anti* (rys. 25 A).

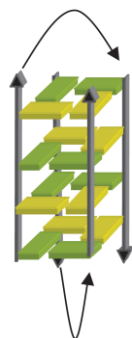


Rys. 25. Schematyczna struktura krystalograficzna kwadrupleksu o sekwencji d(TAGGGTTAGGGT) (PDB ID: 1K8P) (A) oraz jej model w roztworze (B)

Co interesujące, w roztworze zawierającym kationy K^+ , cząsteczka ta istnieje w postaci dwóch form. Forma kwadrupleksu typu równoległego (konformer I) jest podobna do struktury w kryształach.

Druga forma (konformer II) to struktura antyrównoległa typu góra-dół-góra-dół (rys. 25 B) posiadająca pętle boczne i mieszane konformacje *syn•anti•syn•anti* w obrębie G-tetrad (60). Równowaga pomiędzy tymi formami zależy między innymi od temperatury. W temperaturze < 50°C dominuje forma antyrównoległa. Wprowadzenie niewielkiej modyfikacji polegającej na zastąpieniu jednej reszty tymidyny przez deoksyurydynę, również wpływa na istniejące w roztworze równowagi konformacyjne. W przypadku modyfikacji TAGGG(dU)TAGGGT w roztworze dominuje konformer I, natomiast dla cząsteczki dodatkowo zawierającej d(^{Br}U), (dU)AGGGT(d^{Br}U)AGGGT, w tych samych warunkach przeważa konformer II (60).

Inna, niewielka modyfikacja sekwencji d(TAGGGTTAGGGT) polegająca na włączeniu reszt LNA w pozycjach 4, 5, 11 lub 3, 4, 5, 9, 10, 11 nici DNA, sprzyja także powstawaniu tylko konformeru I. Jest to wynikiem wymuszonej formy C3'-*endo* reszt LNA oraz uprzywilejowanej dla tych reszt konformacji *anti* wokół wiązania N-glikozydowego (94). Istnienie równowag konformacyjnych w roztworze w przypadku kwadrupleksów jest raczej regułą niż wyjątkiem. Przykładem może być również cząsteczka o występującej u *Tetrahymena* sekwencji d(TGGGGTTGGGGT), dla której zaobserwowano w roztworze występowanie dimerycznych kwadrupleksów typu antyrównoległego, różniących się tylko ułożeniem dwóch pętli bocznych (głowa-głowa lub głowa-ogon) (95). Inna cząsteczka zawierająca ciąg czterech reszt guanozyny o występującej u *Oxytricha nova* sekwencji d(GGGGTTTTGGGG), również tworzy kwadrupleks typu antyrównoległego (30;96). Unikalną cechą tej struktury jest połączenie tetrad za pomocą pętli przekątnych, które nie występują w przypadku innych krótkich sekwencji telomerowych tworzących dwuniciowe kwadrupleksy (rys. 26).

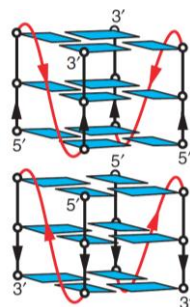


Rys. 26. Schematyczna struktura kwadrupleksu o sekwencji d(GGGGTTTTGGGG) (PDB ID: 2AKG)

Cząsteczka RNA o sekwencji r(UAGGGUUAGGGU), podobnie jak omawiana powyżej analogiczna sekwencja DNA, d(TAGGGTTAGGGT), tworzy w roztworach zawierających kationy K⁺ (18) lub Na⁺ (88) równoległy dwuniciowy kwadrupleks z pętlami zewnętrznymi. Zasadnicza różnica pomiędzy strukturą DNA i RNA dotyczy konformacji reszt cukrowych. W DNA (struktura w kryształach, PDB ID: 1K8P) forma C2'-*endo* jest konformacją preferowaną dla wszystkich reszt, natomiast w przypadku RNA (struktura w roztworze, PDB ID: 2KBP) zaobserwowano zróżnicowanie konformacji pierścieni cukrowych. Reszty centralnych G-tetrad przyjmują

konformację C3'-endo, reszty z regionu pętli konformację C2'-endo, a reszty terminalne zarówno konformację C2'-endo jak i C3'-endo.

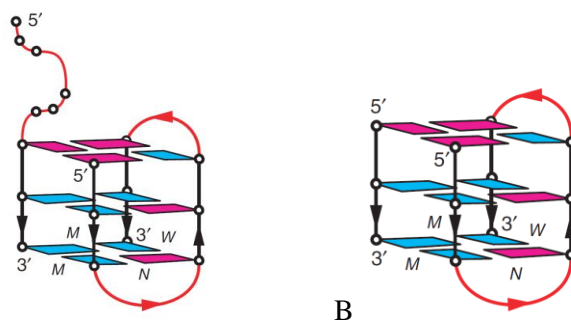
Modyfikacja, omawianej powyżej sekwencji RNA, polegająca na usunięciu dwóch reszt (U i A) z końca 5' prowadzi do powstania interesującej formy przedstawionej schematycznie na rys. 27. W roztworze, w środowisku kationów K⁺, następuje dimeryzacja struktur kwadrupleksów, która jest stabilizowana oddziaływaniem warstwowym pomiędzy tetradami z końców 5' (18).



Rys. 27. Model kwadrupleksu oddziałującego warstwowo końcami 5'.

Struktury oparte o trójkrotne powtórzenie sekwencji

W 2005 roku pokazano, iż dwuniciowe kwadrupleksy nie muszą powstawać z dwóch identycznych nici (97). Częsteczka d(GGGTTAGGGTTAGGGT) o sekwencji ludzkiego telomerowego DNA w roztworze zawierającym jony sodu tworzy asymetryczny dwucząsteczkowy kwadrupleks, w którym G-tetrazy są utworzone przez trzy trakty guanozynowe jednej nici oraz zawierający trzy reszty guanozyny, koniec 3' drugiej nici (rys. 28 A). Częsteczka ta może również asocjować z krótkim fragmentem typu d(TAGGGT) tworząc kwadrupleks o takiej samej topologii (rys. 28 B). Obserwacja ta jest szczególnie ważna, gdyż jak wcześniej wspomniałam, jeden z modeli struktury telomeru (rys. 23) zakłada taki właśnie model powstawania kwadrupleksu typu (3+1).

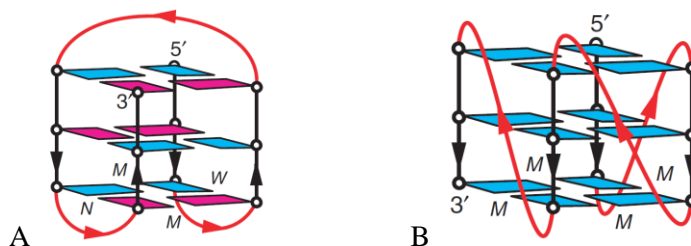


Rys. 28. Schematyczny model kwadrupleksu typu (3+1) zbudowany: z dwóch nici d(GGGTTAGGGTTAGGGT) (A), z nici d(GGGTTAGGGTTAGGGT) oraz d(TAGGGT) (B)

Struktury oparte o czterokrotne powtórzenie sekwencji

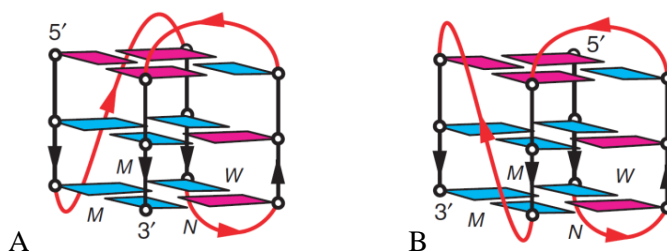
Dla dłuższych sekwencji telomerowych zawierających cztery G-trakty brak jest jednej dominującej topologii, a wręcz obserwuje się jeszcze większą ich różnorodność. Przykładem może być cząsteczka o sekwencji d[AGGG(TTAGGG)₃], która w obecności kationów sodu tworzy

w roztworze antyrównoległy kwadrupleks typu góra-góra-dół-dół (32). W kryształach natomiast, w obecności kationów potasu, tworzy się zupełnie inna struktura, w której nici są ułożone równoległe a trzy zewnętrzne pętle usytuowane są w bruzdach (34). Porównanie tych struktur przedstawione jest schematycznie na rysunku 29.



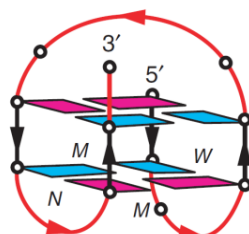
Rys. 29. Schematyczna struktura kwadrupleksu o sekwencji $d[AGGG(TTAGGG)_3]$ w roztworze (PDB ID: 143D) (A) i w kryształach (PDB ID: 1KF1) (B)

Wprowadzenie krótkich sekwencji flankujących na końcach 5' lub 3' do omówionej powyżej cząsteczki ma ogromny wpływ na typ tworzącej się struktury. Na przykład cząsteczki o sekwencjach $d[TAGGG(TTAGGG)_3]$ (98) oraz $d[TAGGG(TTAGGG)_3TT]$ (99) przyjmują w roztworze różne formy, tworząc, pokazane na rysunku 30, kwadrupleksy typu (3+1) opisane jako forma I lub II.



Rys. 30. Schematyczna struktura w roztworze kwadrupleksów typu (3+1) o sekwencjach: $d[TAGGG(TTAGGG)_3]$, forma I (PDB ID: 2JSM, 2JSK) (A), $d[TAGGG(TTAGGG)_3TT]$, forma II, (PDB ID: 2JSL, 2JSQ) (B)

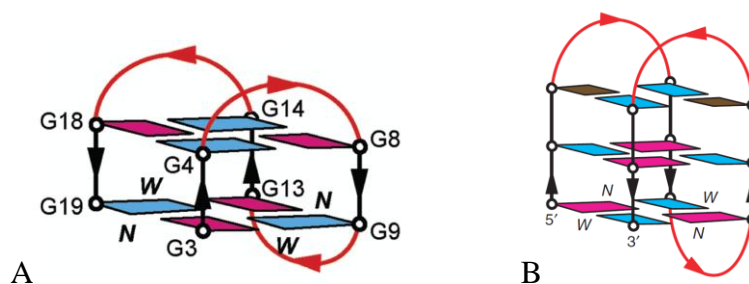
Z kolei cząsteczka o sekwencji $d[TAGGG(TTAGGG)_3T]$ w roztworze występuje w równowadze form I i II, w porównywalnych ilościach (100). Natomiast oligomery $d[TTGGG(TTAGGG)_3A]$ (100) i $d[AAAGGG(TTAGGG)_3AA]$ (101) tworzą w roztworze jedynie pojedynczą formę typu I. Kwadrupleks utworzony przez cząsteczkę $d[GGG(TTAGGG)_3T]$ jest trwalszy od formy I oraz II pomimo, że jest on zbudowany tylko z dwóch tetrad (rys. 31), (59).



Rys. 31. Schematyczna struktura kwadrupleksu o sekwencji $d[GGG(TTAGGG)_3T]$, (PDB ID: 2KF8)

Cząsteczki o podobnych sekwencjach, różniące się tylko długością G-traktu mogą tworzyć zupełnie odmienne struktury. Na przykład kwadrupleks zbudowany z nici zawierającej typowy trakt

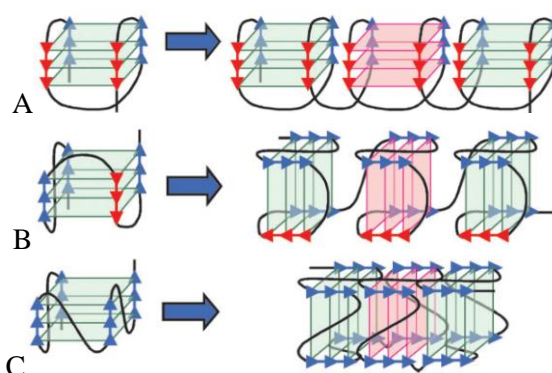
guanozynowy d[TAGGG(TTAGGG)₃] zawiera mieszane typy pętli (rys. 30 A) (98), natomiast nić DNA o sekwencji d[TAGG(TTAGG)₃] z *Bombyx Mori*, w której występują dwie kolejne reszty guanozyny, tworzy unikalny dla powtórzeń telomerowych kwadrupleks z trzema pętlami bocznymi (rys. 32 A) (57). Jednak to nie długość G-traktu jest odpowiedzialna za powstawanie takiej formy kwadrupleksu. Dla przykładu cząsteczka d[AGGG(CTAGGG)₃], zawierająca w sekwencji ciąg trzech reszt guanozyny tworzy również strukturę z trzema pętlami bocznymi (102), która dodatkowo stabilizowana jest mieszaną tetradą G:C:G:C (rys. 32 B).



Rys. 32. Model kwadrupleksu w roztworze dla cząsteczki d[TAGG(TTAGG)₃] (A), struktura kwadrupleksu w roztworze dla cząsteczki d[AGGG(CTAGGG)₃], (PDB ID: 2KM3) (B); kolorem brązowym oznaczono resztę cytydyny.

Topologia kwadrupleksów zależy nie tylko od sekwencji zasad, typu jonów, ale także od stężenia samego DNA. Przykładowo, zależnie od stężenia DNA, powtórzenia telomerowe d[AGGG(TTAGGG)₃] oraz d[GGG(TTAGGG)₁₅] mogą formować antyrównoległy, hybrydowy lub równoległy kwadrupleks (42). Obecność etanolu, który symuluje sfloczenie molekularne lub efekt dehydratacji (40), może indukować zmianę topologii kwadrupleksów (42).

Przyjmuje się, że cząsteczki zbudowane z większej liczby powtórzeń mogą przyjmować taką samą strukturę jak poszczególne podjednostki, np. powtórzenie d[GGG(TTAGGG)₁₅] może być powieleniem struktury podstawowej podjednostki d[GGG(TTAGGG)₃]. Idea ta jest przedstawiona schematycznie na rysunku 33.



Rys. 33. Modele kwadrupleksów dla krótkich i długich sekwencji telomerowych, w warunkach fizjologicznych w obecności kationów potasu; kwadrupleks antyrównoległy (A), typu (3+1) (B), równoległy (C).

Polimorfizm strukturalny cząsteczek DNA silnie kontrastuje z obserwowanym konserwatywnym topologii telomerowych kwadrupleksów RNA (16). Widma dichroizmu

kołowego sugerują, że podobnie jak pojedyncze powtórzenia telomerowe, również nieco dłuższe powtórzenia, zbudowane z motywów r(UUAGGG), niezależnie od rodzaju kationów, formują wyłącznie równoległe struktury kwadrupleksów RNA (18;88).

Sekwencje promotorowe genów

Podczas gdy sekwencje nukleotydów w telomerach są niezienne i powtarzalne, regiony promotorowe genów zbudowane są ze zmiennej liczby reszt guanozynowych, rozdzielonych niesymetrycznymi, krótkimi, często jednonukleotydowymi łącznikami. W promotorach takich protoonkogenów jak: c-MYC (103;104), VEGF (105), RET (106), KRAS (107), Bcl-2 (108;109), c-KIT (110), PDGF-A (111) oraz HIF-1 α (112) zidentyfikowano sekwencje, które są zdolne do tworzenia kwadrupleksów. Coraz większe zainteresowanie tymi cząsteczkami wynika z faktu, iż dowiedziono, że obecność kwadrupleksu w obrębie protoonkogenu hamuje jego ekspresję (113).

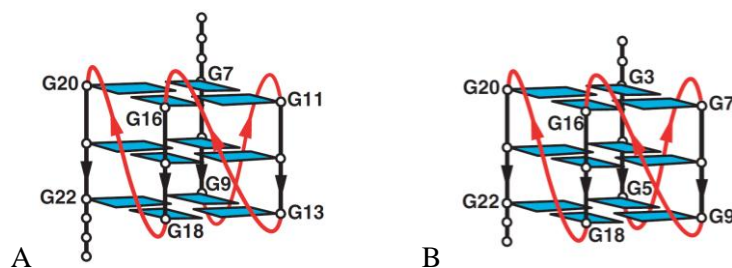
Struktury oparte o sekwencje genu c-myc

Gen *c-myc* to jeden z kluczowych genów w procesach dzielenia się komórek, a mutacje w jego obrębie prowadzą do powstawania nowotworów. Przedmiotem intensywnych badań jest sekwencja zawierająca sześć traktów guanozyny, która jest częścią kontrolującego transkrypcję elementu NHE III_I (ang. *nuclease hypersensitivity element III_I*) w regionie promotorowym genu *c-myc*. 27-mer odpowiadający fragmentowi *c-myc* NHE III_I (tab. 6) tworzy alternatywne struktury zależnie od tego, które trakty guanozynowe uczestniczą w formowaniu szkieletu kwadrupleksu i w konsekwencji w roztworze istnieje wiele form w równowadze. Aby otrzymać cząsteczki tworzące w roztworze pojedynczą formę przebadano ponad 50 wariantów sekwencji, nieco krótszych od nici dzięki, w których niektóre reszty guanozyny zamieniono resztami tymidyny. W tabeli 6 zamieściłam jedynie te sekwencje oligonukleotydów, które przyjmują pojedynczą formę w roztworze.

Tabela 6. Warianty sekwencji c-myc NHE III_I

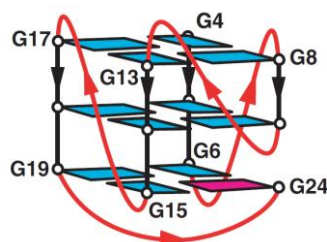
Oznaczenie	Sekwencja
fragment <i>c-myc</i> NHE III _I	TGGGGAGGGTGGGGAGGGTGGGGGAAGG
I - <i>c-myc-2345</i>	TGAGGGTGGGGAGGGTGGGGAA
II - <i>c-myc-1245</i>	TGGGGAGGGT TTTT AGGGTGGGGA
III - typ <i>c-myc-2345</i>	TGAGGGTGGGT AGGGTGGGTAA
IV - <i>c-myc-23456</i>	TGAGGGTGGGGAGGGTGGGGGAAGG

Tworzą one trzy różne typy równoległych kwadrupleksów różniących się głównie kolejnością ciągów guanozyny wchodzących w skład trzonu kwadrupleksów. I tak forma I (*c-myc-2345*) włącza drugi, trzeci, czwarty oraz piąty G-trakt (rys. 34 A), natomiast forma II (*c-myc-1245*) trakty pierwszy, drugi, czwarty oraz piąty (rys. 34 B) (114).



Rys. 34. Schematyczna struktura równoległego kwadrupleksu dla *c-myc-2345* (PDB ID: 1XAV), (A) i modelu dla *c-myc-1245* (B)

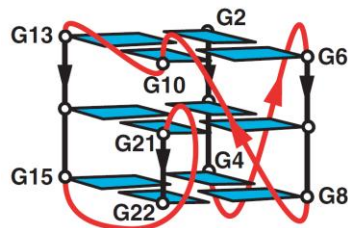
Charakterystyczną cechą tych struktur jest obecność dwóch jednonukleotydowych, zewnętrznych pętli (odpowiednio T₁₀ i A₆) spinających trzy tetrady. Oligomer o sekwencji III (tab. 6) zawiera w pozycjach 14 i 23 reszty tymidyny zamiast guanozyny (pogrubiona czcionka). Topologia powstającego kwadrupleksu jest identyczna z topologią wyznaczoną dla cząsteczki o sekwencji *c-myc-2345*, gdzie reszty 14 i 23 także stanowiły element pętli (115). Najbliższa sekwencji typu dzikiego *c-myc* NHE III_I, sekwencja IV (*c-myc-23456*, tab. 6) zawiera aż pięć G-traktów zaangażowanych w tworzenie kwadrupleksu. W tej nietypowej strukturze (rys. 35) pojedyncza reszta guanozyny (G₂₄) wchodząca w skład piątego G-traktu, dopełnia terminalną G-tetradę (ang. *snap-back*), przyjmując konformację *syn* (116).



Rys. 35. Schematyczna struktura kwadrupleksu cząsteczki TGAGGGTGGGGAGGGTGGGGAAGG, (*c-myc-23456*), (PDB ID: 2A5P); reszty guanozyny zaangażowane w tworzenie G-tetrady zostały podkreślone; kolor niebieski - reszty tworzące pętle

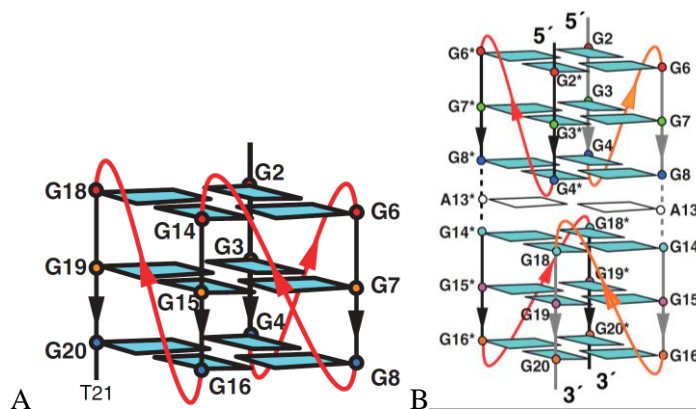
Struktury oparte o sekwencje genu *c-kit*

Gen *c-kit* jest protoonkogenem kodującym kinazę tyrozynową, będącą receptorem dla czynnika wzrostu komórek macierzystych. Mutacje w tym genie są powszechne w wielu nowotworach, np. w guzie podścieliskowym przewodu pokarmowego (GIST), a także mogą łączyć się z zaburzeniami w pigmentacji. W regionie promotora ludzkiego genu *c-kit*, hiperczułego na nukleazy, zidentyfikowano dwie sekwencje bogate w reszty guanozyny, *c-kit1* oraz *c-kit2*, powyżej sekwencji kodującej gen. Cząsteczki o tych sekwencjach tworzą kwadrupleksy posiadające nieznaną dotąd motyw strukturalny. W utworzenie terminalnej tetrady, G₂:G₆:G₁₀:G₁₃, (rys. 36) zaangażowana jest izolowana reszta guanozyny G₁₀, która nie jest elementem żadnego z ciągów guanozynowych, natomiast stanowiąca element G-traktu reszta G₂₀ z końca 3' współtworzy pętlę.



Rys. 36. Schematyczna struktura kwadrupleksu cząsteczki AGGGAGGGCGCTGGGAGGAGGG, (*c-kit1*), (PDB ID: 2O3M); reszty guanozyny zaangażowane w tworzenie G-tetrazy zostały podkreślone; kolor niebieski - reszty tworzące pętle

W rezultacie dwunukleotydomowa pętla ($C_{11}T_{12}$) łączy dwa przyległe wierzchołki (G_{10} i G_{13}), a pięcionukleotydomowa pętla o sekwencji $A_{16}G_{17}G_{18}A_{19}G_{20}$ umożliwia włączenie reszt G_{21} i G_{22} do G-tetrad i równoległe ułożenie tego odcinka nici (rys. 36), (110;117).



Rys. 37. Schematyczna struktura kwadrupleksu cząsteczki CGGGCGGGCGCGAGGGAGGGT (*c-kit2*): forma monomeryczna (PDB ID: 2KYP) (A), forma dimeryczna (PDB ID: 2KYO) (B); reszty guanozyny zaangażowane w tworzenie G-tetrazy zostały podkreślone; kolor niebieski - reszty tworzące pętle

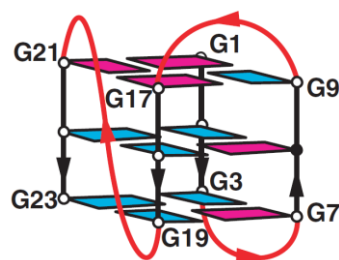
Cząsteczka o sekwencji *c-kit2*, d(CGGGCGGGCGCGAGGGAGGGT) może przyjmować w roztworze dwie formy. W niskim stężeniu kationów potasu powstaje typowy jednocząsteczkowy kwadrupleks (rys. 37 A), natomiast 5-krotne zwiększenie stężenia tych kationów do 100 mM, prowadzi do powstania kwadrupleksu o nieznanym dotąd topologii (rys. 37 B). Dwucząsteczkowy, zazębiony (ang. *interlocked*) kwadrupleks stabilizowany jest oddziaływaniem warstwowym pomiędzy G-tetradami, w którym pośredniczy niekanoniczna para zasad A:A (118).

Struktury oparte o sekwencje genu *bcl-2*

Gen *bcl-2* należy do protoonkogenów, których uszkodzenie objawia się niekontrolowanym wzrostem ich aktywności lub ekspresji, co prowadzi do powstania nowotworu. Prawidłowy gen *bcl-2* umiejscowiony jest na chromosomie 18q21, jednak w wyniku translokacji może zostać przeniesiony, co prowadzi do zwiększonej ekspresji i nadprodukcji jego białkowego produktu. Nadekspresja białka BCL2, produktu genu *bcl-2*, może powodować oporność nowotworów na chemio- i radioterapię, w wyniku hamowania procesu apoptozy w komórkach guza.

Cząsteczka o sekwencji fragmentu promotora P1 genu *bcl-2* d(GGGGCG₁GGCGCGGG-AGGAAGGGGGCGG₂₂GAGCGGGG) posiada sześć traktów guanozynowych zawierających trzy,

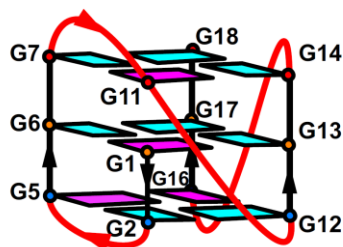
cztery lub pięć kolejnych reszt guanozyny. Tworzy ona stabilny kwadrupleks (*bcl-2* 2345) zbudowany z wewnętrznych traktów guanozyn (rys. 38). Częsteczka ta w stosunku do cząsteczki dzikiej zawiera dwie reszty G₁₅ i G₁₆ zastąpione resztami T₁₅ oraz T₁₆ (109;119).



Rys. 38. Schematyczna struktura kwadrupleksu cząsteczki d(GGGCGCGGGAGGAATTGGGCGGG), (PDB ID: 2F8U)

Struktury oparte o sekwencje intronu genu *chl1*

Gen *chl1* koduje helikazę FANCI, która rozwija struktury G-kwadrupleksów. Również ten gen zawiera sekwencje, które posiadają tendencję do tworzenia struktur kwadrupleksów. Na przykład 19-mer o sekwencji intronu, d(GGGTGGGGAAAGGGTGGGT), tworzy wewnątrzcząsteczkowy kwadrupleks o unikalnych cechach (120). Po pierwsze, jest to niespotykany dotąd przypadek, kiedy pierwsza reszta guanozyny z końca 5' (G₁) bierze udział w tworzeniu wewnętrznej tetrady. Po drugie, pętla w kształcie litery V łączy trzy, a nie jak zwykle dwie tetrady. Dodatkowo pętla ta jest utworzona wyłącznie z fragmentu łańcucha fosfodiesterowego pomiędzy resztami G₁₁ i G₁₂ (rys. 39).

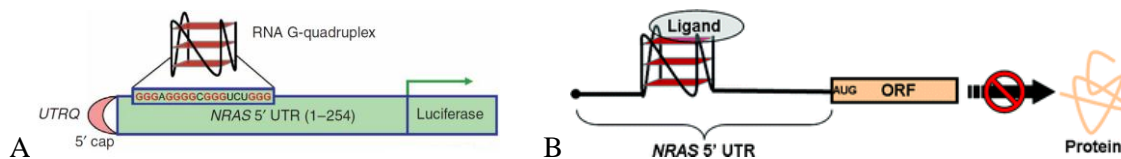


Rys. 39. Schematyczna struktura G-kwadrupleksu dla intronu genu *chl1* o sekwencji GGGTGGGGAAAGGGTGGGT (PDB ID: 2KPR)

Sekwencje mRNA

mRNA występuje *in vivo* w formie pojedynczej nici, więc hybrydyzacja z komplementarną nicią nie powinna konkurować z tworzeniem kwadrupleksu, jak ma to miejsce w DNA. Analiza bioinformatyczna sugeruje, iż w regionie 5'-UTR mRNA może znajdować się ponad 3000 elementów mających tendencję do tworzenia kwadrupleksów. Chociaż dotychczas nie jest znana żadna struktura przestrzenna kwadrupleksu mRNA, istnieją dowody eksperymentalne wskazujące na tworzenie się tego typu struktur *in vitro*. Na przykład, wykorzystując metody spektroskopii CD pokazano, że krótki motyw sekwencji znajdującej się w regionie 5'-UTR protoonkogenu *NRAS*, r(GGGAGGGGCGGGUCUGGG), zlokalizowany 14 reszt nukleotydowych poniżej 5'-czapeczki

(ang. *cap*) oraz 222 reszty powyżej miejsca startu translacji (rys. 40 A), złożony z czterech ciągów guanozynowych, tworzy strukturę równoległego kwadrupleksu w obecności kationów K^+ , Na^+ lub Li^+ (121).



Rys. 40. Lokalizacja motywu 18-nukleotydujowej sekwencji, posiadającej tendencję do tworzenia kwadrupleksu w regionie NRAS 5'-UTR (A), model stabilizacji kwadrupleksu przez ligand i inhibicji translacji (B)

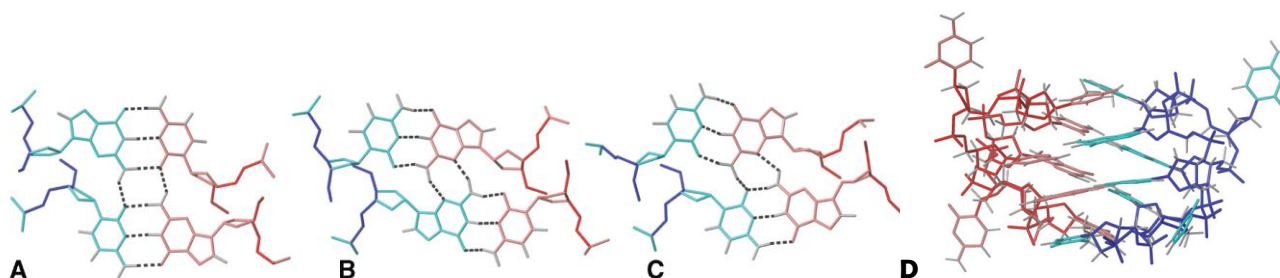
Pokazano również, że motyw ten jest miejscem docelowym (ang. *target*) dla małych ligandów (rys. 40 B), które inhibują translację *in vitro* (122). W roku 2010 ukazały się trzy inne prace opisujące sekwencje mRNA w regionie 5'-UTR, w których na podstawie eksperymentów biofizycznych (spektroskopia CD, UV, profil migracji w żelu natywnym) dowiedziono powstawania stabilnych kwadrupleksów RNA (123-125). Obecnie postuluje się, że występowanie kwadrupleksów w rejonie 5'-UTR mRNA może prowadzić do hamowania lub modulacji translacji.

II.2.4. Nietypowe tetrydy, pentaty i heksady występujące w kwadrupleksach

Tetrydy

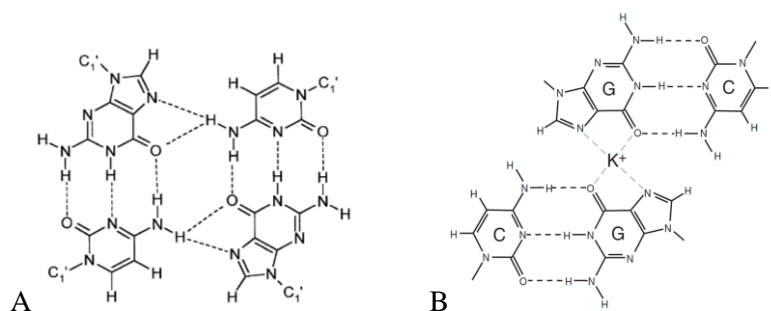
Wraz z rosnącą liczbą struktur kwadrupleksów zdeponowanych w bazie PDB, poszerza się nasza wiedza dotycząca ich niezwyklej różnorodności. Poza typową G-tetradą, coraz częściej spotykanym motywem strukturalnym w kwadrupleksach są nieguanozynowe i mieszane tetrydy, pentady, heksady, heptady, a nawet oktady. Z uwagi na prowadzone przeze mnie badania, szczególnie interesują mnie mieszane tetrydy G:C:G:C. Występują one w znanych strukturach kwadrupleksów zbudowanych z nici DNA, zawierających trójnukleotydujowy motyw CGG.

Bogate w reszty guanozyny i cytydyny sekwencje DNA, zarówno liniowe, jak i cykliczne, mogą tworzyć kwadrupleksy, w których tetrydy są zbudowane z dwóch par zasad C:G typu Watsona-Cricka. Takie kanoniczne pary zasad G:C mogą dimeryzować zarówno od strony wąskiej, jak i szerokiej bruzdy. W znanych strukturach zawierających tetrydy G:C:G:C, gdzie wiązania wodorowe zawiązywane są od strony małej bruzdy (rys. 41 A-C) zaobserwowano, że pary zasad G:C są zawsze nachylone pod kątem ok. 35° w stosunku do osi głównej kwadrupleksu (rys. 41 D) (126). Oddziaływania pomiędzy parami zasad Watsona-Cricka mogą być stabilizowane za pomocą różnych typów wiązań wodorowych, pokazanych na rys. 41 A-C.



Rys. 41. Przykłady tetrad $G:C:G:C$ dimeryzujących od strony wąskiej bruzdy: $G:C:G:C$ - dimeryzacja naprzeciwległych par $G:C$ dla $d\langle pTGCTCGCT \rangle$, (PDB ID: 1EU2) (A), $C:G:C:G$ - przesunięte względem siebie pary $G:C$ dla $d\langle pCCGTCCGT \rangle$, (PDB ID: 2HK4) (127) (B), $C:G:G:C$ - dimeryzacja równoległa par $G:C$ dla $d\langle TCGTTGCT \rangle$, (PDB ID: 1K8Z) (C), struktura kwadrupleksu dla cząsteczki $d\langle pCGCTCCGT \rangle$ (PDB ID: 2K97) (D); $\langle \rangle$ - sekwencje cykliczne

Asocjacja par zasad $G:C$ typu Watsona-Cricka od strony małej bruzdy wyklucza możliwość jednoczesnego powstania G -tetrad w takim kwadrupleksie, ponieważ G -tetrazy są zawsze planarne. Z kolei tetrazy $G:C:G:C$, w których wiązania wodorowe pomiędzy dwiema parami zasad $G:C$ zawiązują się od strony szerokiej bruzdy, występują w strukturze kwadrupleksu łącznie z G -tetradami. W tetradach typu $G:C:G:C$ wszystkie reszty nukleotydowe leżą w jednej płaszczyźnie.

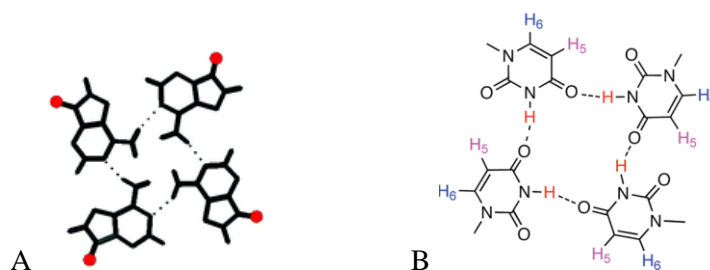


Rys. 42. Przykłady tetrad $G:C:G:C$ dimeryzujących od strony szerokiej bruzdy: dimeryzacja naprzeciwległych par $G:C$ dla $d\langle GGGCTTTTGGGC \rangle$, (PDB ID: 1A8N) (A), dimeryzacja przesuniętych względem siebie par $G:C$ dla $d\langle [AG_3(CTAG_3)_3] \rangle$, (PDB ID: 2KM3) (B)

W zależności od ułożenia dwóch par zasad $G:C$ względem siebie wyróżniamy dwa typy tetrad: naprzeciwległe (w wiązanie wodorowe zaangażowane są dwa protony grupy aminowej reszty cytydyny, rys. 42 A) oraz przesunięte (stabilizowane poprzez oddziaływanie jednowartościowego kationu z atomem N7 oraz grupą karbonylową reszty guanozyny, rys. 42 B).

Innym przykładem nietypowych tetrad występujących w znanych strukturach kwadrupleksów są tetrazy zbudowane z czterech jednakowych reszt nukleotydowych. Na przykład w strukturze kwadrupleksu utworzonego z cząsteczki $d\langle AGGGT \rangle$, obecność centralnie usytuowanych G -tetrad ułatwia powstawanie A -tetrad (128). Na podstawie analizy widm NMR zaproponowano tworzenie, znajdujących się w szybkiej wymianie, dwóch typów tetrad $A(\text{syn}):A(\text{syn}):A(\text{syn}):A(\text{syn})$, w których wiązania wodorowe zawiązują się pomiędzy atomami: $N^6H \cdots N^7$ lub pokazanymi na rys. 43 A atomami $N^6H \cdots N^1$. Oprócz tetrad zbudowanych wyłącznie z reszt purynowych znane są także tetrazy pirymidynowe, zbudowane z czterech reszt urydyny (92;93), tymidyny (129) lub cytydyny (130;131). Przykładowo, w cząsteczce kwadrupleksu RNA

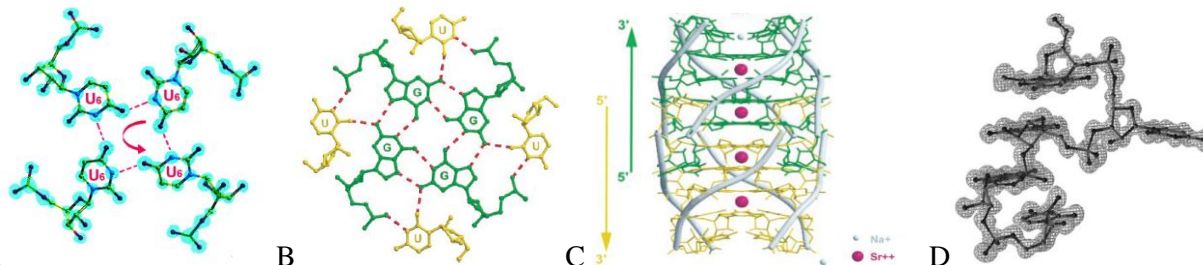
o sekwencji r(UAGGGU) U-tetradę tworzą reszty urydyny z końca 3'. W tej tetradzie (rys. 43 B) wiązania wodorowe zawiązują się pomiędzy atomem azotu N3 i atomem tlenu O4 (93).



Rys. 43. Schemat wiązań wodorowych w tetradach: A:A:A:A (A) i U:U:U:U (B)

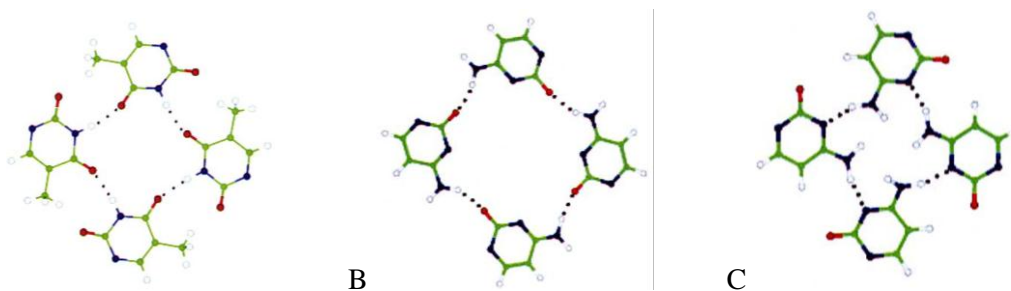
Reszty urydyny mogą być zaangażowane w tworzenie jeszcze bardziej niezwykłych struktur. Na przykład w strukturze krystalograficznej kwadrupleksu RNA o sekwencji r(UGGGGU) zaobserwowano zawiązywanie się jednej tetrady U:U:U:U z końca 3' (rys. 44 A) oraz pokazanego na rys. 44 B, motywu oktady zasad GUGUGUGU powstającego w wyniku zachodzenia na siebie końców 5' dwóch cząsteczek (132).

W strukturze krystalograficznej cząsteczki r(U)^{(Br)dG}r(UGGU) terminalne reszty urydyny, z końców 5' i 3', tworzą typowe tetrady U:U:U:U, natomiast wewnętrzne reszty urydyny są wyrzucone poza helisę (rys. 44 D). Sugeruje to, że terminalne reszty urydyny mają znacznie większą tendencję do tworzenia tetrad niż te znajdujące się dalej od końców (133).



Rys. 44. Schematyczna struktura U-tetrady (A), G:U-oktady (B), dimerycznego kwadrupleksu (kwadrupleks 1 – kolor żółty, kwadrupleks 2 – kolor zielony), zachodzące na siebie strzałki wyznaczają region oktad (C), jedna z czterech nici kwadrupleksu z jednonukleotydowym wybrzuszeniem U

Reszty tymidyny, również i te znajdujące się wewnątrz sekwencji, mogą tworzyć tetrady podobne do urydynowych (rys. 45 A). Wiązania wodorowe zawiązują się pomiędzy atomami azotu N3 i tlenu O4 (129).

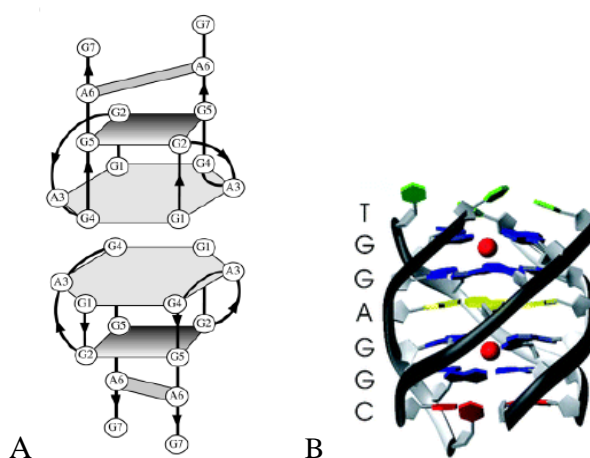


Rys. 45. Schemat wiązań wodorowych w: T-tetradzie (A), C-tetradzie, typ wiązań wodorowych $NH_2 \cdots O^2$ (B), C-tetradzie, typ wiązań wodorowych $NH_2 \cdots N^3$ (C)

Badania metodami spektroskopii NMR pokazują, iż protonowanie reszt cytydyny nie jest koniecznym wymogiem do utworzenia motywu C-tetrad. Dotychczas znane są dwa przykłady nieprotonowanych C-tetrad. W strukturze równoległego kwadrupleksu o sekwencji d(TGGGCGGT)₄ powstaje C-tetrad z wiązaniami wodorowymi pomiędzy grupą NH₂ oraz atomem tlenu O2 (rys. 45 B), a w cząsteczce o sekwencji d(TGGTGGC)₄ pomiędzy grupą aminową i atomem azotu N3 (rys. 45 C), (131). Obecność reszt cytydyny może także, w zależności od rodzaju kationu, utrudniać powstawanie kwadrupleksu. Na przykład dla cząsteczki d(TGGCGGC) zaobserwowano, że w roztworze, w obecności kationów potasu powstaje kwadrupleks, natomiast obecność kationów sodu indukuje formę dupleksu. Dopiero w kwaśnym środowisku (pH 2.2), w obecności kationów Na⁺, równowaga pomiędzy tymi konformacjami przesuwana się w kierunku formy kwadrupleksu (130).

Pentady oraz heksady

Analiza struktur znajdujących się w bazie PDB pokazuje, że repertuar kanonicznych kwadrupleksów opartych o trzon zbudowany z G-tetrad może zostać urozmaicony o motyw pentady (35) lub heksady (134), gdy w sekwencji zasad występuje motyw GGAGG. W pentadach i heksadach reszty adenozyne układają się w wąskiej bruzdzie G-tetrazy.

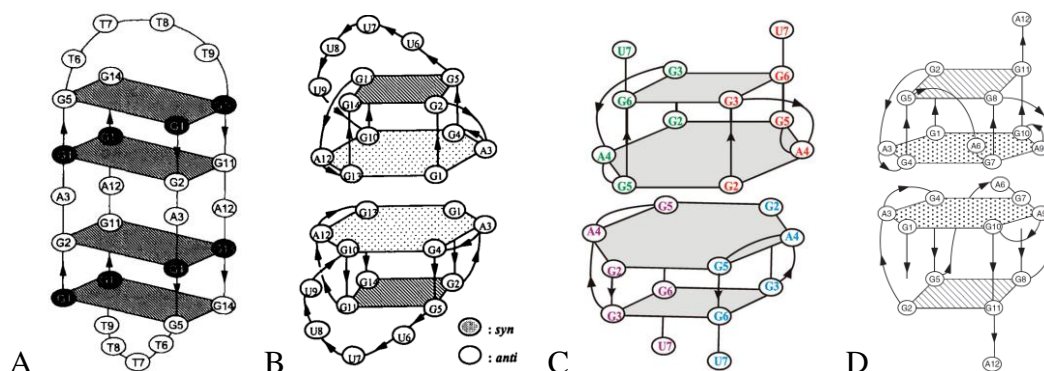


Rys. 46. Schematyczna struktura kwadrupleksu zawierającego motyw heksady dla cząsteczki d(GGAGG-AG) (134) (A), A-tetrady dla cząsteczki d(T-GGAGG-C) (135) (B)

W serii DNA motyw heksady zaobserwowano dla cząsteczki d(GGAGG-AG). Zbudowany z dwóch nici kwadrupleks posiada jedną tetradę G:G:G:G oraz heksadę G:G:A:G:G:A (rys. 46 A). Dwie cząsteczki kwadrupleksu asocjują przyjmując bardziej skomplikowaną formę. Powstaje trwały dimer, który jest stabilizowany oddziaływaniem warstwowym pomiędzy dwiema heksadami (134). Powstawanie tego typu struktur w DNA silnie zależy od liczby powtórzeń motywu d(GGAGG), sekwencji flankującej ten motyw oraz typu łącznika. Na przykład cząsteczka o sekwencji d(T-GGAGG-C), posiadająca na końcach 5' i 3' odpowiednio reszty tymidyny i cytydyny (rys. 46 B), tworzy typowy, równoległy kwadrupleks z centralną tetradą A:A:A:A (135).

W serii RNA powtórzenia typu r(GGAGG), znacznie silniej niż w DNA, determinują powstawanie heksad typu G:A:G:G:A:G. Na przykład bardzo podobne sekwencje DNA d(GGAGG-TTTTGGAGG) i RNA r(GGAGGUUUUGGAGG) przyjmują w roztworze zdecydowanie różne formy (136). Podczas, gdy DNA występuje w roztworze jako dwuniciowy kwadrupleks z A-tetradą (rys. 47 A), cząsteczki RNA tworzą dimer jednoniciowych kwadrupleksów (rys. 47 B) z heksadą purynową G:A:G:G:A:G (136).

Cząsteczki RNA o sekwencji zasad r(U-GGAGG-U) (rys. 47 C) oraz r(GGAGG-A-GGAGG-A) (rys. 47 D), zawierające motyw r(GGAGG), również tworzą heksady purynowe (17;137). Podobnie jak w omawianych wcześniej przykładach, obecność heksad prowadzi do dimeryzacji kwadrupleksów.

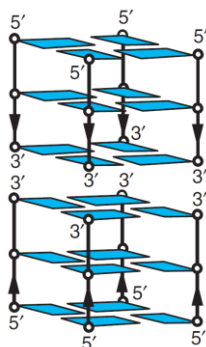


Rys. 47. Schematyczne struktury kwadrupleksów cząsteczek: d(GGAGG-TTTT-GGAGG) (A), r(GGAGG-UUUU-GGAGG) (B), r(U-GGAGG-U) (C), r(GGAGG-A-GGAGG-A) (D)

II.2.5. Inne, nietypowe struktury kwadrupleksów

Dimery

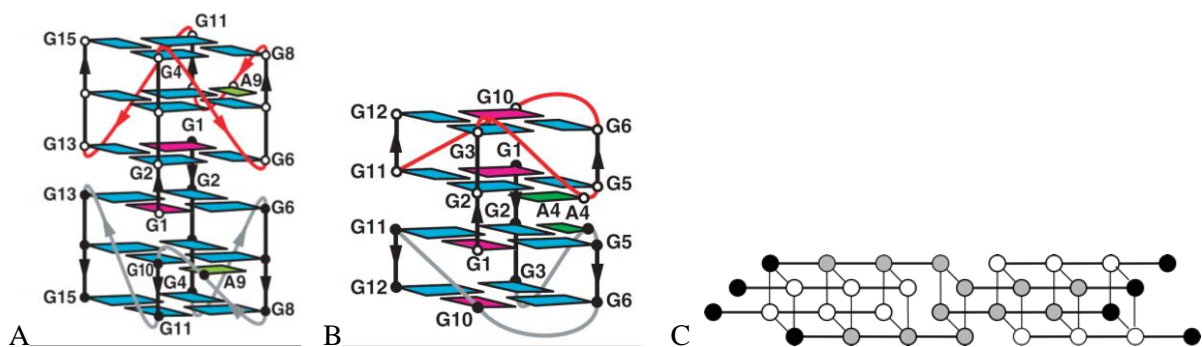
Gdy sekwencja zasad cząsteczek tworzących kwadrupleksy zaczyna się lub kończy resztą guanozyny, często obserwuje się oddziaływania warstwowe pomiędzy terminalnymi G-tetradami oraz powstawanie struktur wyższego rzędu. Przykładowo, dla cząsteczki d(TTAGGG) wyższe stężenie DNA i/lub kationów K^+ prowadzi do asocjacji kwadrupleksów (31) poprzez oddziaływanie warstwowe pomiędzy tetradami z końców 3' (rys. 48). W celu uniknięcia tego typu asocjacji, znacznie częściej bada się sekwencje, które nie zawierają na końcach 5' lub 3' reszt guanozyny.



Rys. 48. Schematyczna struktura dwóch kwadrupleksów, oddziałujących warstwowo końcami 3'

Zazębiające się kwadrupleksy (ang. interlocked)

Jeszcze bardziej skomplikowane struktury mogą tworzyć cząsteczki o sekwencjach złożonych z traktów o różnej liczbie reszt guanozyny lub gdy liczba tych traktów jest niewystarczająca do utworzenia jednoniciowego kwadrupleksu. Przykładem może być cząsteczka o sekwencji d(GGGGTGGGAGGAGGGT), która zawiera G-trakty różnej długości i tworzy tzw. zazębiający się kwadrupleks (rys. 49 A), w którym dwie monomeryczne podjednostki łączą się poprzez dwie uwspólnione tetrazy zbudowane z reszty G₁ jednej nici oraz z reszt G₂, G₆ i G₁₃ drugiej nici (138). Cząsteczka d(GGGAGGTTTGGGAT), posiadająca tylko trzy G-trakty różnej długości także tworzy stabilny, zazębiający się kwadrupleks. W miejscu zazębienia powstają dwie pentady typu A:(G:G:G:G), a reszty guanozyny G₁ są ich łącznikami (rys. 49 B) (35).



Rys. 49. Schematyczna struktura zazębiających się kwadrupleksów utworzonych z cząsteczek: d(GGGGTGGGA-GGAGGGT) (A), d(GGGAGGTTTGGGAT) (B), d(GGGT) (C)

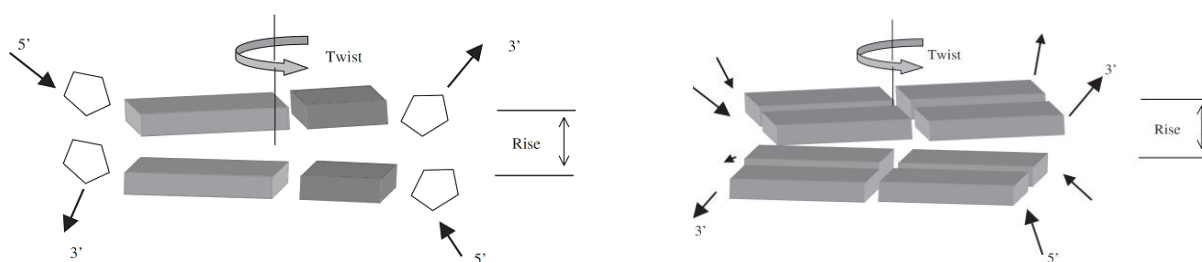
Krótkie nici, bogate w reszty guanozyny, które przyjmują formę równoległego, czteroniciowego kwadrupleksu mogą przesuwać się względem siebie o jedną lub więcej reszt nukleotydowych. Może to prowadzić do powstawania tzw. lepkich końców (niesparowanych reszt guanozyny), które następnie asocjują tworząc zazębiony kwadrupleks (rys. 49 C) jak np. dla cząsteczki o sekwencji d(GGGT) (139). Przesuwanie się reszt nukleotydowych względem siebie może być powszechnym zjawiskiem dla krótkich sekwencji bogatych w reszty guanozyny np. dla powtórzeń CGG.

II.2.6. Podsumowanie

Analiza znanych struktur kwadrupleksów DNA pokazuje, że większość ich parametrów strukturalnych jest zbliżona do dupleksów DNA. Szczegółowe dane zawarte są w tabeli 7.

Tabela 7. Porównanie najważniejszych parametrów dla dupleksów oraz kwadrupleksów DNA (38)

typ struktury	B-DNA	A-DNA	Z-DNA	równoległy kwadrupleks	antyrownoległy kwadrupleks
skok helisy (Å)	3.40	2.90	3.7	3.13	3.30
skręt (°)	36.7	32.7	-10/-50	30.0	30.0
szerokość bruzdy (Å)	11.7/5.7	2.7/11	8.5	10.2	12
kierunkowość nici	+ -	+ -	+ -	++++	++-, +---, +---
kierunek skręcenia	prawoskrętna	prawoskrętna	lewoskrętna	prawoskrętna	prawoskrętna
Liczba par zasad na zwój	10.5	11.0	12.0	12.0	12.0
średnica (Å)	18	26		23	21-23
C1'-C1'	10			16	16
konformacja cukru	C2'-endo	C3'-endo	C2/ C3'-endo	C2'-endo	C2'-endo



Rys. 50. Oddziaływania warstwowe pomiędzy zasadami dla dupleksu oraz kwadrupleksu, na rysunku zaznaczono główne parametry helikalne: skręt (ang. twist) oraz skok helisy (ang. rise)(38)

II.3. Metody stosowane do badań kwadrupleksów

II.3.1. Metody spektroskopii NMR w analizie strukturalnej kwadrupleksów

W badaniach metodami magnetycznego rezonansu jądrowego informacje o strukturze przestrzennej cząsteczek kwasów nukleinowych otrzymujemy na podstawie analizy takich parametrów jak:

- przesunięcia chemiczne jąder ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P ;
- szerokość, kształt i intensywność sygnałów rezonansowych;
- sprzężenia skalarnie ($^3J_{\text{HH}}$, $^nJ_{\text{CH}}$, $^nJ_{\text{PH}}$);
- efekt Overhausera (NOE);
- czas relaksacji T1 (spin-sieć) i T2 (spin-spin);
- współczynnik dyfuzji

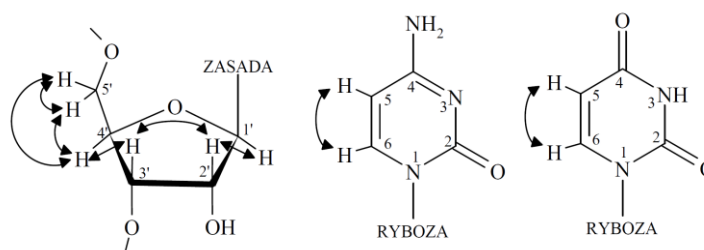
Standardowy zestaw widm NMR służący do wyznaczenia struktury w roztworze, dla cząsteczek o naturalnej zawartości izotopów, obejmuje eksperymenty homonuklearne (^1H NMR, 2D ^1H - ^1H NOESY, 2D ^1H - ^1H COSY) oraz heteronuklearne (2D: ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{15}N HSQC, ^1H - ^{31}P HSQC). Oddziaływania pomiędzy spinami jądrowymi obserwujemy na widmach dwuwymiarowych jako sygnały korelacyjne. Ich intensywność w zależności od rodzaju widma jest zależna od odległości lub wartości stałej sprzężenia pomiędzy jądrami odpowiedzialnymi za obserwowany sygnał korelacyjny. W widmach dwuwymiarowych typu COSY czy HSQC obserwuje się oddziaływania skalarnie poprzez wiązania kowalencyjne, natomiast oddziaływania dipolowe, poprzez przestrzeń, rejestruje się w widmach NOESY. Wielkość efektu Overhausera pomiędzy protonami jest odwrotnie proporcjonalna do szóstej potęgi odległości pomiędzy nimi.

Widma 1D i 2D oparte o zjawisko Overhausera (1D NOE, 2D NOESY) pozwalają na zidentyfikowanie atomów wodoru oddalonych od siebie do około 5 Å. W widmach 1D NOE selektywnie naświetla się poszczególne protony. Te protony, które są w bliskiej odległości do selektywnie naświetlanych dają intensywniejsze sygnały w widmie, w stosunku do sygnałów zarejestrowanych bez uprzedniego naświetlania. Na podstawie różnic w intensywności poszczególnych sygnałów w widmie, otrzymanym po odjęciu od siebie takich jednowymiarowych widm NOE, można ustalić, które protony znajdują się w bliskim sąsiedztwie w przestrzeni. W widmach 2D NOESY (ang. *Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy*) wszystkie protony wzbudzone są jednocześnie i w efekcie otrzymuje się informacje o wszystkich atomach wodoru oddziałujących dipolowo w cząsteczce. Typowe odległości pomiędzy atomami wodoru w regularnych helisach B-DNA i A-RNA przedstawiłam w tabeli 8.

Tabela. 8. Typowe odległości wewnątrz- i międzynukleotydowe dla A-RNA i B-DNA [\AA]

odległość	RNA		DNA	
	wewnątrznukleotydowa	międynukleotydowa	wewnątrznukleotydowa	międynukleotydowa
H8/H6-H1'	3.4-3.9	4.4-5.2	3.6-3.9	3.0-4.8
H8/H6-H2'	3.4-4.3	1.8-2.6	2.0-3.6	2.2-4.0
H8/H6-H2''			3.4-4.5	2.0-3.4
H8/H6-H3'	2.7-3.5	3.0-3.8	2.5-4.7	3.7-5.1
H8/H6-H4'	3.9-4.8	5.3-6.2	4.3-5.2	5.6-6.4
H8/H6-H5'	3.6-4.5	6.8-7.4	3.6-4.9	6.9-7.8
$\gamma = \text{gauche+}$				
H8/H6-H5''	4.0-4.7	5.9-6.5	3.7-4.4	6.6-7.4
$\gamma = \text{gauche+}$				
H1'-H2'	2.7-2.8	3.9-4.4	2.7-3.0	4.5-7.2

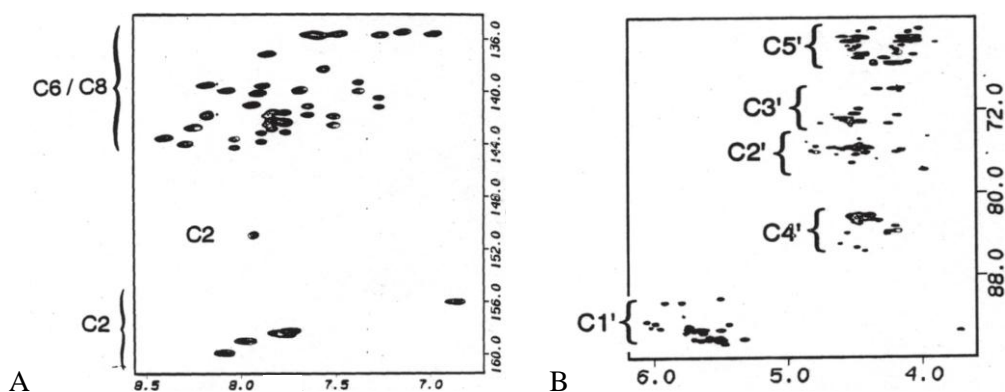
Widma typu COSY i HSQC opierają się o transfer magnetyzacji poprzez sprzężenia skalarne. W widmie 2D COSY korelowane są sygnały pochodzące od protonów oddalonych na ogół o nie więcej niż trzy wiązania kowalencyjne, natomiast w widmie HSQC korelowane heterojądra są odległe o jedno wiązanie chemiczne. Na rysunku 51 przedstawiłam wszystkie sprzężenia skalarne pomiędzy protonami reszty cukrowej oraz protonami zasad heterocyklicznych, które obserwuje się w RNA.

**Rys. 51.** Sprzężenia skalarne pomiędzy protonami reszty cukrowej oraz pomiędzy protonami H6-H5 w zasadach pirymidynowych.

Z powodu silnego nakładania się sygnałów H2'/H3'/H4'/H5'/H5'' w zakresie 5.0 - 3.5 ppm analiza cząsteczek RNA jest znacznie trudniejsza niż cząsteczek DNA. Dla typowej dla formy A-RNA konformacji C3'-endo, mała wartość stałej sprzężenia pomiędzy protonami H1' a H2' (< 1 Hz) powoduje, że przeniesienie magnetyzacji pomiędzy tymi protonami jest mało efektywne i sygnał korelacyjny H1'-H2' na widmach typu COSY prawie nigdy nie jest obserwowany. Z tej przyczyny dla cząsteczek RNA, w przeciwieństwie do DNA, nie rejestruje się widm TOCSY, które bardzo ułatwiają przypisanie sygnałów rezonansowych jednostki cukrowej w DNA. Z kolei dla reszt pirymidynowych wartość stałej sprzężenia $^3J_{\text{HH}}$ pomiędzy protonami H6-H5 jest duża, rzędu 7.5 Hz, dlatego sygnały te są intensywne, leżą poza stłoczonym regionem widma i są łatwe do zidentyfikowania. Dla badań biomolekuł najczęściej stosuje się zmodyfikowaną sekwencję DQF-COSY (ang. *Double Quantum Filtered Correlation Spectroscopy*), której zaletą jest silna redukcja sygnałów diagonalnych oraz możliwość wyznaczenia stałych sprzężeń $^nJ_{\text{HH}}$. Na takim widmie

można obserwować korelacje nawet między protonami, których przesunięcia chemiczne niewiele się różnią.

Odmianą grupą eksperymentów NMR są techniki oparte na heteronuklearnych sprzężeniach skalarnych. Heteronuklearne widma korelacyjne typu HSQC wykorzystywane są przy identyfikacji sygnałów rezonansowych ^{31}P , ^{13}C , ^{15}N oraz sprzężonych z nimi protonów. W widmach ^1H - ^{13}C HSQC w kierunku ^{13}C (rys. 52) obserwujemy zróżnicowane przesunięcia chemiczne dla każdego typu atomu węgla reszt rybozy (przedział 110 ppm; 60-170 ppm).



Rys. 52. Widma ^1H - ^{13}C HSQC, na których zaznaczono zakresy przesunięć chemicznych dla aromatycznych atomów węgla (A) oraz atomów węgla reszty rybozy (B)

Stosując opisane powyżej techniki możliwe jest zazwyczaj przypisanie większości sygnałów w widmach NMR, co jest pierwszym etapem analizy strukturalnej biomolekuł. Dla wyznaczenia struktury biomolekuł kluczowy jest eksperyment 2D NOESY. Intensywności sygnałów w widmie 2D NOESY, zarejestrowanym z odpowiednio dobranym czasem mieszania, przeliczane są na odległości pomiędzy sprzężonymi dipolowo protonami. Z tych informacji uzyskuje się dane eksperymentalne, które przy użyciu specjalnych programów jak Felix [<http://www.felixnmr.com>] czy Cara [<http://cara.nmr.ch/doku.php>] są zamieniane na odległościowe więzy strukturalne, które są podstawą do obliczania modeli rzeczywistych struktur. Oprócz więzów odległościowych do obliczeń strukturalnych wykorzystuje się także informacje o wartościach kątów torsyjnych wyliczonych na podstawie analizy stałych sprzężeń, głównie $^3J_{\text{HH}}$ oraz $^3J_{\text{PH}}$, uzyskanych odpowiednio z widm 2D COSY oraz ^1H - ^{31}P HSQC. Stosując metody restryktywnej dynamiki molekularnej, uwzględniając więzy eksperymentalne, generowane są struktury, które są zgodne z danymi eksperymentalnymi.

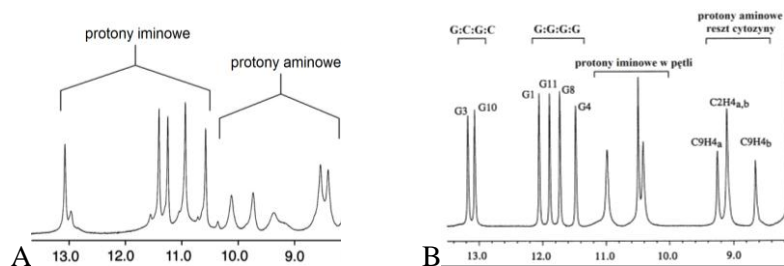
Opisanymi przeze mnie metodami NMR nie można badać bardzo dużych cząsteczek DNA czy RNA (> 10 kD), gdyż wraz ze wzrostem masy kwasów nukleinowych obserwuje się coraz silniejsze nakładanie się sygnałów oraz poszerzenie linii rezonansowych związane ze zjawiskiem relaksacji jądrowej. Badanie większych cząsteczek umożliwia całkowite lub specyficzne znakowanie izotopami ^{13}C , ^{15}N oraz ^2H . Jedną z największych struktur RNA rozwiązanych

metodami spektroskopii NMR to cząsteczka zbudowana z 132 reszt nukleotydowych pochodząca z wirusa MoMuLV (140).

Wymiana chemiczna i przejścia konformacyjne zachodzące wolno w skali czasu NMR wpływają na zmiany otoczenia chemicznego protonów i powodują pojawianie się dodatkowych sygnałów na widmie NMR. Dla powolnych przejść konformacyjnych (0.1 s - 1.0 s) obserwuje się oddzielne zestawy sygnałów, które odpowiadają poszczególnym konformerom. Szybkie zmiany konformacyjne rzędu nanosekund czy pikosekund prowadzą do uśredniania widma i jednego zestawu sygnałów odpowiadającego uśrednionej konformacji.

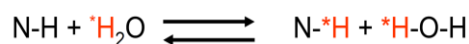
Głównym ograniczeniem badań strukturalnych metodą magnetycznego rezonansu jądrowego jest konieczność otrzymania jednej konformacji w roztworze, co w przypadku kwadrupleksów zdarza się niezwykle rzadko. Aby otrzymać w roztworze jedną dominującą formę, która pozwoliłaby na dalsze badania, najczęściej do badanej sekwencji wprowadza się pojedyncze modyfikowane chemicznie reszty nukleotydowe, dodaje różne sekwencje flankujące, bądź niektóre reszty nukleotydowe zastępuje się innymi. Drugim, oprócz sekwencji, bardzo ważnym czynnikiem wpływającym na ilość form powstających w roztworze są warunki środowiska. Ponieważ powstawanie kwadrupleksów zależy od stężenia RNA/DNA, typu i stężenia kationów, rozpuszczalnika, pH oraz temperatury, duże znaczenie ma również dobór optymalnych warunków analizy tych cząsteczek metodami NMR. Jeśli uda się znaleźć takie warunki, w których cząsteczka tworzy tylko jedną, stabilną strukturę, to dla analizy widm NMR oraz przypisania sygnałów rezonansowych stosuje się zazwyczaj takie same metody, jak dla innych struktur kwasów nukleinowych (roz. VI.3., str. 202). Indywidualne cechy tych widm oraz eksperymenty charakterystyczne dla kwadrupleksów omówię poniżej.

Powstawanie kwadrupleksu najprościej można śledzić rejestrując widmo ^1H NMR i obserwując region, w którym występują sygnały pochodzące od iminowych atomów wodoru. Aby je móc obserwować widmo takie rejestrujemy standardowo w $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (90%:10%) w obniżonej temperaturze, bliskiej 0°C . Sygnały od iminowych atomów wodoru reszt guanozyny, charakterystycznych dla G-tetrady, obserwujemy zazwyczaj w zakresie od 13 do 10 ppm, a aminowych atomów wodoru pomiędzy 10.5 ppm a 8 ppm (rys. 53 A). Sygnały iminowych atomów wodoru w widmach kwadrupleksów mogą pochodzić nie tylko od G-tetrad lecz także od mieszanych G:C:G:C tetrad oraz iminowych atomów wodoru reszt nukleotydowych tworzących pętlę (rys. 53 B). W rejonie 10.5 - 8 ppm obserwujemy zarówno sygnały aminowych atomów wodoru reszt guanozyny zaangażowanych w tworzenie wiązań wodorowych w G-tetradzie (rys. 56 A), jak również od aminowych atomów wodoru reszt cytydyny, które są zaangażowane w wiązanie wodorowe np. w G:C:G:C tetradzie (rys. 53 B).

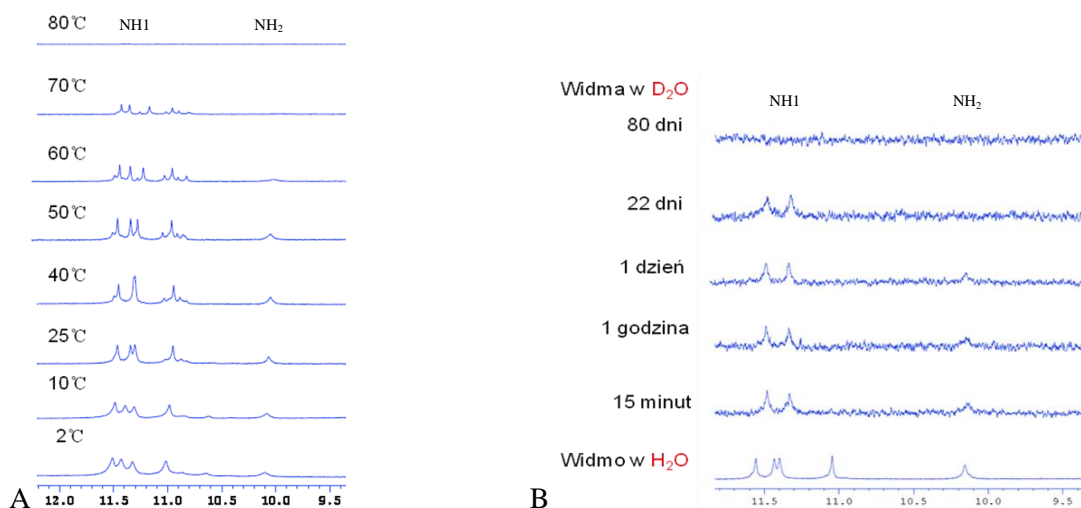


Rys. 53. Fragmenty widm ^1H NMR, na których zaznaczono sygnały iminowych oraz aminowych atomów wodoru występujących w tetradach G:G:G:G oraz G:C:G:C, (141)

Sygnały pochodzące od aminowych atomów wodoru w G-tetradzie często są niewidoczne w widmie ^1H NMR (np. dla terminalnych G-tetrad rys. 53 B) lub mogą być trudne do zaobserwowania, ponieważ są szerokie i łatwo wymieniają się z wodą w temperaturze pokojowej (rys. 56 A). W dupleksach DNA i RNA atomy wodoru typu iminowego i aminowego bardzo łatwo wymieniają się na deuter lub na inny atom wodoru pochodzący od cząsteczki wody. W spektroskopii NMR takie atomy wodoru nazywa się wymienialnymi z wodą.



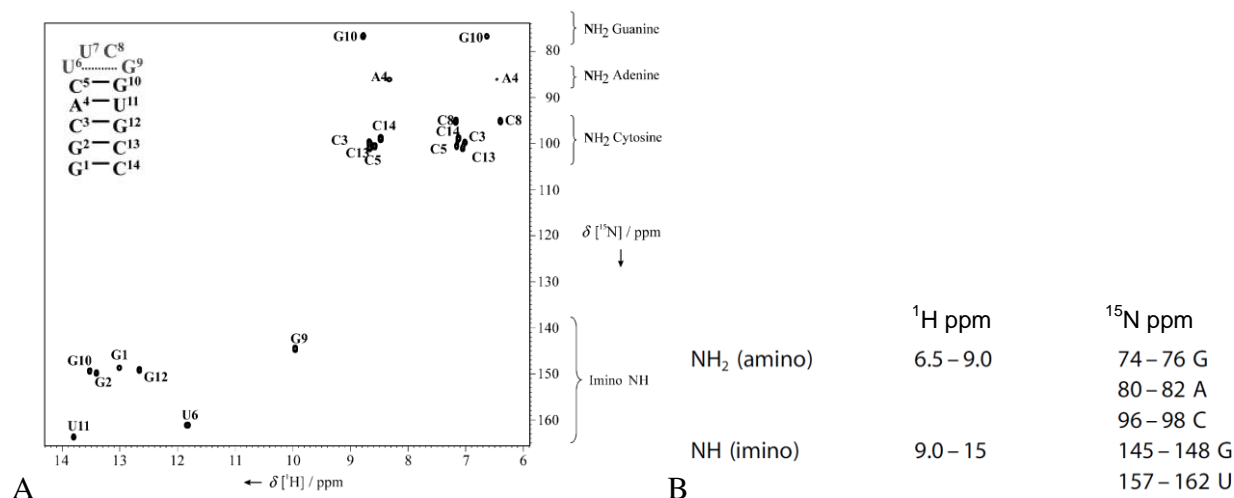
Szybkość takiej wymiany zależy głównie od temperatury, struktury cząsteczki oraz pH roztworu. Dla iminowych atomów wodoru zaangażowanych w tworzenie G-tetrady charakterystyczna jest ich niezwykła trwałość (rys. 54 A). Czasami sygnały protonów iminowych można obserwować nawet w temperaturze $\sim 90^\circ\text{C}$. Z tego względu iminowe atomy wodoru w G-tetradach także bardzo wolno wymieniają się na deuter nawet w temperaturze pokojowej. Czas takiej wymiany wynosi od 1 godziny do kilku tygodni lub miesięcy (rys. 54 B).



Rys. 54. Trwałość sygnałów iminowych w zależności od temperatury (A). Zależność szybkości wymiany atomów wodoru NH1 na deuter od czasu (B) [AGGAGGA, 50 mM KCl, 10 mM fosforan potasu, 0.1 mM EDTA].

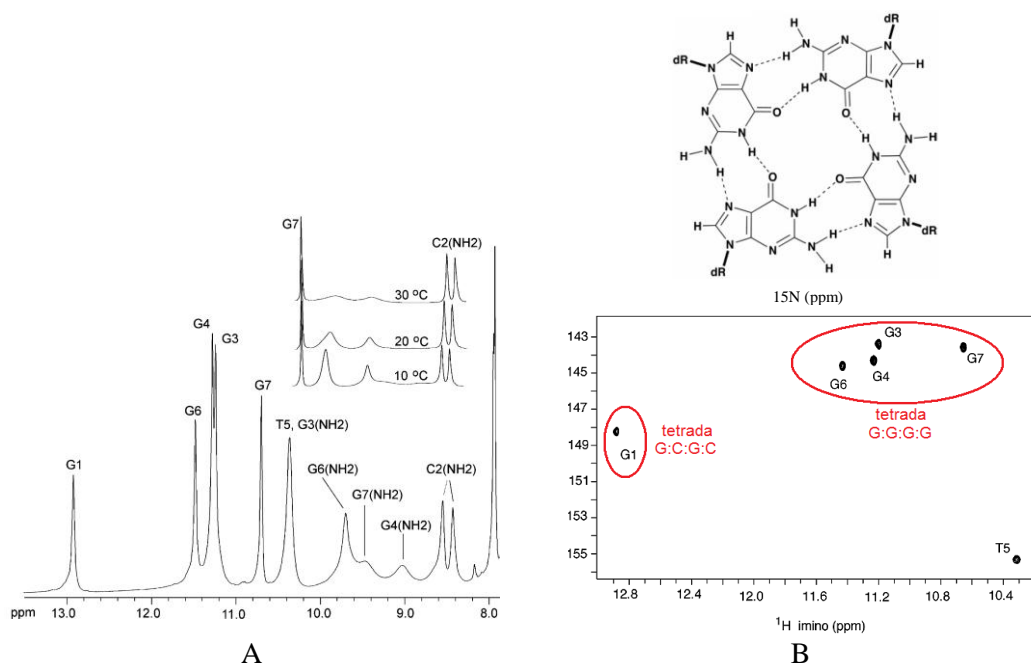
W widmach ^1H NMR sygnały pochodzące od wymienialnych z wodą atomów wodoru trudno jednoznacznie przypisać. Rozróżnienie pomiędzy sygnałami protonów iminowych pochodzących od G-tetrad a mieszanych G:C:G:C tetrad oraz sygnałów protonów iminowych od aminowych (które mogą występować w tym samym zakresie przy ok. 10 ppm) jest możliwe dzięki

dużej różnicy przesunięć chemicznych atomów azotu ^{15}N związanych z tymi atomami wodoru. Charakterystyczne wartości przesunięcia chemicznego $\delta(^{15}\text{N})$ dla atomów azotu w poszczególnych resztach nukleotydowych przedstawiłam na rys. 55.



Rys. 55. Fragment widma ^1H - ^{15}N HSQC, na którym zaznaczono sygnały protonów iminowych oraz aminowych pochodzących od różnych reszt nukleotydowych (A), zakresy przesunięć chemicznych protonów aminowych i iminowych oraz odpowiadających im atomów azotu (B) (142)

Przesunięcie chemiczne atomu azotu N1 guanozyny dla pary zasad Watsona-Cricka G:C oraz w tetradzie G:C:G:C wynosi średnio 149 ppm, natomiast dla pary zasad G:G lub G-tetrady wynosi ok. 144 ppm (rys. 56 B).



Rys. 56. Widma ^1H NMR - zaznaczono sygnały iminowych oraz aminowych atomów wodoru (A) oraz ^1H - ^{15}N HSQC (B) dla kwadrupleksu zbudowanego z tetrad G:C:G:C oraz G:G:G:G [PDB ID: 1NYD](143)

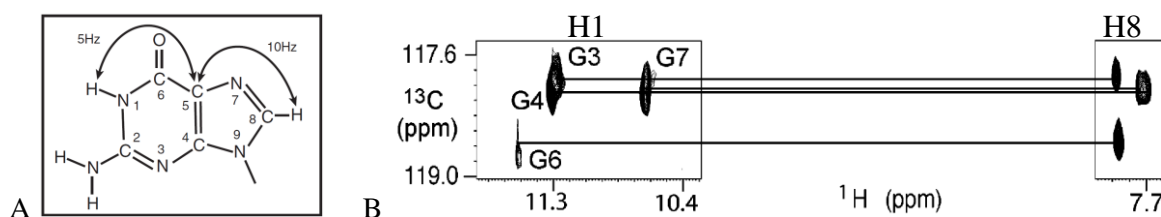
Taka różnica przesunięć chemicznych jest wystarczająca dla różniczenia par zasad G:C od G:G oraz tetrad G:C:G:C od G:G:G:G. W ten sam sposób można odróżnić sygnał iminowego atomu

wodoru od aminowego, ponieważ przesunięcia chemiczne atomów N1 oraz N2 reszt guanozyny bardzo się różnią (tab. 9). Atom azotu grupy aminowej reszty guanozyny, który występuje w charakterystycznym zakresie przy ok. 75 ppm, można także odróżnić na podobnej zasadzie, od atomu azotu reszty cytydyny, którego sygnał obserwujemy przy ok. 97 ppm (tab. 9), jednak, ze względu na silne zazwyczaj poszerzenie sygnałów grup aminowych, korelacje te są zazwyczaj trudne do zaobserwowania.

Tabela. 9. Przesunięcia chemiczne $\delta(^1H)$ oraz $\delta(^{15}N)$ grup aminowych oraz iminowych w parach G:C,G:G oraz tetradach

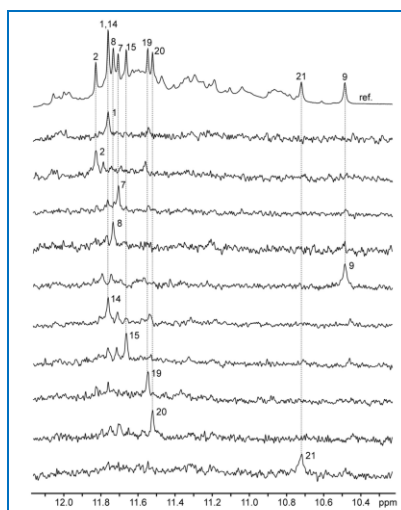
para/tetrada	atomy	$\delta ^1H$ ppm	$\delta ^{15}N$ ppm
para G:C ,	G - protony iminowe - związane wodorowo	13.5-12	N1 149-146
G:C:G:C	C - protony aminowe - związane wodorowo	9-8	N4 98-96
	C - protony aminowe - niezwiązane wodorowo	7-6.5	N4 98-96
para G:G ,	G - protony iminowe	15-9	N1 144-146
G:G:G:G	G - protony aminowe	9-6.5	N2 74-76

W cząsteczkach kwadrupleksów o naturalnej zawartości izotopów niezwykle trudno jest przypisać sygnały NH1 do danej reszty guanozyny, a jest to kluczowe dla poprawnego ustalenia struktury. W tym celu często wykorzystuje się widma typu 1H - ^{13}C HMBC, w których obserwuje się korelacje 1H - ^{13}C poprzez sprzężenia skalarne dalekiego zasięgu, najczęściej 2-3 wiązania chemiczne. Ponieważ zarówno atom wodoru H8 jak i NH1 znajdują się w odległości 3 wiązań chemicznych od atomu węgla C5, zaobserwowanie sygnałów korelacyjnych H8-C5 i NH1-C5 pozwala jednoznacznie przypisać sygnał atomu NH1 do danej reszty guanozyny (rys. 57 A-B). Jednak jest to eksperyment niezwykle mało czuły z uwagi na niewielkie wartości sprzężeń skalarnych $^3J_{NH1-C5}$ i $^3J_{H8-C5}$ (rys. 57 A) oraz niską $\sim 1.1\%$ zawartość naturalną izotopu ^{13}C . Warunkiem koniecznym, aby takie korelacje można było zaobserwować jest to, aby sygnały pochodzące od protonów GNH1 i GH8 były wąskie i intensywne, a stężenie próbki odpowiednio duże (> 3 mM). Nawet dla dużych stężeń i wąskich linii rezonansowych wykonanie takich widm wymaga na ogół kilku dni, zawsze powyżej 50 godzin. Czas ten może być krótszy, jeśli spektrometr NMR jest wyposażony w głowicę kriogeniczną, dzięki której uzyskuje się kilkukrotną poprawę stosunku sygnału do szumu w porównaniu z głowicą pracującą w temperaturze pokojowej.



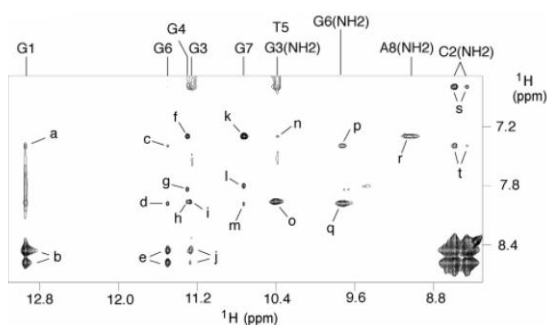
Rys. 57. Sprzężenia dalekiego zasięgu $^3J_{^1H,^{13}C}$ wykorzystywane w celu powiązania ze sobą atomów wodoru NH1 i H8 w jednostce guanozyny (A). Przykładowe widmo 1H - ^{13}C HMBC cząsteczki d(GCGGTGGAT) (143)

Sygnaly pochodzące od iminowych atomów wodoru można także przypisać stosując reszty guanozyny znakowane izotopem ^{15}N (59). Podczas syntezy chemicznej każda guanozyna jest kolejno zastępowana w kilku procentach (2-10%) resztą znakowaną ^{15}N . Następnie rejestruje się widmo ^1H NMR filtrowane w taki sposób aby obserwować jedynie te sygnały, które pochodzą od iminowych atomów wodoru związanych z atomem azotu ^{15}N (rys. 58). Sygnaly pochodzące od atomów wodoru połączonych z atomem ^{14}N są niewidoczne na widmie. Metoda ta nie może być rutynowo stosowana dla cząsteczek RNA, ponieważ brak jest dostępnych handlowo znakowanych ^{15}N amidofosforynów RNA.



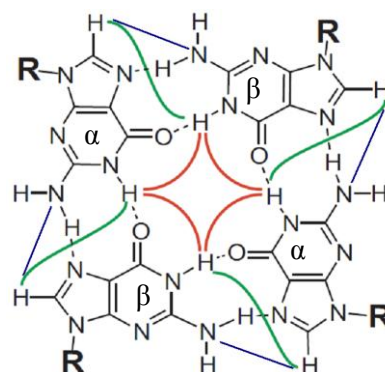
Rys. 58. Przypisanie sygnałów protonów iminowych dla cząsteczki DNA $(\text{GGGTTA})_3\text{GGGT}$ z wykorzystaniem ^{15}N -filtrowanych widm ^1H NMR (59).

W widmach 2D NOESY o utworzeniu G-tetrady świadczy pojawienie się trzech charakterystycznych typów sygnałów (rys. 59 A, B). Są to przede wszystkim sygnały korelacyjne pomiędzy protonem iminowym reszty guanozyny a protonem aromatycznym H8 przyległej reszty (np. d, g; G α NH1-G β H8, rys. 59 B - kolor zielony) oraz niekiedy pomiędzy protonem aminowym reszty guanozyny a protonem aromatycznym H8 przyległej reszty guanozyny (np. o, G β NH $_2$ -G α H8, rys. 59 B - kolor granatowy).

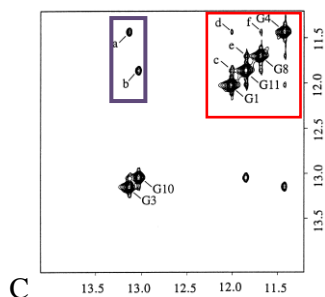


d - G6:NH1-G3:H8
g - G4:NH1-G7:H8
o - G3:NH2-G6:H8

A



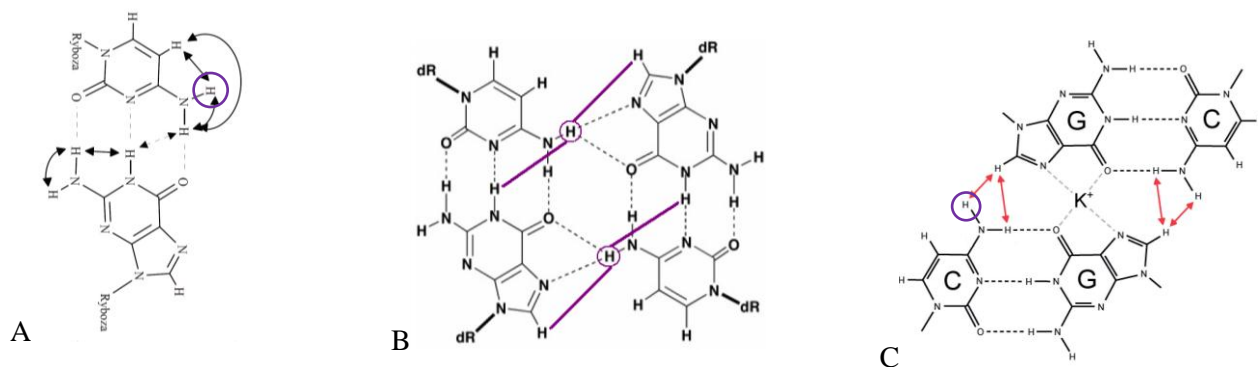
B



Rys. 59. Fragment widma 2D NOESY, na którym widoczne są sygnały korelacyjne z udziałem protonów iminowych i aminowych. (A), (C) Zaznaczono charakterystyczne atomy wodoru w G-tetradzie dla których obserwuje się sygnały korelacyjne: (Ga NH1-Gβ H8) – kolor zielony, (Gβ NH₂-Ga H8) – kolor niebieski, (Ga NH1-Gβ NH1) – kolor czerwony (B) (141;143)

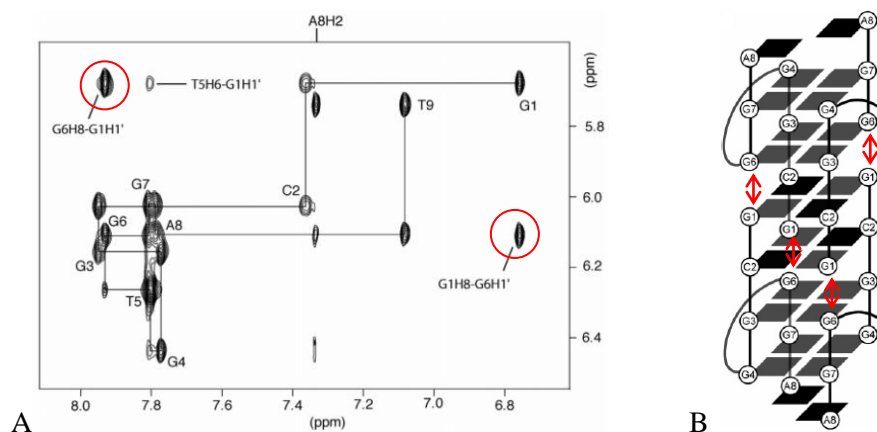
Trzeci typ unikalnych dla G-tetrad sygnałów to sygnały korelacyjne pomiędzy protonami iminowymi wewnątrz tetrady, które najczęściej są małej intensywności (c-f, rys. 59 C), lub nieco intensywniejsze sygnały pomiędzy sąsiednimi warstwami tetrad (a-b, rys. 59 C).

O obecności w strukturze kwadrupleksu nietypowych tetrad wnioskować można na podstawie analizy pojawiających się w widmach 2D NOESY dodatkowych sygnałów korelacyjnych z udziałem wymieniających z wodą atomów wodoru. Na przykład na rysunku 60 B, C zaznaczono atomy wodoru, pomiędzy którymi obserwuje się kluczowe dla potwierdzenia obecności mieszanych G:C:G:C tetrad sygnały korelacyjne. Najważniejszą rolę w identyfikacji takiej tetrady pełnią nietypowe kontakty NOE pomiędzy atomem wodoru grupy aminowej reszty cytydyny (zaznaczony kółkiem), który w kanonicznej formie dupletu nie jest zaangażowany w tworzenie wiązania (rys. 60 A) i atomem wodoru H8 guanozyny z przyległej pary zasad Watsona-Cricka współtworzącej tetradę.



Rys. 60. Na rysunku zaznaczono sygnały korelacyjne obserwowane w widmach 2D NOESY dla pary zasad G:C (A), mieszanej tetrady G:C:G:C (B), przesuniętej mieszanej tetrady G:C:G:C (C); kółkiem zaznaczono aminowy atom wodoru, który nie jest zaangażowany w tworzenie pary G:C, (102;141)

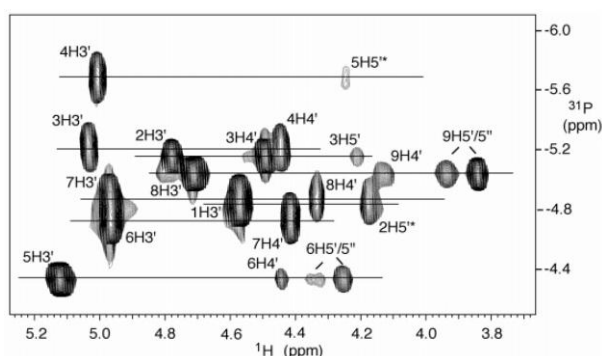
Różnorodność topologii kwadrupleksów sprawia, iż w widmie NOESY często obserwuje się również inne nietypowe sygnały korelacyjne. Wynikają one z unikalnej aranżacji nici w kwadrupleksach. Na przykład dla cząsteczki o sekwencji G₁C₂G₃G₄T₅G₆G₇A₈T₉ pomiędzy oddalonymi od siebie sekwencyjnie resztami G1 i G6 obserwowany jest sygnał korelacyjny, ponieważ atomy wodoru pochodzące od tych reszt są w bliskiej odległości w przestrzeni (rys. 61).



Rys. 61. Fragment widma 2D NOESY, na którym zaznaczone są nietypowe dla kwadrupleksów sygnały (A). Cząsteczka kwadrupleksu, dla której wykonano widmo 2D NOESY (B) (143).

W zależności od topologii kwadrupleksu oraz typu pętli, charakterystyczna dla helikalnych struktur kwasów nukleinowych ścieżka NOE może być czasami przerwana, szczególnie w obrębie reszt stanowiących pętle lub jeśli w strukturze występują guanozyny w konformacji *syn*.

Widma ^1H - ^{31}P HSQC dostarczają cennych informacji o konformacji szkieletu fosfodiesterowego. W typowej dla kwadrupleksów DNA konformacji C2'-*endo* wartości kątów α i ζ oscylują wokół wartości 290° (*gauche*⁻), a rozpiętość przesunięć chemicznych atomu fosforu ^{31}P wynosi ok. 1 ppm, od -3.7 do -4.8 ppm w stosunku do sygnału wzorca, trimetylofosforanu.



Rys. 62. Widmo korelacyjne ^1H - ^{31}P HSQC zarejestrowane dla kwadrupleksu (143)

Pojawienie się sygnału ^{31}P poza tym zakresem świadczy zazwyczaj o zaburzeniu regularnej helisy. W widmie typu HSQC możliwa jest obserwacja połączeń $\text{H}3'_{(n-1)}\text{-P}_{(n)}\text{-H}4'/\text{H}5'/\text{H}5''_{(n)}$. Sygnały korelacyjne $\text{H}3'_{(n-1)}\text{-P}_{(n)}$ wykorzystuje się przede wszystkim w celu identyfikacji przesunięć chemicznych protonów $\text{H}3'$. W zależności od wartości stałej sprzężenia $^3J_{\text{H}3'\text{P}}$, kąt ϵ może przyjmować konformację *gauche*⁻ lub *trans* (> 5 Hz), jak także *gauche*⁺ (> 15 Hz) (6). Zdolność do detekcji sygnału korelacyjnego $\text{P}_{(n)}\text{-H}4'$ powiązana jest z wartością stałej sprzężenia $^4J_{\text{H}4'\text{P}}$, która musi być większa niż 5 Hz. Obecność takiego sygnału w widmie świadczy o konformacji *gauche*⁺ i odpowiada kątowi $\gamma \sim 60^\circ$. Dla charakterystycznej dla kąta β wartości 180° stałe sprzężenia $^3J_{\text{H}5'/5''\text{P}}$ są mniejsze niż 5 Hz i w takim przypadku nie obserwuje się sygnałów korelacyjnych $\text{P}_{(n)}\text{-H}5'/\text{H}5''_{(n)}$.

Kolejny z aspektów struktury kwadrupleksów, mianowicie stan równowagi konformacyjnej *syn/anti* można między innymi określić na podstawie analizy:

- wielkości efektu NOE pomiędzy atomami wodoru H8/H6-H1' oraz H8/H6-H2'/H3'/H4'

Odległość pomiędzy atomami wodoru H8/H6 a H1' zależy tylko od wartości kąta χ . Dla konformacji *syn* odległość ta wynosi ok. 2.5 Å i obserwuje się wówczas charakterystyczny, bardzo silny sygnał korelacyjny między atomami H6/H8 a H1', natomiast dla konformacji *anti* odległość pomiędzy tymi protonami jest większa i wynosi ~ 4 Å, a efekt Overhausera jest niewielki. Odległość atomów wodoru H8/H6 od H2'/H3'/H4' zależy dodatkowo od konformacji reszty cukrowej i również może być wykorzystywana do rozróżnienia konformacji *syn* od *anti*.

- przesunięć chemicznych sygnałów ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P (144;145)

Przesunięcia chemiczne reszt rybozy odbiegające od standardowych wartości mogą świadczyć o powstaniu nietypowej struktury. Dla rzadko występującej w RNA konformacji *syn*, charakterystyczne jest silne przesunięcie sygnałów H1' w kierunku większych wartości ppm oraz jednoczesne przesunięcie sygnałów H3' w odwrotnym kierunku. Dla reszty guanozyny w konformacji *syn* sygnały pochodzące od atomów węgla C8 oraz C1' są przesunięte w kierunku niższego pola o ok. 4 ppm w stosunku do sygnałów pochodzących od reszt w konformacji *anti*. Podobną zależność przesunięć chemicznych od wartości kąta χ w resztach guanozyny obserwuje się dla atomów azotu N1. Dla konformacji *syn* są one także przesunięte o ok. 3 ppm w kierunku większych wartości ppm. Przesunięcie chemiczne atomu fosforu ^{31}P pomiędzy resztami $G_n-G_{n+1}(\textit{syn})$ jest także charakterystyczne dla konformacji *G(syn)* i podobnie jak dla innych jąder obserwowany jest efekt paramagnetyczny.

Pomiary współczynnika dyfuzji translacyjnej

Eksperymenty NMR oparte o pomiar współczynnika dyfuzji translacyjnej np. DOSY (ang. *Diffusion Ordered Spectroscopy*) znajdują w ostatnich latach coraz szersze zastosowanie do identyfikacji obecnych w roztworze cząsteczek o różnej masie cząsteczkowej. Wartość współczynnika dyfuzji translacyjnej zależy od takich parametrów jak wielkość i kształt cząsteczki, temperatura oraz lepkość roztworu. Najogólniej, znając wartości współczynników dyfuzji cząsteczek referencyjnych o znanej strukturze możliwe jest ustalenie masy nieznannej cząsteczki. Eksperymenty tego typu mogą być stosowane na przykład do rozróżnienia pomiędzy strukturą spinki i dupleksu dla sekwencji kwasów nukleinowych wykazujących tendencje do przyjmowania różnych form w zależności od warunków roztworu. Metodę tę stosuje się coraz częściej również do badania kwadrupleksów (146). Porównując wartość współczynnika dyfuzji z krzywą wzorcową można w niektórych przypadkach wyznaczyć stechiometrię kwadrupleksu (147). Z punktu widzenia badań strukturalnych opartych na metodach biomolekularnej spektroskopii NMR technika ta ma tę

zaletę, że pomiary współczynnika dyfuzji wykonuje się dla tej samej próbki, dla której rejestruje się pozostałe widma NMR. Metoda ta nie nadaje się jednak do badania układów równowagowych np. dupleks-kwadrupleks. Jak dotychczas nie opracowano metod, które pozwoliłyby na uwzględnienie obecności szybkiej wymiany konformacyjnej.

II.3.2. Krystalografia

Dzięki metodzie rentgenografii strukturalnej poznano do tej pory najwięcej struktur kwadrupleksów z rozdzielczością atomową. Otrzymanie kryształu odpowiedniego do dalszej analizy jest nadal etapem, który ogranicza i spowalnia wszystkie projekty strukturalne. Często, aby zwiększyć wydajność krystalizacji wprowadza się do sekwencji modyfikowane reszty. Należy pamiętać, iż struktury otrzymane w wymuszonych warunkach krystalizacji mogą być odmienne od tych otrzymanych w roztworze. Szczegółowe informacje użyteczne w badaniach kwadrupleksów tą metodą można znaleźć w pracy (148).

II.3.3. Dynamika molekularna

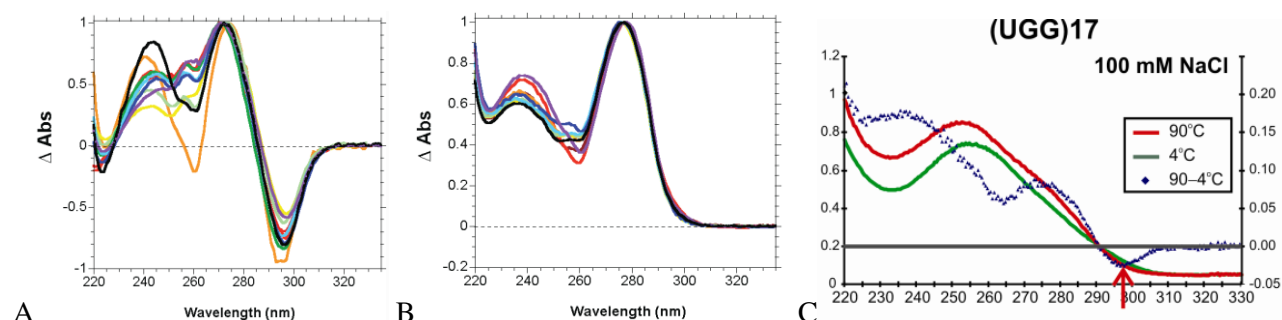
Dynamika molekularna znajduje coraz częściej zastosowanie w biochemii jako narzędzie do poznawania struktury i oddziaływań w kwasach nukleinowych, białkach i innych biomolekułach. Symulacja komputerowa uwzględnia liczne oddziaływania w celu uzyskania informacji o właściwościach cząsteczek. Przy pomocy tej metody można obserwować np. jak w czasie zwija się łańcuch DNA/RNA do formy kwadrupleksu. Inne procesy dynamiczne, które możemy badać to ruch cząsteczek wody, jonów czy obserwacja zmiany konformacji w wyniku przyłączenia ligandów (149). Główne ograniczenia tej metody to problemy związane z niedoskonałością semiempirycznych parametrów opisujących pola siłowe oraz konieczność korzystania z komputerów o olbrzymiej mocy obliczeniowej.

II.3.4. Metody spektroskopii UV i CD w analizie strukturalnej kwadrupleksów

Spektroskopia UV jest jedną z prostszych metod, które mogą być użyte do wstępnej analizy kwadrupleksów. Charakterystyczne właściwości spektralne w widmach absorpcyjnych wynikają z obecności co najmniej dwóch sąsiadujących ze sobą G-tetrad w cząsteczkach kwadrupleksów. Typowe kwadrupleksy absorbują specyficznie przy długości fali 295 nm, a charakterystyczny wygląd tych widm został wyznaczony eksperymentalnie dla znanych struktur kwadrupleksów (150). Widma te nie określają jednak jednoznacznie topologii kwadrupleksów. Za pomocą tych technik nie można również stwierdzić czy dana cząsteczka tworzy pojedynczą konformację, gdyż ostateczny wygląd widma może wynikać z absorpcji światła przez poszczególne konformery obecne w roztworze. Pomimo tych ograniczeń, za pomocą widm UV, w dużej mierze można ograniczyć zakres możliwych konformacji przyjmowanych przez cząsteczki kwadrupleksów.

Widma różnicowe

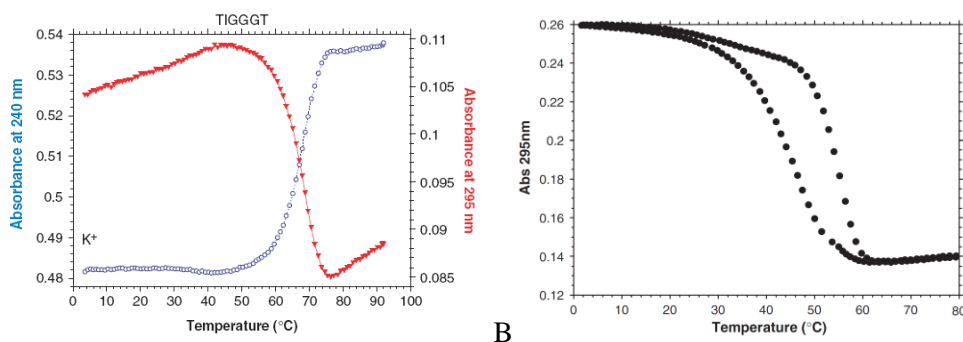
Widma różnicowe TDS (ang. *Thermal Difference Spectra*) otrzymuje się poprzez rejestrację widm UV w fali ciągłej w dwóch różnych temperaturach: poniżej oraz powyżej ich temperatury topnienia, w zakresie ~ 220-350 nm. Widmo, które otrzymuje się w wyniku ich odjęcia nosi nazwę absorpcyjnego widma różnicowego. Dotychczas na podstawie analizy ponad 900 widm TDS wykonanych dla około 200 różnych sekwencji znane są profile krzywych TDS dla różnych struktur kwasów nukleinowych, w tym kwadrupleksów DNA (151;152). Dla kwadrupleksów, podobnie jak dla dupleksów bogatych w pary G:C, charakterystyczne są dwa dodatnie pasma przy ok. 240 nm oraz 270 nm, natomiast tym, co odróżnia widma TDS dupleksów od kwadrupleksów jest pojawienie się ujemnego pasma przy ok. 295 nm (rys. 63). Niestety, do tej pory nie ma żadnych danych dotyczących struktur antyrównoległych kwadrupleksów RNA, nieznany jest również kształt ich widm TDS.



Rys. 63. Widmo różnicowe dla cząsteczki kwadrupleksu DNA (A), dupleksu DNA bogatego w pary zasad G:C (B) kwadrupleksu RNA - kolor granatowy (C) (151;152)

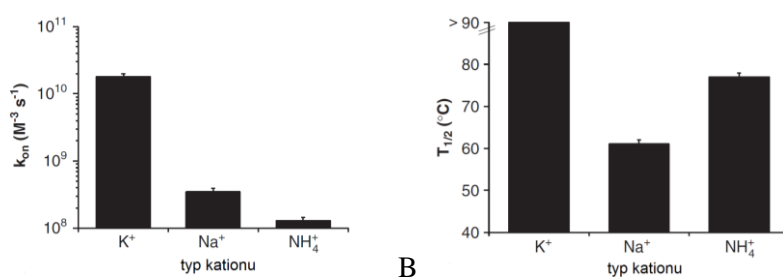
Krzywe topnienia

Kolejną z metod analizy kwadrupleksów opiera się na badaniu ich trwałości. Temperaturę topnienia takich cząsteczek wyznacza się na podstawie analizy wykresu krzywej topnienia, która przedstawia zależność absorpcji od temperatury. Dla dupleksów temperatura topnienia jest mierzona przy 240 lub 260 nm i w przypadku osiągnięcia stanu zdenaturowanego absorpcja wzrasta o ok. 25%. Jednak przy tej długości fali kwadrupleksy w niewielkim stopniu zmieniają wartość absorbancji i dlatego, aby uzyskać większą zmianę absorpcji, pomiar ten jest wykonywany przy długości fali 295 nm. Krzywa topnienia dla kwadrupleksów przy długości fali 295 nm jest odwrócona w stosunku do krzywej topnienia dla dupleksów, rejestrowanej przy 260 nm (rys. 64 A) (153). Charakterystyczny dla G-tetrad spadek absorpcji przy 295 nm wraz ze wzrostem temperatury spowodowany jest zanikiem G-tetrad (153).



Rys. 64. Charakterystyczne dla kwadrupleksu krzywe topnienia przy długości fali 240 nm oraz 295 nm (A), zjawisko histerezy, różny profil zależności absorpcji od temperatury w przypadku ogrzewania próbki i chłodzenia [$G_4T_4G_4$, 0.1 M Na^+ , gradient temperatury 0.2°C] (B) (39;154)

Przy pomocy analizy krzywych topnienia można wyznaczyć takie parametry termodynamiczne, jak: energia swobodna, entalpia, entropia oraz kinetyczne, jak stała szybkości asocjacji i dysocjacji (155). Wzrost temperatury, czy stężenia jednowartościowych kationów mają większy wpływ na stałą asocjacji niż dysocjacji. Dla kwadrupleksów stałe szybkości asocjacji i dysocjacji mogą być wyznaczone na podstawie analizy nierównowagowych profili topnienia (rys. 64 B). Istotą zjawiska histerezy jest różnica między przebiegiem krzywej ogrzewania i chłodzenia. Dokładna analiza tych krzywych wymaga znaczącej różnicy w ich przebiegach, która może być powiększona przez zastosowanie szybszego gradientu temperatury lub niższego stężenia badanych cząsteczek. Na ogół, w obecności kationów K^+ , szybkość asocjacji jest ok. 20-50 razy większa w porównaniu do sytuacji, kiedy w roztworze znajdują się kationy Na^+ . Pomimo, iż kwadrupleksy bardzo wolno powstają w obecności kationów NH_4^+ , to często są trwalsze w tych warunkach niż w obecności kationów Na^+ (rys. 65).



Rys. 65. Zależność wartości stałej asocjacji (A) oraz temperatury topnienia (B) od typu jonów; [TG_4T , 0.11 M, Na^+ , K^+ i NH_4^+](154)

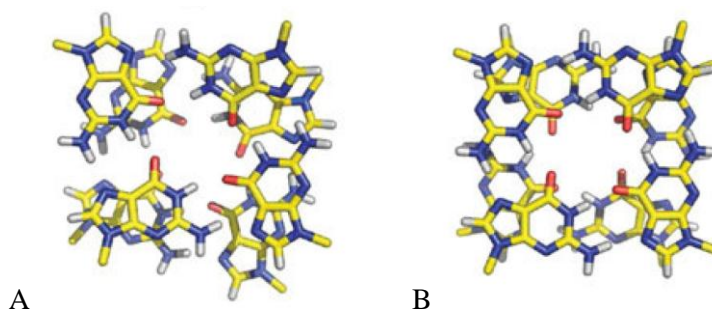
Kwadrupleksy są zazwyczaj stabilne w warunkach fizjologicznych, a niektóre z nich mają tak wysoką temperaturę topnienia ($> 90^\circ C$), że nie może ona zostać wyznaczona. Tak trwałe kwadrupleksy obserwuje się zazwyczaj w obecności kationów potasu (rys. 65 B).

Analiza krzywych topnienia kwadrupleksów jest trudna do interpretacji, gdyż najczęściej topnienie kwadrupleksu przebiega poprzez stan pośredni. Założenie procesu dwustanowego musi być więc poparte odpowiednim testem. Analizując krzywe topnienia kwadrupleksów należy również mieć na uwadze fakt, iż często trudno jest ustalić poprawnie linię podstawową. Zazwyczaj jest ona

nachylona pod pewnym kątem, co może wynikać z obecności dodatkowych procesów poprzedzających właściwe topnienie kwadrupleksu (156).

Dichroizm kołowy

Zjawisko dichroizmu kołowego (CD, ang. *circular dichroism*) polega na różnej absorpcji światła spolaryzowanego kołowo prawoskrętnie i lewoskrętnie przez cząsteczki optycznie czynne. Rejestrując widmo dichroizmu kołowego mierzymy różnicę w absorpcji światła spolaryzowanego w zależności od długości fali. Dla cząsteczek kwasów nukleinowych jest to zwykle przedział 220-300 nm. Kwasy nukleinowe ze względu na strukturę helikalną i określoną skręcalność bardzo dobrze nadają się do badań metodą CD. Charakterystyczne dla kwadrupleksów pasma w widmie CD są raczej związane z oddziaływaniem warstwowym pomiędzy sąsiadującymi G-tetradami niż bezpośrednio z orientacją nici. Różnice w absorpcji przy poszczególnych długościach fali wynikają z różnej kierunkowości wiązań wodorowych w obrębie G-tetrazy [rozdział II.2.1.] dla poszczególnych konformacji (rys. 66).



Rys. 66. Rzut z góry na dwie sąsiadujące G-tetrazy o takiej samej kierunkowości wiązań wodorowych (A), o przeciwnej kierunkowości wiązań wodorowych (B)

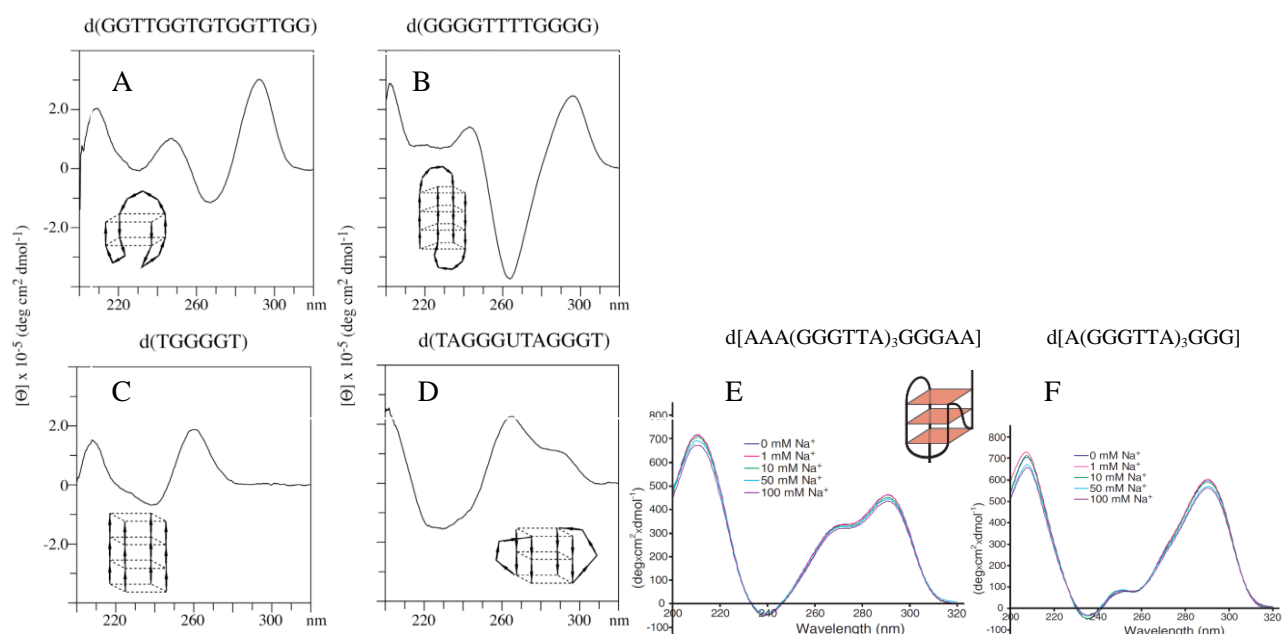
Nie ma jednak prostej zależności pomiędzy topologią kwadrupleksu i wyglądem widma CD (157). Chociaż widma CD dupleksów można już przewidzieć teoretycznie z dużą dokładnością, obliczenia prowadzone dla różnych form kwadrupleksów nie dają jednoznacznych wyników. Pomimo tych zastrzeżeń widma dichroizmu kołowego wykorzystuje się powszechnie do rozróżnienia kwadrupleksu równoległego od antyrównoległego oraz hybrydowego. W tabeli 10 zebrane są pasma charakterystyczne dla poszczególnych form kwadrupleksów.

Tab. 10. Zestawienie typowych pasm obserwowanych w widmach CD dla różnych typów kwadrupleksów DNA

typ kwadrupleksu	pasmo ujemne	pasmo dodatnie
równoległy dwu- i czteroniciowy	240 nm	264 nm
równoległy jednoniciowy	240 nm	264 nm, 290 nm
antyrównoległy jednoniciowy	265 nm	295 nm
hybrydowy jednoniciowy	235 nm	255 nm, 270 nm, 290 nm

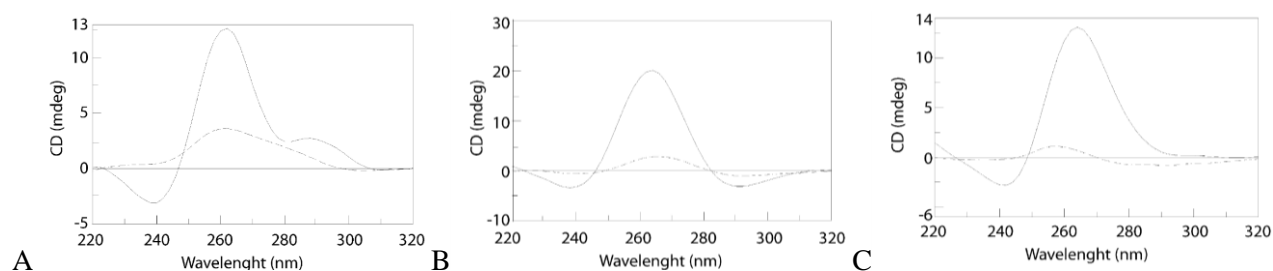
W widmach czteroniciowych, równoległych kwadrupleksów obserwuje się maksimum absorpcji przy 264 nm oraz minimum przy 240 nm. W przypadku jednoniciowego, równoległego

kwadrupleksu pojawia się dodatkowo pasmo przy ok. 290 nm (158). Dla antyrównoległego jednoniciowego kwadrupleksu w widmach CD występuje maksimum absorpcji przy 295 nm oraz minimum przy 265 nm. Widmo kwadrupleksu o topologii typu hybrydowego charakteryzuje się pasmem ujemnym przy 235 nm oraz pasmami dodatnimi przy 255 nm, 270 nm i 290 nm (101;159). Przykłady widm CD dla poszczególnych topologii wraz z modelem struktury kwadrupleksu DNA pokazano na rys. 67.



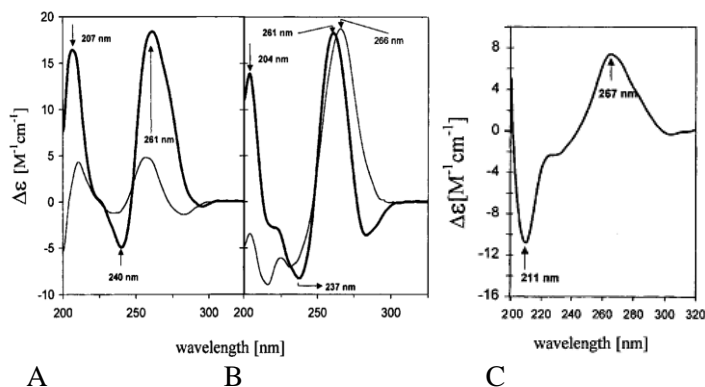
Rys. 67. Przykładowe widma CD kwadrupleksu DNA antyrównoległego (A-B), równoległego (C-D), typu hybrydowego (E-F) (101;158;159)

Ponieważ dotychczas nie jest znana żadna struktura antyrównoległego kwadrupleksu RNA, nie wiadomo więc czy charakterystyczne dla antyrównoległych kwadrupleksów DNA pasmo przy 295 nm jest właściwe dla obu typów cząsteczek, RNA i DNA. Nie jest znane również żadne widmo kwadrupleksu RNA z pojedynczą G-tetradą. Równoległe kwadrupleksy RNA w widmach CD posiadają maksimum absorpcji przy 264 nm oraz minimum przy 240 nm (160). Widma CD równoległych kwadrupleksów DNA, RNA oraz LNA są bardzo do siebie podobne (rys. 68) (19).



Rys. 68. Porównanie widm CD dla równoległych kwadrupleksów, o analogicznych sekwencjach zasad: LNA – (TGGGT)₄ (A), RNA – (UGGGU)₄ (B), DNA – (TGGGT)₄ (C) (19)

Widmo CD równoległego kwadrupleksu jest bardzo podobne do widma dupleksu B-DNA i A-RNA (rys. 69) (161). Ta cecha widm CD sprawia, iż trudno rozróżnić struktury równoległego kwadrupleksu od dupleksów B-DNA i A-RNA, jak także np. śledzić przejście dupleksu do równoległego kwadrupleksu np. wraz ze zmieniającymi się warunkami środowiska.



Rys. 69. Widma CD równoległego kwadrupleksu DNA o sekwencji d(GGGG), gruba linia odpowiada formie natywnej, cienka linia formie denaturowanej (A), dupleksu DNA o sekwencji d(C4G4), gruba linia odpowiada dupleksowi w formie B (0.1 M KCl, 10 mM fosforan potasu), cienka A-formie dupleksu (80% etanol, 0.2 mM fosforan sodu) (B) oraz dupleksu RNA, (80% etanol) (C) (161)

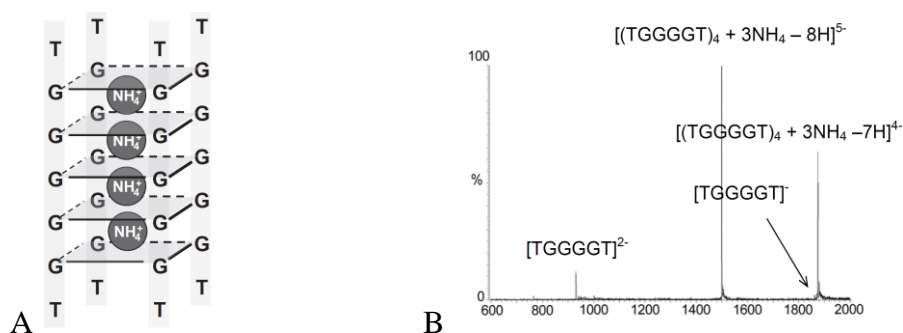
W widmach CD nie tylko położenie pasm, ale także ich intensywność jest bardzo czuła na zmiany konformacyjne. Analiza widm CD jest metodą szybką i stosunkowo prostą. Dlatego jest doskonałym narzędziem do monitorowania zmian konformacyjnych wywołanych zmiennymi środowiska np. obecnością liganda (162), czy rodzajem kationów (158). W podobny sposób można monitorować wpływ sekwencji oraz modyfikacji chemicznej na preferowaną konformację w roztworze. Wykonując widma CD w zależności od temperatury można także obserwować trwałość kwadrupleksów oraz badać kinetykę ich powstawania.

Podsumowując opisane powyżej metody można uznać, że widma TDS wraz z widmami CD, jak także analiza wykresu krzywej topnienia stanowią doskonałe narzędzia dla wstępnego potwierdzenia tworzenia się struktury kwadrupleksu.

II.3.5. Spektrometria mas

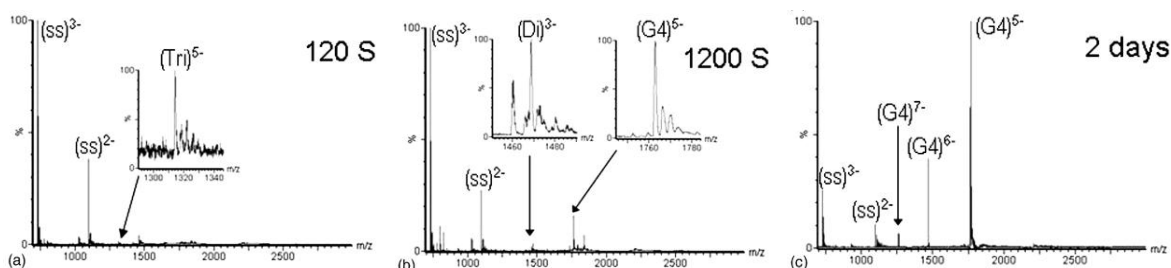
Spektrometria mas jest coraz częściej wykorzystywana w badaniach kwadrupleksów, ponieważ przy jej pomocy można jednoznacznie potwierdzić powstawanie kwadrupleksu, wyznaczyć jego cząsteczkowość oraz badać mechanizm jego powstawania (163;164). Jedną z łagodnych metod jonizacji, stosowanych w spektrometrii mas, jest elektrorozpylanie (ESI-MS, ang. *electrospray mass spectrometry*). Metoda ta zazwyczaj nie powoduje fragmentacji badanych cząsteczek oraz jest bardzo często stosowana w badaniach biopolimerów, takich jak białka czy oligonukleotydy. Jedną z największych zalet tej metody jest możliwość detekcji niekowalencyjnych kompleksów w roztworze. Nie jest to jeszcze jednak metoda standardowa i wymaga odpowiedniej

kalibracji aparatu i doświadczonego operatora. Próbkę DNA lub RNA bada się najczęściej w 150 mM roztworze octanu amonowego o pH=7, dlatego też często obserwuje się addukty kwasów nukleinowych z kationami NH_4^+ (164;165). Kation amonowy ma podobną średnicę do kationu potasu, a tworzące się w tych warunkach środowiska kwadrupleksy na ogół są także trwałe. Niezwykle istotne dla tego eksperymentu jest usunięcie z badanej próbki kationów sodu i potasu, gdyż ich obecność drastycznie obniża czułość metody. W trakcie wykonywania widma MS roztwór z rozpylonych kropelek odparowuje i kationy Na^+/K^+ zagęszczają się wokół ujemnie naładowanego kwasu nukleinowego, co prowadzi do powstania różnych adduktów i podziału intensywności głównego piku molekularnego na kilka odpowiadających różnej liczbie przyłączonych kationów. Octan amonu jest w tych warunkach lotny (NH_3 , AcOH) i tylko kationy amonowe schowane wewnątrz kanału kwadrupleksu są w stanie przetrwać warunki eksperymentu. Liczba takich jonów jest powiązana z ilością G-tetrad i wynosi na ogół $n-1$, gdzie n odpowiada liczbie G-tetrad w kwadrupleksie (rys. 70 A, B). Stosunek m/z dla adduktów z jonami NH_4^+ wynosi $m/z = (m_{\text{DNA}} + (n-1) \times 17 - z)/z$.



Rys. 70. Model kwadrupleksu z kationami amonowymi stabilizującymi G-tetrady (A), typowe widmo MS kwadrupleksu; oprócz formy czteroniciowej z adduktami kationów NH_4^+ obserwujemy monomer i dimer (B) (163;164).

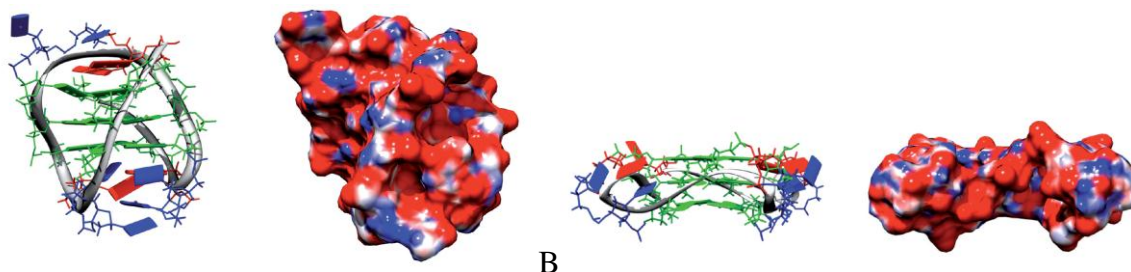
Należy jednak pamiętać, iż szybkość tworzenia się kwadrupleksu w obecności kationów amonu, szczególnie czteroniciowego, jest znacznie mniejsza niż w przypadku pozostałych jonów. Poniżej pokazane są widma MS w zależności od czasu inkubacji próbki z buforem amonowym (rys. 71). Aby przyspieszyć asocjację formy czteroniciowej często do badanej próbki dodaje się metanol (20% - 40%).



Rys. 71. Zależność intensywności poszczególnych pików w widmach masowych od czasu inkubacji próbki TG_5T z 0.15 M octanem amonu (154)

II.3.6. Metody biochemiczne

Szybkość migracji dupleksów DNA i RNA w żelu poliakrylamidowym w warunkach natywnych zależy przede wszystkim od liczby par zasad, a ich wielkość jest określana poprzez porównanie położenia prążka z markerem masowym (drabinką DNA). Dla kwadrupleksów taka zależność jest obarczona dużym błędem, gdyż powierzchnia kwadrupleksów jest bardziej globularna, a kształt kwadrupleksu oraz rozmieszczenie ładunku na jego powierzchni są trudne do oszacowania. Przyjmuje się, że dla jednoniciowych, antyrównoległych kwadrupleksów, stopień zagęszczenia ładunku jest mały i nie różni się znacznie pomiędzy poszczególnymi typami antyrównoległych topologii kwadrupleksów. Jedynie potencjał elektrostatyczny jednoniciowego, równoległego kwadrupleksu jest zdecydowanie inny, gdyż cechuje go wyjątkowo zwarta struktura (rys. 72).



Rys. 72. Struktura i potencjał elektrostatyczny dla jednoniciowego kwadrupleksu: antyrównoległego (A), równoległego (B); (156)

Jednocząsteczkowe kwadrupleksy migrują zazwyczaj szybciej w żelu niż ich liniowe odpowiedniki, podczas gdy dwu- i czterocząsteczkowe kwadrupleksy migrują wolniej z powodu wzrostu masy cząsteczkowej. Nietypowe struktury przyjmowane przez kwadrupleksy, jak np. dimery kwadrupleksów, migrują w żelu natywnym często z nieprzewidywalną szybkością i dlatego analizując migrację kwadrupleksów należy rozważyć stosować cząsteczki wzorcowe.

Ważną metodą badań kwasów nukleinowych jest chemiczne i enzymatyczne mapowanie ich struktury drugorzędowej. O strukturze drugorzędowej wnioskuje się na podstawie określenia, w analizowanej cząsteczce, miejsc podatnych na trawienia enzymatyczne lub modyfikacje chemiczne. Wśród najczęściej stosowanych enzymów wyróżnia się specyficzne względem struktury i sekwencji oraz takie, które nie wykazują specyficzności sekwencyjnej (tab. 11). Najbardziej popularne reagenty stosowane w metodach chemicznych to jony ołowiu, piperydyna, siarczek dimetylu (DMS), czy ester dietylowy kwasu pirowęglowego (DEPC). Szczególnie użyteczne do badania struktury kwadrupleksów jest zastosowanie siarczku dimetylu, który metyluje pozycję N7 guanozyn. Metoda ta pozwala ustalić, które reszty guanozyny uczestniczą w tworzeniu G-tetrazy. W resztach guanozyny zaangażowanych w tworzenie G-tetrazy atom azotu N7 jest chroniony przed metylacją, więc reszty te nie są trawione przez piperydynę lub są trawione tylko nieznacznie.

W celu precyzyjnego określenia miejsc cięć hydrolitycznych, produkty reakcji nakłada się na żel denaturujący i określa się ich długość.

Podstawowe enzymy i metale ciężkie stosowane w próbkowaniu biochemicznym kwasów rybonukleinowych oraz miejsca trawienia przedstawiłam w tabeli 11.

Tabela 11. Podstawowe enzymy i metale ciężkie stosowane w próbkowaniu biochemicznym

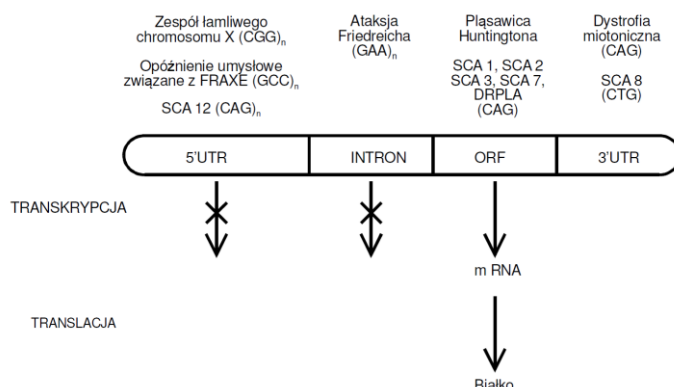
czynnik trawiący	miejsce trawienia w RNA
rybonukleazy T1	pojedyncza nić, przecina po resztach G
rybonukleazy T2	pojedyncza nić, preferencyjnie przecina po resztach A
rybonukleazy C13	pojedyncza nić, przecina po resztach C
rybonukleazy V1	regiony dwuniciowe
nukleaza S1	pojedyncza nić, bez specyficzności sekwencyjnej
metale ciężkie: Pb ²⁺	miejsca jednoniciowe lub zrelaksowane fragmenty dupleksu RNA

Jak dotychczas enzymatyczne mapowanie struktury drugorzędowej nie jest metodą często wykorzystywaną w badaniach struktury kwadrupleksów. Przykładowo, próbkowanie strukturalne oparte o enzymy T1 i S1 pozwoliło zaproponować model kwadrupleksu, w którym, na podstawie miejsc ulegających trawieniu, zostały zdefiniowane jednoniciowe fragmenty tworzące pętle w tej cząsteczce (166). Reszty guanozyny zaangażowane w tworzenie G-tetrad są stabilne w warunkach trawienia enzymatycznego.

Przedstawione powyżej zwięzłe omówienie metod stosowanych do badania kwadrupleksów dotyczy tylko wybranych, najczęściej stosowanych technik i nie wyczerpuje w pełni dostępnych metod, którymi możemy się posługiwać podczas rozwiązywania zagadnień dotyczących różnych aspektów strukturalnych dotyczących kwadrupleksów.

II.4. Choroby neurologiczne wywołane ekspansją trójnukleotydowych powtórzeń CGG

Genom człowieka zawiera 10% sekwencji powtarzających się tandemowo i łącznie 3% powtórzeń mikrosatelitarnych. Trójnukleotydowe powtórzenia (TNRs - ang. *Trinucleotide Repeats*) należą do grupy powtórzeń mikrosatelitarnych, określanych także jako krótkie powtórzenia tandemowe (STR - ang. *Short Tandem Repeats*) lub proste powtórzenia sekwencji (SSR - ang. *Simple Sequence Repeats*). Występują one zarówno u eukariotów (167) jak i prokariotów (168). TNRs mogą występować w regionach 5'-UTR (ang. *Untranslated Region*), ORF (ang. *Open Reading Frame*) lub 3'-UTR (rys. 73). Ogólne cechy TNRs to powszechne występowanie w części kodującej genu (60% w ORF) i kodowanie traktów poliaminokwasowych. W porównaniu do częstotliwości występowania w genomie, powtórzenia CNG są nadreprezentowane w eksonie, szczególnie powtórzenia CGG, które kodują poliglicynę oraz polialaninę (169). Z kolei w mRNA najczęściej występującymi motywami powtórzonymi są trójnukleotydy CNG (N=A,U,G,C), AGG oraz ACC. Częstość występowania TNRs jest największa w ORF (59%), następnie 5'-UTR (28%) oraz 3'-UTR (13%) a sekwencje bogate w reszty GC (CGG, CAG, CCG) przeważają w regionie 5'-UTR mRNA (169).



Rys. 73. Miejsca występowania trójnukleotydowych powtórzeń w genie oraz odpowiadające im choroby związane z ekspansją powtórzeń trójnukleotydowych. Krzyżykiem oznaczyłam zahamowanie procesu transkrypcji spowodowane ekspansją tych powtórzeń

Wzrost liczby powtórzeń krótkiego, zwykle trójnukleotydowego motywu w DNA ponad normę określoną dla każdego genu (tab. 12) zwany jest mutacją dynamiczną i może być spowodowany przez zjawisko poślizgu polimerazy DNA podczas replikacji DNA. Mutacje dynamiczne dotyczą najczęściej zwielokrotnienia nawet 300-krotnego trójnukleotydowej sekwencji powtórzonych, co w efekcie prowadzi do wystąpienia choroby genetycznej. Mutacje w TNRs jako czynnik dwóch chorób: zespołu łamliwego chromosomu X oraz rdzeniowo-opuszkowego zaniku mięśni typu Kennedy'ego opisano po raz pierwszy w 1991 roku. Choroby neurodegeneracyjne i neuromięśniowe o takim podłożu genetycznym to grupa około dwudziestu schorzeń o wspólnej nazwie TREDs (ang. *Triplet Repeat Expansion Diseases*) (tab. 12). Podczas każdego cyklu

replikacji może dochodzić do dalszego wydłużania powtarzającego się motywu, dlatego w tej grupie chorób u rodzin nią dotkniętych, z pokolenia na pokolenie objawy chorobowe ujawniają się wcześniej i są coraz cięższe. Objawy te związane są głównie z upośledzeniem czynności układu nerwowego. W kilku spośród opisanych dotąd chorób spowodowanych mutacjami dynamicznymi jak np. ataksja rdzeniowo-mózdkowa, choroba Kennedy’ego, czy choroba Huntingtona przyczyną choroby jest ekspansja trójnukleotydu CAG w części genu kodującego glutaminę. Ekspresja tak zmutowanego odcinka genu prowadzi do utworzenia traktu poliglutaminowego, który zaburza prawidłowe funkcjonowanie białka. Druga podgrupa chorób jest określana jako choroby ekspansji nieglutaminowych. Należą do niej choroby spowodowane mutacjami trójnukleotydomów powtórzeń (głównie CTG, CGG, CCG, AAG), które nie kodują aminokwasu glutaminy lub występują w obszarach niekodujących genu - 5'-UTR, 3'-UTR oraz intronach.

Tabela 12. Choroby związane z ekspansją powtórzeń trójnukleotydomów (170)

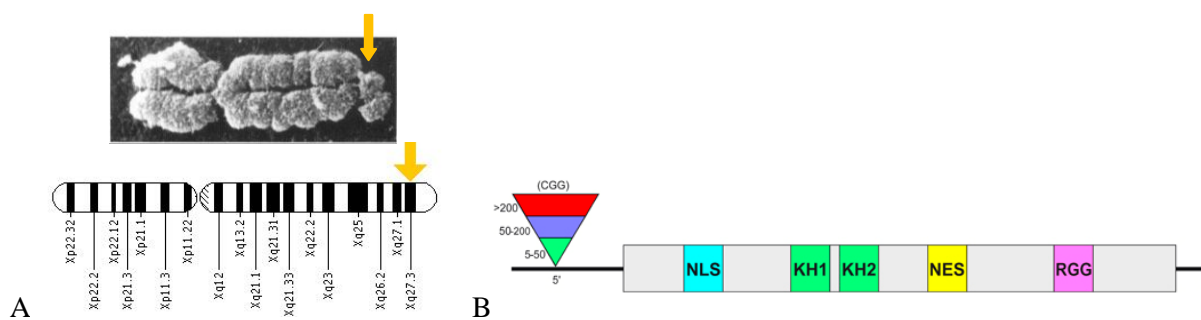
Choroba	Gen	Dziedziczenie	Lokalizacja chromosomalna	Powtórzenia	Białko	Liczba powtórzeń		Usytuowanie powtórzeń
						normalna	zmutowana	
Pląsawica Huntingtona	IT15	A D	4p16.3	CAG	huntingtyna	6 – 36	36 – 121	ORF
Zwyrodnienie zębato-czerwienne	DRPLA (B37)	A D	12p13.31	CAG	atrofina 1	3 – 36	49 – 88	ORF
Rdzen. zanik mięśni typu Kennedyego	AR	XR	Xq13-21	CAG	receptor androgenu	11 – 33	38 – 66	ORF
Ataksja rdzen.-mózdkowa 1	SCA1	A D	6p23	CAG	ataksyna 1	19 – 36	43 – 81	ORF
Ataksja rdzen.-mózdkowa 2	SCA2	A D	12q24.1	CAG	ataksyna 2	14 – 31	35 – 64	ORF
Ataksja rdzeniowo-mózdkowa 3	SCA3 (MJD)	A D	14q32.1	CAG	ataksyna 3	8 – 41	61 – 84	ORF
Ataksja rdzeniowo-mózdkowa 17	TBP	A D	6q27	CAG	TBP-podjednostka TFIID wiążąca DNA	29 – 42	47 – 55	ORF
Ataksja rdzeniowo-mózdkowa 6	CACNA1A	A D	19p13	CAG	α1A podjedn. kanału wapniowego napięciowo zależnego	4 – 18	21 – 30	ORF
Ataksja rdzeniowo-mózdkowa 7	SCA7	A D	3p12-13	CAG	ataksyna 7	4 – 35	37 – 200	ORF
Dystrofia mięśn. oczno-gardzielowa	PABP2	A D	14q11.2-q13	GCG	PABP2 (poli(A)BP2)	6 – 7	7 – 13	ORF
Achondroplazja rzekoma	COMP	A D	19p13.1	GAC	COMP	5	6/7	ORF
Zespół łamliwego chromosomu X	FMR1 (FRAXA)	XD	Xq27.3	CGG	FMRP	6 – 52 60 – 200p	200 – 2000	5'UTR
Upośledzenie umysł. związane z FRAXE	FMR2 (FRAXE)	XD	Xq28	GCC	FMR2	7 – 35 130 – 150p	230 – 750	5'UTR
Dystrofia miotoniczna	DMPK	A D	19q13	CTG	kinaza miotoniczna	5 – 37	50 – 2000	3'UTR
Ataksja rdzen.-mózdkowa 8	SCA8	A D	13q21	CTG	ataksyna 8	16 – 37	107 – 127	3'UTR
Ataksja rdzeniowo-mózdkowa 12	SCA12	A D	5q31-33	CAG	ataksyna 12	7 – 28	66 – 78	5'UTR
Ataksja Friedreicha	FRDA	A R	9q13-21.1	GAA	frataksyna	6 – 34 80p	112 – 1700	intron 1

AD – autosomalne dominujące
AR – autosomalne recesywne
XD – sprzężone z chromosomem X dominujące
XR – sprzężone z chromosomem X recesywne

Jednym z mechanizmów odpowiedzialnych za rozwój chorób typu TREDs są mutacje w części kodującej genu, które mogą prowadzić do utraty jego funkcji lub do powstania białka o innych właściwościach. Struktura cząsteczek RNA może także odgrywać rolę w patogenezie wielu z chorób TREDs (171-173). Na przykład w dystrofii miotonicznej wydłużony transkrypt przyjmujący strukturę spinki może nadmiernie wiązać białka regulatorowe, rozpoznające fragmenty dwuniciowe, prowadząc do zaburzeń metabolizmu. Obiecującą metodą leczenia chorób TREDs może okazać się selektywne wyciszanie zmutowanych genów drogą interferencji za pomocą krótkich 21-nukleotydowych siRNA. Krótkie siRNA oddziałują selektywnie tylko z docelowymi zmutowanymi strukturami złożonymi z powtórzeń CNG (174).

Poniżej omówiłam tylko te choroby, które spowodowane są ekspansją powtórzeń CGG, ponieważ powtórzenia te są przedmiotem mojego szczególnego zainteresowania.

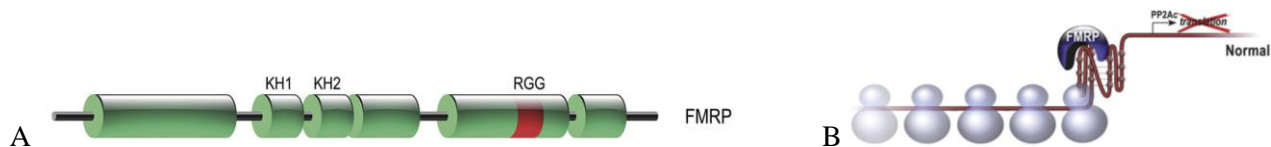
Niekontrolowana ekspansja powtórzeń CGG jest podłożem genetycznym zespołu łamliwego chromosomu X (FXS), nazywanego inaczej zespołem Martina-Bella, zespołu drżenia i ataksji związanych z zespołem łamliwego chromosomu X (FXTAS), jak również przedwczesnego wygaszania czynności jajników (POF, ang. *Premature Ovarian Failure*). Choroby te są spowodowane powieleniem liczby powtórzeń trójnukleotydowych CGG w rejonie 5'-UTR genu *FMRI*, który nie ulega translacji. Gen *FMRI* (rys. 74) zlokalizowany jest na chromosomie X, w obrębie długiego ramienia w pozycji 27.3, pomiędzy 146 699 054 a 146 738 156 parą zasad.



Rys. 74. Lokalizacja genu *FMRI* na chromosomie X (A), budowa genu *FMRI*. W rejonie 5'-UTR występują powtórzenia CGG (6-54 - normalna liczba powtórzeń; 55-200 – permutacja; ponad 200 - FXS); NLS, NES - sekwencje sygnałowe; domeny KH1, KH2, motyw RGG (B), (<http://www-fgg.eur.nl/kgen/research/fragx/>, <http://cornellbiochem.wikispaces.com/Fragile+X+Syndrome>)

Produktem tego genu jest białko FMRP (ang. *Fragile X Mental Retardation Protein*), które jest zlokalizowane głównie w cytoplazmie i ulega ekspresji w wielu tkankach, głównie w neuronach, szczególnie w dendrytach oraz spermatogoniach. Dokładna funkcja fizjologiczna produktu białkowego genu *FMRI* jest nadal nieznana. Białko FMRP jest niezbędne do prawidłowego rozwoju synaps między neuronami, odpowiedzialnymi m.in. za procesy uczenia się i zapamiętywania. Jego brak powoduje opóźnienie dojrzewania neuronów. Postulowana jest jego rola w transporcie oraz wydajności translacyjnej mRNA (175). Białko FMRP może wiązać się

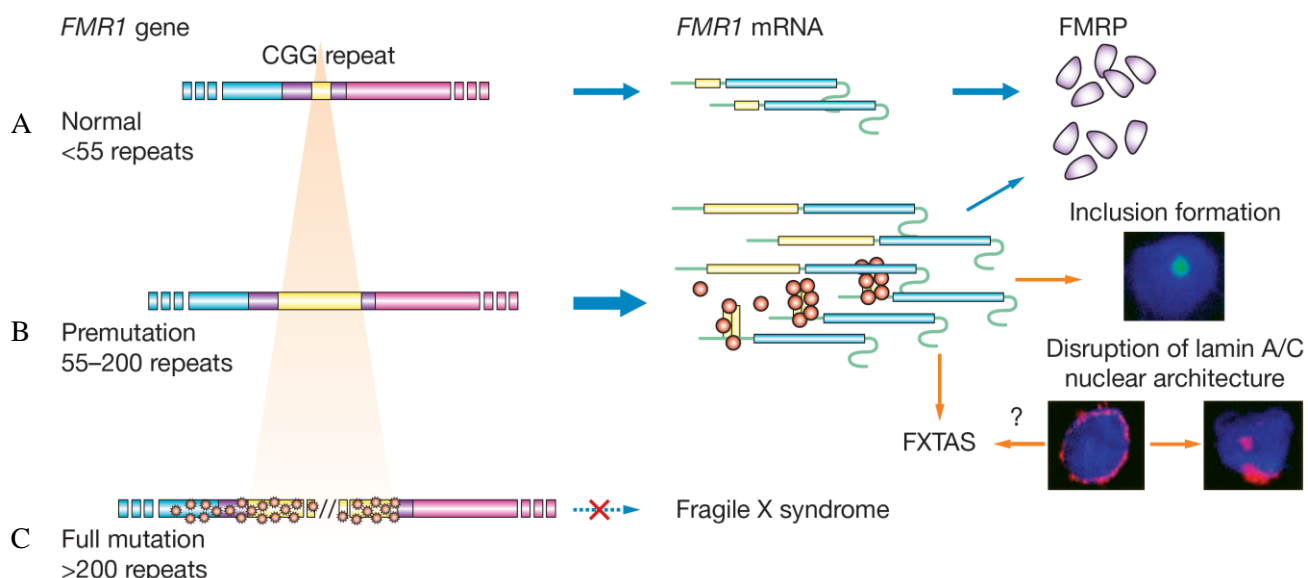
z mRNA i w ten sposób może uczestniczyć w regulowaniu, w tym najczęściej w hamowaniu translacji określonych mRNA. Białko FMRP zawiera dwie domeny KH1 i KH2, które są odpowiedzialne za wiązanie RNA. Dodatkowo białko to zawiera motyw RGG rozpoznający strukturę RNA bogatą w reszty guanozyny (rys. 75 A). Istnieją doniesienia, że białko FMRP



Rys. 75. Schematyczne przedstawienie funkcjonalnych domen w białku FMRP (A), schematyczny mechanizm hamowania translacji poprzez utworzenie kompleksu kwadrupleks:białko; PP2Ac (ang. Catalytic subunit of Protein Phosphatase 2A) (B) (176)

rozpoznaje i wiąże formę kwadrupleksu utworzoną z fragmentu mRNA co prowadzi do zahamowania translacji (176) np. dla PP2Ac mRNA w 5'-UTR (rys. 75 B).

W populacji osób zdrowych prawidłowy zakres liczby powtórzeń motywu CGG wynosi od 6 do 54 (rys. 76 A). Obejmuje on zakres pośredni (35–44 powtórzeń CGG) oraz tzw. „szarą strefę” (45–54 powtórzeń CGG). Wyróżnia się dwa patogenne zakresy liczby powtórzeń CGG, związane z jednostkami chorobowymi o odmiennym obrazie klinicznym. Gdy ilość powtórzeń wynosi od 55 do 200 (rys. 76 B), jest to tzw. premutacja, najczęściej nie dająca objawów chorobowych, ale mająca tendencję do „wydłużania się” w kolejnych pokoleniach. W tym zakresie liczby powtórzeń, trójnukleotydowe powtórzenia typu CGG są podłożem genetycznym zespołu drżenia i ataksji związanych z zespołem łamliwego chromosomu X, jak również przedwczesnego wygaszania czynności jajników. Pełna mutacja z liczbą powtórzeń CGG od 200 do kilku tysięcy (rys. 76 C) daje objawy choroby zespołu łamliwego chromosomu X.



Rys. 76. Schematyczne przedstawienie skutków ekspansji trójnukleotydowych powtórzeń CGG (177)

II.4.1. Zespół drżenia i ataksji związany z zespołem łamliwego chromosomu X (FXTAS)

Chorobę neurodegeneracyjną *FXTAS* po raz pierwszy opisano w 2001 roku. Zespół *FXTAS* został zaobserwowany u rodzin dotkniętych *FXS* i występuje u osób z premutacją genu *FMRI* (178). Choć częstość występowania premutacji w ogólnej populacji szacowana jest jako 1/259 u kobiet oraz 1/810 wśród mężczyzn, to *FXTAS* objawia się szczególnie u mężczyzn po 50 roku życia (179). Córki nosicieli premutacji ponoszą wysokie ryzyko (50%) posiadania dzieci z zespołem łamliwego chromosomu X. U ok. 25% nosicieli premutacji zaobserwować można występowanie subtelných zaburzeń intelektualnych oraz emocjonalnych, takich jak trudności w nauce, labilność emocjonalna, a także subtelných cech dysmorfii.

Objawy zespołu *FXTAS* przypominają chorobę Parkinsona (180). Typowe objawy to:

- ataksja (zaburzeniu koordynacji ruchów)
- drgawki i drżenie zamiarowe
- zaburzenia równowagi
- neuropatia obwodowa
- ubytki pamięci
- pobudzenie psychoruchowe

Rezonans magnetyczny mózgu chorych wykazuje uogólniony zanik mózgu, zmiany wskazują na chorobę istoty białej mózgu, mogącej odpowiadać demielinizacji (180). Obecnie ten charakterystyczny obraz rezonansu magnetycznego mózgu został uznany za główne kryterium diagnostyczne choroby.

Wydłużenie ciągu powtórzeń CGG w genie *FMRI* prowadzi od 2 do 8-krotnego zwiększenia poziomu mRNA oraz zmniejszenia poziomu białka FMRP nawet do 50% (rys. 76 B) (181). Podwyższony poziom mRNA jest raczej skutkiem wzrostu aktywności transkrypcyjnej genu *FMRI*, niż zwiększonej stabilności mRNA (182;183), a nadmierna ekspresja mRNA nie jest związana ze zmniejszeniem poziomu białka FMRP. Obniżona aktywność translacji jest odpowiedzialna za obniżony poziom FMRP. Obniżony poziom lub brak białka FMRP prowadzi do dysregulacji różnych szlaków, co zaburza rozwój mózgu, prowadząc do opóźnienia rozwoju.

Wykazano, że w porównaniu z prawidłowymi komórkami, mRNA komórki z premutacją wykazują obniżoną zdolność wiązania z polirybosomami. Wydłużone ciągi powtórzeń CGG w mRNA mogą konfiskować białka jądrowe, zaznaczone na rys. 76 B jako pomarańczowe kółka. Wiązanie się regulatorowych białek do mRNA może prowadzić do zaburzenia metabolizmu w komórce. Charakterystyczne dla *FXTAS* są również inkluzje w jądrach neuronów i astrocytów wykazujące obecność ubikwityny i HSP – agregatów źle sfałdowanych białek (rys. 76 B), występowania których nie stwierdzono u nosicieli pełnej mutacji (184). Normalny trakt r(CG_n) co 9-11 powtórzeń zawiera specyficzną sekwencję AGG, która najprawdopodobniej destabilizuje powstawanie struktur spinek (172). W zmutowanych allelach zaburzenia AGG w ciągu powtórzeń

nie występują lub występują rzadko.

II.4.2. Przedwczesne wygaszanie czynności jajników (POF)

Przedwczesne wygaszanie czynności jajników dotyka 5-24% kobiet posiadających premutację w genie *FMRI* (50-200 powtórzeń CGG) i powoduje długotrwały brak produkcji hormonów oraz bezpłodność. Podobnie jak w FXTAS poziom mRNA jest podwyższony a białka FMRP obniżony. Ryzyko wystąpienia POF nie zmienia się wraz ze wzrastającą liczbą powtórzeń >100 (178;185).

II.4.3. Zespół łamliwego chromosomu X (FXS)

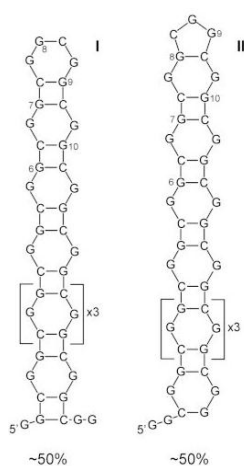
Jest to druga co do częstości, po zespole Downa, przyczyna genetycznych zaburzeń rozwoju umysłowego oraz najczęstsza przyczyna dziedzicznego upośledzenia umysłowego. Po raz pierwszy została opisana w 1943 roku jako zespół Martina i Bella. Występuje z częstością 1/4000 u mężczyzn i 1/8000 u kobiet. Choroba dziedziczona jest jako cecha sprzężona z chromosomem X, dominująca. U osób z pełną mutacją obserwowane w tym zespole objawy są następstwem utraty funkcji genu *FMRI* z powodu jego całkowitej metylacji (⁵MeCpG) (186). Pełna mutacja prowadzi do całkowitego zahamowania produkcji mRNA genu *FMRI* oraz białka FMRP (rys. 76 C) (187). Brak białka FMRP prowadzi natomiast do powstania konstelacji objawów – od upośledzenia funkcji poznawczych do zachowań autystycznych. Objawy FXS mają różne nasilenie: od problemów z mówieniem w wieku przedszkolnym i nauką szkolną po głębokie upośledzenie (IQ 20-70). W części przypadków pojawiają się też objawy zbliżone do ADHD i autyzmu (autoagresja, trzepotanie rękami). Objawy fizyczne występują głównie u mężczyzn (widoczne u 60% pacjentów). Charakterystyczne dla tej choroby cechy to pociągła twarz, wypukłe czoło, duży obwód czaszki, odstające uszy, zez czy wystająca żuchwa.

II.5. Struktury drugorzędowe cząsteczek zbudowanych z trójnukleotydomowych powtórzeń r(CG_n)

Do tej pory struktura trójnukleotydomowych powtórzeń r(CG_n) jest poznana w niewielkim stopniu. Najwięcej danych strukturalnych pochodzi z prac prowadzonych w ICHB PAN, w kilku zespołach badawczych, głównie w Pracowni Biomedycyny Naturalnej, Zespole Struktury i Funkcji Biomolekuł oraz Pracowni Chemii RNA. Dane literaturowe dotyczące struktury cząsteczek zbudowanych z powtórzeń r(CG_n) pochodzą głównie z badań biochemicznych (152;166;172;188-192), krystalografii (1;193) oraz ze spektroskopii UV (152).

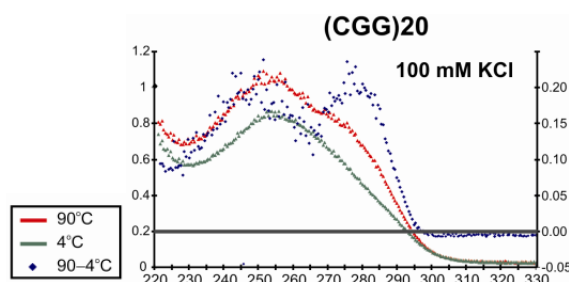
Badania rozpoczęte na początku lat 90, przez Pracownię Biomedycyny Naturalnej kierowaną przez prof. W. Krzyżosiaka, nad strukturą cząsteczek RNA, zbudowanych z trójnukleotydomowych powtórzeń były pionierskie. W ciągu następnych lat pracownia ta badała zależność pomiędzy strukturą drugorzędową przyjmowaną przez takie powtórzenia a patogenezą

chorób z grupy TREDs. Wśród analizowanych sekwencji znajdowały się powtórzenia typu CGG. Struktura drugorzędowa długich ciągów powtórzeń (CGG)_n (n = 17, 20) została ustalona głównie w oparciu o dane pochodzące z badań biochemicznych (sondy chemiczne i mapowanie enzymatyczne) oraz w przypadku cząsteczki (CGG)₂₀ została poparta analizą widm CD i różnicowych (TDS) (152). Obie te cząsteczki tworzyły spinki, jednak cząsteczka RNA zbudowana z 17 powtórzeń typu CGG preferowała tworzenie tzw. "poślizgniętej" struktury spinki (ang. *slippery hairpins*) (192). W roztworze, w porównywalnych ilościach, występowały dwie formy, które przedstawione są na rys. 77. Trzony spinek zbudowane są z sąsiadujących ze sobą par zasad G:C i C:G przedzielonych niedopasowaniem G:G. Pętla apikalna składa się z czterech lub trzech reszt nukleotydowych.



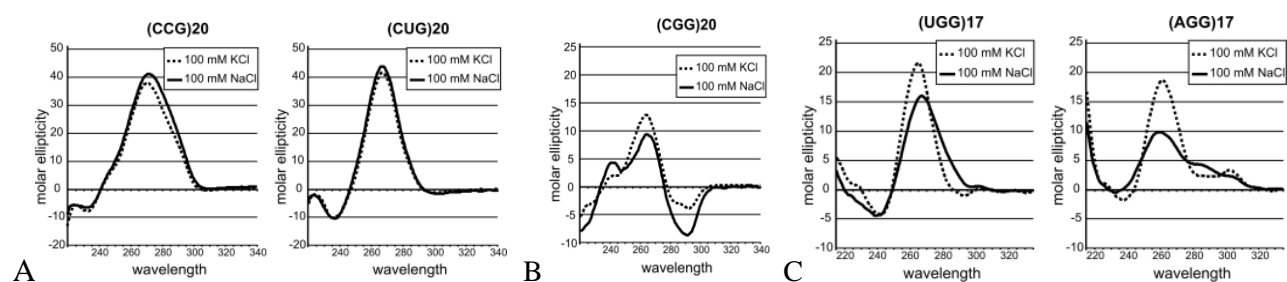
Rys. 77. Alternatywne struktury spinki utworzone przez powtórzenia $r(\text{CGG})_{17}$ (192)

Ciągi powtórzeń (CGG)_n są bogate w reszty guanozyny i powinny wykazywać tendencję do tworzenia kwadrupleksów, zwłaszcza w obecności kationów potasu. Dla podobnych sekwencji jak (AGG)₁₇ i (UGG)₁₇ zarówno mobilność elektroforetyczna, miejsca cięć, jak i widma TDS i CD wskazywały na formowanie się struktury kwadrupleksu (152). Jednak jak już wspomniałam, próbkowanie enzymatyczne cząsteczki (CGG)₂₀ (152), podobnie jak (CGG)₁₇ (192), wskazywało, iż tworzą one struktury stabilnych spinek. Dla cząsteczki (CGG)₂₀ zarejestrowano także widma różnicowe TDS w obecności kationów Na⁺ oraz K⁺, jednak widma te nie dowodziły formowania się struktury kwadrupleksu niezależnie od rodzaju kationu (rys. 78).



Rys. 78. Widmo różnicowe TDS – kolor granatowy, w 100 mM KCl [4°C, ~ 90°C, bufor podstawowy: 20 mM kakodylan sodu, 0.5 mM EDTA, pH 7.0]; (152)

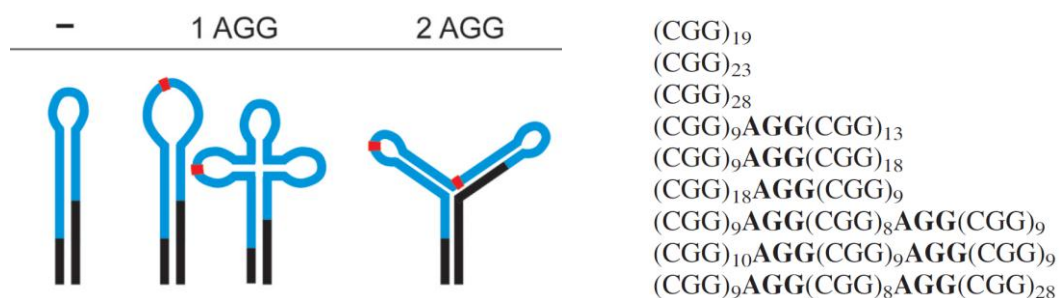
Jednak wyniki dalszych eksperymentów wskazywały na nietypowe zachowanie tej cząsteczki, które różniły ją od pozostałych cząsteczek tworzących spinkę, zbudowanych z powtórzeń (CUG)₂₀ i (CCG)₂₀. Podczas gdy widma CD cząsteczek (CCG)₂₀ oraz (CUG)₂₀ nie zmieniały się w zależności od typu kationu obecnego w roztworze (Na⁺/K⁺) (rys. 79 A), w widmie CD cząsteczki (CGG)₂₀ obserwowano zależność intensywności poszczególnych pasm od rodzaju kationu (rys. 79 B), podobnie jak dla cząsteczek (AGG)₂₀ i (UGG)₂₀ tworzących kwadrupleks (rys. 79 C). Widma te dla cząsteczki (CGG)₂₀ są również bardziej złożone niż dla wszystkich pozostałych cząsteczek. W widmie pokazanym na rysunku 79 B pojawiają się dodatkowe pasma, ujemne przy 295 nm oraz dodatnie przy ~ 240 nm, które nie są charakterystyczne dla struktury spinki (152).



Rys. 79. Zależność widm CD dla spinki (A, B), kwadrupleksu (C) od rodzaju kationu (Na⁺ lub K⁺); [temperatura pokojowa, bufor podstawowy: 20 mM kakodylan sodu, 0.5 mM EDTA, pH 7.0]; (152)

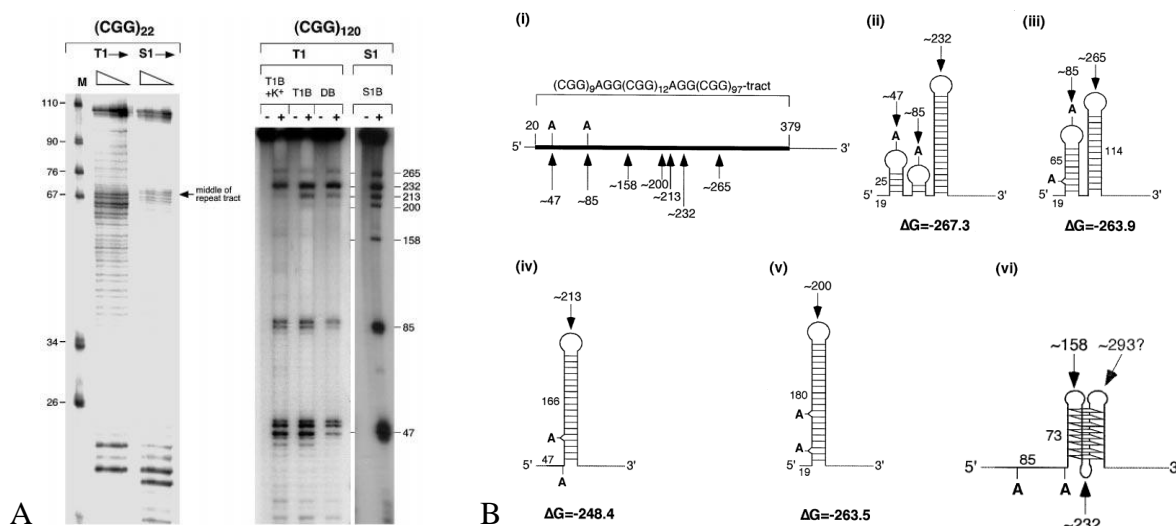
Najprawdopodobniej cząsteczka (CGG)₂₀ tworzy stabilną spinkę, jednakże w warunkach pomiaru widm CD oprócz tej formy współistnieje również inna konformacja, ale nie jest nią forma kwadrupleksu.

Jak już wspomniałam w normalnym trakcie mRNA co 9-11 powtórzeń CGG występują specyficzne, krótkie zaburzenia o sekwencji AGG. Jednak zaburzenia te nie występują zazwyczaj w ciągu RNA o patogennej licznie powtórzeń CGG. Jak ustalono stosując metody biochemiczne, powtórzenia trójnukleotydydowe zawierające od 19 do 28 powtórzeń CGG tworzyły pojedynczą strukturę spinki (172). Jednak w niektórych przypadkach obecność nawet jednej trójki zasad AGG wpływała na zmianę struktury takich cząsteczek (172). Sekwencje zawierające motyw AGG tworzyły najczęściej bardziej skomplikowane układy spiniek z dwoma lub trzema pętlami (rys. 80).



Rys. 80. Model struktury 2D dla powtórzeń (CGG)_n - bez AGG, z jednym AGG, z dwoma AGG; Kolorem czarnym zaznaczono sekwencje flankujące, niebieskim powtórzenia CGG, czerwonym AGG; (172)

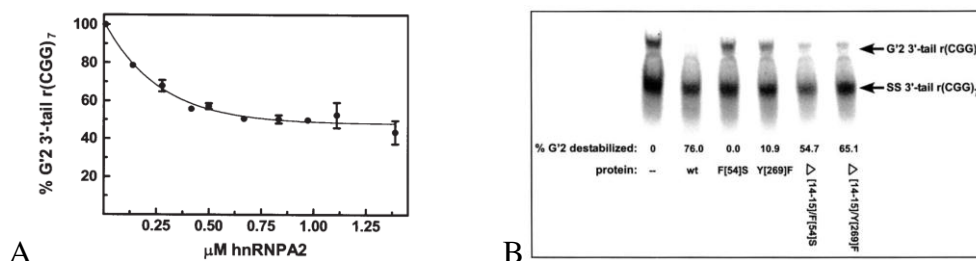
Ciekawe wyniki otrzymała także inna grupa badaczy (Handa V., Usdin K.) dla cząsteczki o sekwencji $(CGG)_9AGG(CGG)_{12}AGG(CGG)_{97}$, zawierającej fragment zbudowany z ponad 90 niezaburzonych powtórzeń CGG. Grupa ta wskazała na możliwość współistnienia oprócz formy spinki także formy kwadrupleksu (166). Stosując próbkowanie enzymatyczne takimi nukleazami jak T1 oraz S1 zaobserwowano pojawienie się w żelu natywnym szeregu prążków (rys. 81 A) świadczących o powstaniu złożonych struktur i obecności większej liczby konformacji. Wynik analizy profilu migracji fragmentów RNA wskazywał na współobecność kilku struktur spinek, pokazanych na rysunku 81 B. Jednak w wyniku działania enzymów na tą cząsteczkę obserwowane były w żelu natywnym także prążki odpowiadające cząsteczkom o długości 158 nt oraz 232 nt, których intensywność wzrastała w obecności kationów potasu. Na podstawie tych miejsc cięcia zaproponowano model kwadrupleksu pokazany na rys. 81 B (vi).



Rys. 81. Analiza struktury drugorzędowej cząsteczek $(CGG)_{22}$ oraz $(CGG)_{120}$ metodą ograniczonych trawień enzymatycznych z wykorzystaniem RNazy T1 i RNazy S1, (A), proponowane struktury drugorzędowe (B); (166)

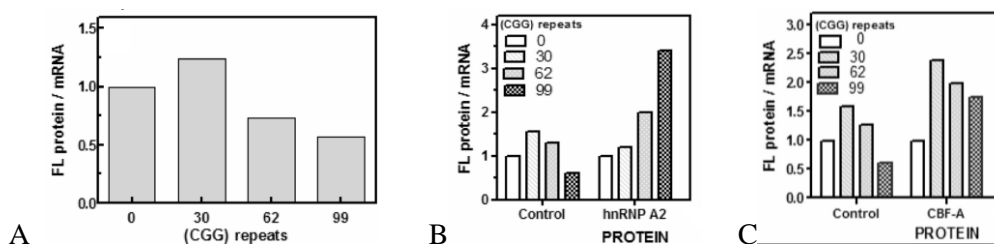
Obecność zaburzeń AGG, prowadziła do rozdzielania się dłuższej spinki na dwie lub trzy krótsze spinki (rys. 81 B ii, iii). Dla porównania cząsteczka $(CGG)_{22}$, zbudowana ze znacznie mniejszej liczby powtórzeń, która nie zawierała zaburzenia AGG, była trawiona przez nukleazy tylko w środkowej części sekwencji i tworzyła pojedynczą formę spinki (166). Badania przeprowadzone w naszym instytucie prowadziły do podobnych wniosków (rys. 80). Wyniki obydwu eksperymentów dowodzą, iż rola sekwencji zaburzających AGG, może polegać na destabilizacji struktur spinkowych. Jednak nie wykazano, aby obecność 1-2 powtórzeń AGG wpływała na efektywność translacji mRNA zawierającego motyw $(CGG)_{65-66}$ *in vitro* ani *in vivo* (190).

Badania biochemiczne z użyciem białek z rodziny hnRNP także pozwoliły na zgłębienie wiedzy o strukturze drugorzędowej powtórzeń r(CGG). Białka takie jak CBF-A oraz hnRNP A2 destabilizują antyrównoległe, dwucząsteczkowe kwadrupleksy zbudowane z powtórzeń d(CGG)_n (75). Dowiedziono, że białka te destabilizują także struktury kwadrupleksów RNA zbudowanych z powtórzeń (CGG)_n (188;189). Przykładowo cząsteczka o sekwencji r(CGG)₇-CGUGGACUC oprócz formy jednoniciowej tworzyła także dwucząsteczkowy kwadrupleks (188), dla którego stechiometria została ustalona wcześniej (64). W obecności białka hnRNP A2 dwucząsteczkowy kwadrupleks był destabilizowany do formy jednoniciowej (rys. 82). Efektywność destabilizacji kwadrupleksu zależała od rodzaju mutacji wprowadzonej w białku hnRNP A2, przy czym białko niemodyfikowane najefektywniej destabilizowało strukturę kwadrupleksu (~ 76%), w warunkach natywnej elektroforezy (rys. 82) (188).



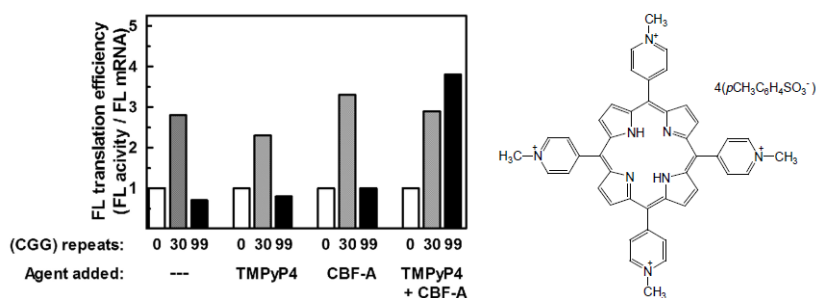
Rys. 82. Zależność procentowego udziału dwucząsteczkowego kwadrupleksu od stężenia białka hnRNP A2 (A), profil migracji formy jednoniciowej (SS, ang. single strand) oraz kwadrupleksu (G'2) w natywnym żelu w zależności od obecności oraz typu mutacji w białku hnRNP A2 (B) (188)

Długie ciągi powtórzeń CGG w 5'-UTR mRNA (zakres premutacji) przyjmują stabilną strukturę spinki czy kwadrupleksu, co utrudnia przebieg translacji, gdyż powstawanie takich struktur może prowadzić między innymi do obniżonej zdolności wiązania mRNA z polirybosomami. Wykazano, że poziom translacji wzrastał w obecności pewnych białek z rodziny hnRNP, które są znane ze swoich właściwości destabilizujących strukturę kwadrupleksów, zbudowanych z powtórzeń CGG. Przykładowo, w obecności białka hnRNP A2 lub CBF-A wzrastała wydajność translacji *in vivo* dla fragmentów RNA o sekwencji (CGG)₁₀AGG(CG)₉AGG(CG)₁₂, (CGG)₆₆ oraz (CGG)₉₉ (rys. 83). Efekt ten był największy dla długiego ciągu powtórzeń (CGG)₉₉ obejmującego już zakres premutacji. Wzrost wydajności translacji był możliwy dzięki destabilizacji struktury kwadrupleksu do formy jednoniciowej RNA (189).



Rys. 83. Porównanie wydajności translacji w zależności od ilości mRNA bez dodatkowego białka (A), w obecności białka hnRNP A2 (B), w obecności białka CBF-A (C) (189)

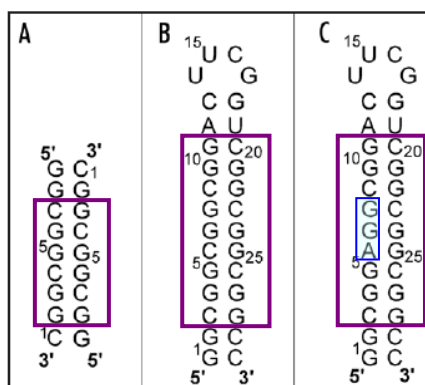
Na rysunku 84 przedstawiłam zależność wydajności translacji (CGG)_n-FL mRNA dla różnej długości powtórzeń (CGG)_n, w zależności od obecności białka CBF-A i/lub pochodnej porfiryny TMPyP4.



Rys. 84. Graficzne przedstawienie wpływu ilości powtórzeń (CGG)_n oraz obecności białka CBF-A lub pochodnej porfiryny TMPyP4 na wydajność translacji (CGG)_n-FL mRNA *in vivo* (191)

Dla sekwencji (CGG)₃₀, obecność białka CBF-A oraz TMPyP4 nie miała większego wpływu na wydajność translacji (rys. 84), jednak stosując to samo białko łącznie z TMPyP4 dla cząsteczki (CGG)₉₉, zawierającej znacznie większą ilość powtórzeń, uzyskano znaczący wzrost wydajności translacji w stosunku do próby odniesienia (191). Zdecydowanie inne zachowanie cząsteczek RNA, zbudowane z ponad 90 powtórzeń CGG, z białkami z rodziny hnRNP może świadczyć, iż dłuższe cząsteczki łatwiej tworzą kwadrupleksy.

Do tej pory nie ma żadnych danych strukturalnych o cząsteczkach zbudowanych z powtórzeń r(CGCG), uzyskanych metodami NMR. Dotychczas ukazało się jedynie pojedyncze doniesienie literaturowe, w którym zawarte są nieliczne eksperymenty NMR w postaci fragmentów widm 2D NOESY. Wyniki badań dla pokazanych poniżej trzech sekwencji RNA sugerują, że cząsteczki zawierające powtórzenia CGG tworzą dupleksy z parami zasad G:G (rys. 85 A) lub zawiązują struktury typu spinki (rys. 85 B-C).² Obecność dodatkowej sekwencji zaburzającej, AGG, w ciągu powtórzeń CGG, nie wpływa na stabilność spinki w fizjologicznym stężeniu jonów magnezu (194).

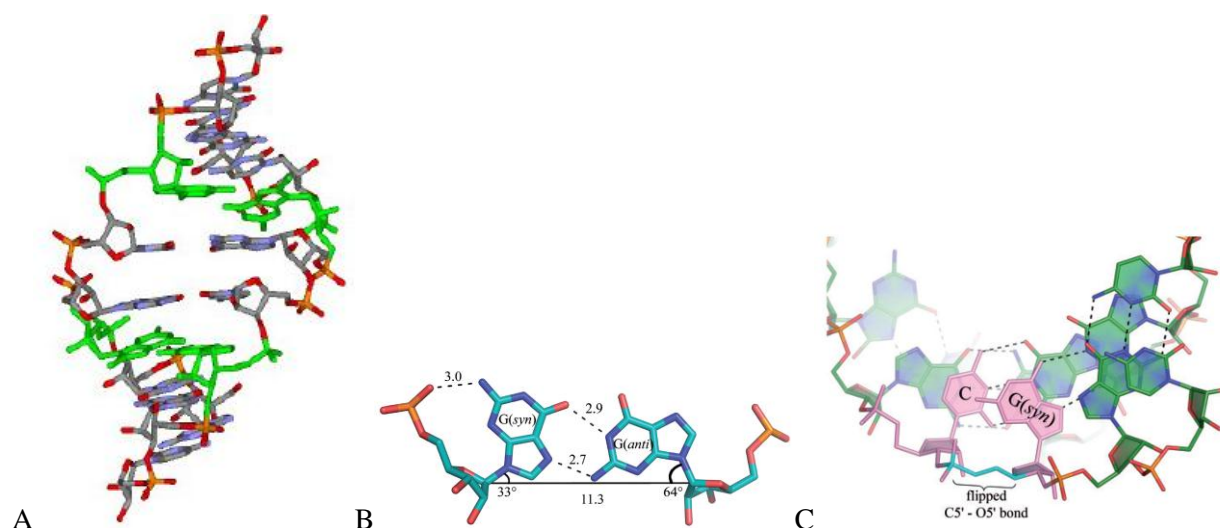


Rys. 85. Schematyczna struktura dupleksu, sekwencja flankująca GG-X-C (A), spinki, sekwencja flankująca GG-X-CC, pętla ACUUCGGU (B), spinki z zaburzeniem AGG, sekwencja flankująca GG-X-CC, pętla ACUUCGGU (C)

² W pracy (194) nie pokazano żadnego widma ¹H NMR; autorzy podają iż, sygnały pochodzące od powtórzeń CGG są szerokie oraz obserwują uśrednienie konformacyjne pomiędzy różnymi formami obecnymi w roztworze

II.6. Struktury trzeciorzędowe cząsteczek zbudowanych z trójnukleotydowych powtórzeń r(CGG)n

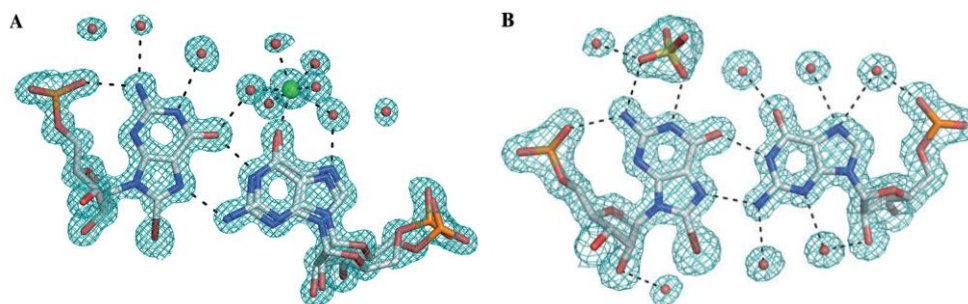
Dla formy spinki bądź dupleksu w literaturze opisano aż 15 różnych typów par zasad G:G (baza danych <http://prion.bchs.uh.edu/bptype/>, <http://www.lbit.iro.umontreal.ca/BasePair Classification/>), w tym cztery typy par zasad, w których zawiązują się po dwa wiązania wodorowe oraz w przypadku kwadrupleksu motyw G-tetrazy z ośmioma wiązaniami wodorowymi. Dla cząsteczek zbudowanych z powtórzeń CGG, na podstawie badań biochemicznych oraz spektroskopii UV, nie można ustalić typu zawiązujących się par zasad G:G lub określić reszt zaangażowanych w tworzenie G-tetrad. Wyznaczenie struktur trzeciorzędowych metodami NMR lub krystalografii jest wolnym procesem w porównaniu do przedstawionych wyżej metod, za to pozwala uzyskać szczegółowe informacje o strukturze badanej cząsteczki. Jednak do ubiegłego roku nie była znana żadna struktura trzeciorzędowa cząsteczek zbudowanych z powtórzeń r(CGG)n. Obecnie opublikowane są 3 struktury krystalograficzne cząsteczek RNA o sekwencjach G-C^{Br}GGCGG-C, G-C^{Br}GGCGGCGG-C oraz G-CGGCGG-C, które tworzą w kryształach dupleksy, rozwiązane w Zespole Struktury i Funkcji Biomolekuł, ICHB (1). W oktamerze G-C^{Br}GGCGG-C (rys. 86 A) zawiązują się dwie pary zasad typu *imino-amino* ^{Br}G_(syn):G (rys. 86 B), w których dwa wiązania wodorowe utworzone są pomiędzy atomami: G(O6)-G(NH1) i G(N7)-G(N2H₂) (1). W niekanonicznej parze zasad ^{Br}G_(syn):G wszystkie odległości pomiędzy atomami zaangażowanymi w wiązanie wodorowe mieszczą się w zakresie 2.6–3.3 Å. Dodatkowa stabilizacja tej pary zasad pochodzi od wiązania wodorowego pomiędzy grupą aminową reszty ^{Br}G_(syn) a atomem tlenu grupy fosforanowej (rys. 86 B).



Rys. 86. Struktura krystalograficzna G-C^{Br}GGCGG-C (A), para zasad G(O6)-G(NH1) i G(N7)-G(N2H₂) (B) lokalne rozwinięcie łańcucha pomiędzy resztami G_(syn) oraz C (C) (1)

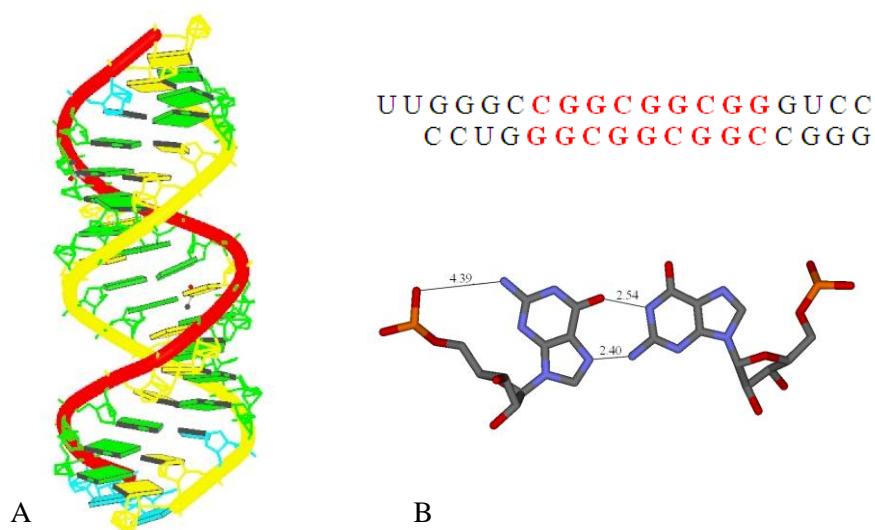
Ponieważ reszty guanozyny w niekanonicznej parze zasad ^{Br}G_(syn):G są bardziej objętościowe w stosunku do pary zasad G:C, to dystans pomiędzy atomami C1'-C1' jest większy o ok. 0.5 Å od typowego. Kąty torsyjne α, γ pomiędzy resztą G_(syn) a resztą cytydyny przyjmują nietypowe dla

helisy A-RNA wartości, jednak to lokalne rozwinięcie łańcucha nie zaburza formy A-RNA całej helisy (rys. 86 C). Para zasad $^{Br}G_{(syn)}:G_{(anti)}$ w cząsteczce $G-C^{Br}GGCGG-C$ wiąże jony wapnia od strony szerokiej bruzdy (rys. 87 A). Z kolei dłuższa cząsteczka $G-C^{Br}GGCGGCGG-C$ tworząca także dupleks, wiąże jony siarczanowe w obrębie dwóch par zasad $^{Br}G_{(syn)}:G_{(anti)}$ (rys. 87 B). Cząsteczka ta zawiera także parę G:G, która występuje w konformacji $G_{(anti)}:G_{(syn)}$ lub jest nieuporządkowana.



Rys. 87. Hydratacja pary zasad $^{Br}G_{(syn)}:G_{(anti)}$ oraz wiązanie: kationu wapnia przez atom O6 reszty $G_{(anti)}$ w cząsteczce $G-C^{Br}GGCGG-C$ (A) anionu siarczanowego przez krawędź Watsona-Cricka reszty $^{Br}G_{(syn)}$ w cząsteczce $G-C^{Br}GGCGGCGG-C$ (B) (1)

Podobna sytuacja ma miejsce w strukturze krystalograficznej cząsteczki $G-CGGCGG-C$. Jeśli jedna z reszt guanozyny w parze zasad G:G nie jest usztywniona w konformacji *syn* przez wprowadzenie objętościowego podstawnika jakim jest atom bromu, wtedy w dupleksie obserwujemy zarówno pary zasad $G_{(syn)}:G_{(anti)}$, $G_{(anti)}:G_{(syn)}$ jak i pary nieuporządkowane. W cząsteczce $G-CGGCGG-C$ symetryczne pary zasad $G_{(syn)}:G_{(anti)}$ lub $G_{(anti)}:G_{(syn)}$ były obserwowane w 14 z 18 dupleksów, w tym para zasad $G_{(anti)}:G_{(syn)}$ występowała nieco częściej bo w 8 na 14 przypadków (1). Również inna cząsteczka RNA, zbudowana z dwóch różnych nici, zawierających po trzy powtórzenia CGG, tworzy w kryształach dupleks (rys. 88). W strukturze tej trzy pary zasad G:G są ułożone niesymetrycznie, najpierw występują dwie pary $G_{(syn)}:G_{(anti)}$ natomiast ostatnia para



Rys. 88. Struktura krystalograficzna dupleksu (PDB ID: 3SJ2) (A), para zasad $G(O6)-G(NH1)$ i $G(N7)-G(N2H2)$ (B) (193)

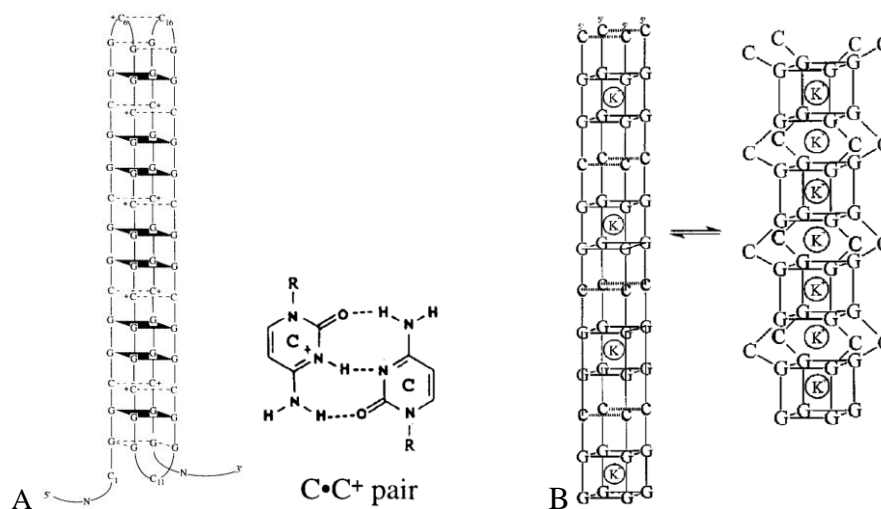
występuje w przeciwnej konformacji $G_{(anti)}:G_{(syn)}$ (193).

Obecnie w bazie PDB nie jest zdeponowana żadna struktura trzeciorzędowa kwadrupleksu RNA zbudowanego z powtórzeń CGG oraz jakakolwiek struktura trzeciorzędowa cząsteczek, zbudowanych z takich powtórzeń, która byłaby rozwiązana metodami NMR w roztworze.

II.7. Struktury drugorzędowe cząsteczek zbudowanych z trójnukleotydowych powtórzeń $d(CG G)_n$

Generalnie cząsteczki zbudowane z kilku powtórzeń $d(CG G)$, podobnie jak analogiczne cząsteczki RNA, tworzą struktury spinki (195-197) lub kwadrupleksu (198), (199). Poniżej przedstawiłam tylko te wyniki eksperymentów, w oparciu o które zaproponowano model kwadrupleksu.

W przypadku powtórzeń $d(CG G)_n$, tworzenie się kwadrupleksu może być ułatwione przez zawiązywanie tetrad, w których zaangażowane są protonowane reszty cytydyny $C \cdot C^+$. Na podstawie szybkości migracji cząsteczki $d(CG G)_{20}$ w żelu oraz zróżnicowanej podatności donorowej grupy N7 na metylowanie przy pomocy DMS (w zależności od zmieniającego się pH i obecności kationów potasu) zaproponowano model kwadrupleksu pokazany na rys. 89A (200;201). W pH niższym niż 7, dwa fragmenty DNA o strukturze spinki dimeryzują i tworzą antyrównoległy kwadrupleks, w którym oprócz G-tetrad powstają także tetrazy $C \cdot C^+ \cdot C \cdot C^+$ (rys. 89 A).



Rys. 89. Model kwadrupleksu dla cząsteczki o sekwencji $d(CG G)_{20}$, zbudowany z G-tetrad oraz $C:C^+ : C:C^+$ tetrad. Schemat wiązań wodorowych w parze zasad $C:C^+$ (A), równowaga pomiędzy dwiema formami kwadrupleksów dla cząsteczki o sekwencji $d(CG G)_4$ (B) (200;202)

Obecność tetrad $C \cdot C^+ \cdot C \cdot C^+$ wydaje się być także kluczowa dla stabilności czteroniciowego kwadrupleksu, którego model przedstawiłam na rys. 89 B. W kwaśnym środowisku (pH ~ 5.4) cząsteczka $d(CG G)_4$ tworzy równoległy kwadrupleks, który następnie ulega przekształceniu do formy pokazanej na rys. 89 B, w której wszystkie reszty cytydyny są wyrzucone na zewnątrz (202).

Zauważono, że dla cząsteczek DNA zbudowanych z powtórzeń (CGG)_n, oprócz protonowania reszt cytydyn także ich metylacja ułatwia formowanie kwadrupleksów. Aby utworzyła się struktura kwadrupleksu wymagana jest większa liczba powtórzeń w przypadku niemodyfikowanej sekwencji d(CG₇) niż dla cząsteczki d(^{5Me}CGG)₅, która jest krótsza ale zawiera metylowane reszty cytydyny (203).

II.8. Struktury trzeciorzędowe cząsteczek zbudowanych z trójnukleotydowych powtórzeń d(CG_n)

Przeszukałam bazę danych PDB pod kątem struktur, jakie tworzą cząsteczki zawierające motyw d(CG₂CGG) i okazało się, że takie cząsteczki tworzyły głównie duplekсы (tab. 13).

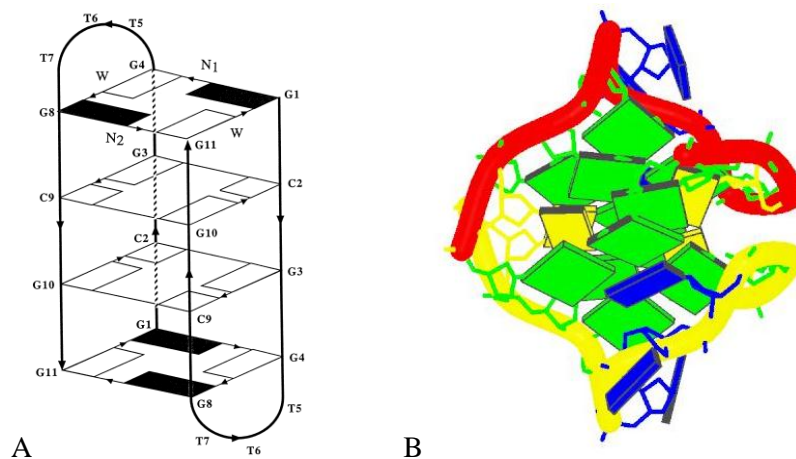
Tabela. 13. Wykaz struktur dla motywu CGGCGG, znajdujących się w bazie danych PDB

motyw CGGCGG	typ struktury	PDB ID
d(CG ₂ CGG-CCGC)	czteroczłonowy styk	3Q5C
d(CCGC-CGGCGG)	dupleks	1ZFB
d(CCGC-CGGCGG)	dupleks	382D
	dupleks	1QC1
d(C ^{Me} CGC ^{Me} CGG ^{Me} CGG)	dupleks	383D
d(C ^{Me} CGC ^{Me} CGG ^{Me} CGG)	dupleks	384D
5'd(ACCGC ^{Me} CGGCGCC)3' 5'd(GGCGC ^{Me} CGGCGGT)3'	dupleks utworzony z dwóch komplementarnych nici	329D
5'd(ACCGCCGGCGCC)3' 5'd(GGCGCCGGCGGT)3'	dupleks utworzony z dwóch komplementarnych nici	330D

Natomiast znane są tylko cztery struktury kwadrupleksów zawierające, co najmniej jeden motyw d(CG₂). Wszystkie te struktury zostały rozwiązane metodami NMR. Kwadrupleksy te zbudowane były z cząsteczek o sekwencjach:

- d(GCGGTTTGCGG)
- d(GCGGTTGGAT)
- d(GCGGTGGAT)
- d(TGGGCGGT)

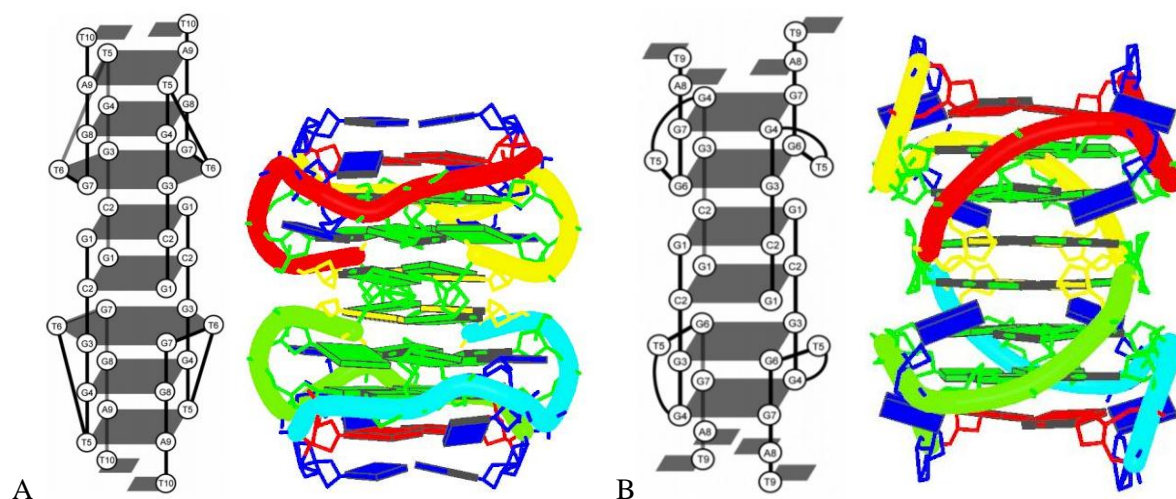
Tylko jedna z tych cząsteczek zawierała dwa motywy CGG, które były jednak oddzielone od siebie trzema resztami tymidyny. Cząsteczka ta, w obecności kationów sodu tworzyła dwucząsteczkowy kwadrupleks (141), w którym reszty tymidyny tworzyły pętle boczne (rys. 90).



Rys. 90. Model (A) oraz struktura (B) kwadrupleksu DNA o sekwencji $d(GCGGT_3GCGG)$, zawierającej motyw CGG, (PDB ID: 1A6H)

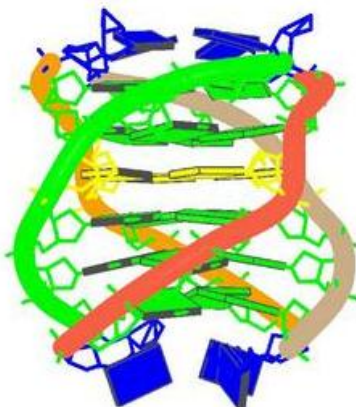
W wyniku orientacji pętli bocznych po przeciwnych stronach cząsteczki powstał kwadrupleks zbudowany z dwóch centralnych, mieszanych G:C:G:C tetrad o przeciwnej kierunkowości oraz tetrad G(syn):G(anti):G(syn):G(anti), które je otaczają. Prawdopodobnie cząsteczka RNA o analogicznej sekwencji nie utworzyłaby takiej struktury, ponieważ topologia ta wymusza przyjęcie konformacji G(syn) przez dwie reszty guanozyny w każdej G-tetradzie, a konformacja ta nie jest preferowana dla RNA.

Dwie kolejne cząsteczki, $d(GCGGTTGGAT)$ (204) oraz $d(GCGGTGGAT)$ (143), zawierają po jednym powtórzeniu CGG i pomimo, iż ich sekwencje różnią się tylko jedną resztą tymidyny, tworzą one odmienne struktury kwadrupleksów. Jediną wspólną cechą kwadrupleksów utworzonych przez te cząsteczki jest zazębianie się jednoniciowych końców. W obu przypadkach dwie usytuowane w centralnej części kwadrupleksu tetrady G:C:G:C utworzone są z 4 różnych nici przez reszty G1 i C2 z końca 5'. Chociaż w obu kwadrupleksach występują dwie równoległe G-tetrady, struktury te różni powstawanie heksady G:G:T:G:G:T i obecność dodatkowej A:T:A:T tetrady w strukturze pokazanej na rys. 91 A.



Rys. 91. Struktury kwadrupleksów DNA utworzonych z sekwencji zawierających motyw CGG: $d(GCGGTTGGAT)$, (PDB ID: 1XCE) (A), $d(GCGGTGGAT)$, (PDB ID: 1NYD), (B)

Znana jest jeszcze jedna struktura, która zawiera motyw CGG, ale poprzedzony w sekwencji trzema resztami guanozyny. Częsteczka ta tworzy równoległy, czteroniciowy kwadrupleks, w którym pojawia się dodatkowo tetrada C:C:C:C (rys. 92). Chociaż protonowanie reszty cytydyny sprzyja tworzeniu C-terady i kwadrupleksów jednak nie jest to koniecznym wymogiem.



Rys. 92. Struktura kwadrupleksu DNA utworzona z sekwencji zawierających motyw CGG: *d(TGGGCGGT)* (PDB ID: 1EVO)

II.9. Właściwości termodynamiczne powtórzeń CGG

W Pracowni Chemii RNA, kierowanej przez prof. R. Kierzka, analizowano trwałość termodynamiczną cząsteczek RNA utworzonych z 2-7 powtórzeń CGG. Powtórzenia CGG są trwalsze od innych powtórzeń typu CNG ($G \gg U > A \sim C$) (187). Struktura jaką przyjmują cząsteczki zbudowane z tych powtórzeń jest ściśle powiązana z liczbą powtórzeń trójnukleotydowych. Cząsteczki zbudowane z 2 do 4 powtórzeń CGG tworzyły dupleks natomiast dłuższe preferowały formę spinki (tab. 14).

Tabela 14.

A. Parametry termodynamiczne modyfikowanych chemicznie dupleksów zbudowanych z powtórzeń CGG (205)

sekwencja	$-\Delta H^\circ$ (kcal/mol)	$-\Delta S^\circ$ (eu)	$-\Delta G_{37}^\circ$ (kcal/mol)	T _m (°C) ^a
G-CGGCGG-C	56.7±2.6	161.1±8.4	6.76±0.04	43.0
G-C ^{Br} GGCGG-C	98.7±5.0	280.9±15.4	11.53±0.24	56.6
G-CGGC ^{Br} GG-C	74.8±2.4	208.2±7.5	10.2±0.12	57.0
G-C ^{Br} GGC ^{Br} GG-C	46.5±3.6	129.8±11.7	6.24±0.09	40.8
G-CIGCGG-C	65.5±7.8	192.6±25.4	5.78±0.19	37.5
G-CGGCIG-C	74.8±14.1	20.8±45.4	6.29±0.48	39.6
G-CIGCIG-C	46.4±3.1	132.9±10.1	5.15±0.11	33.5
G-CPGCGG-C	57.1±2.6	167.0±8.4	5.29±0.06	34.9
G-CGGCPG-C	64.3±6.9	186.6±22.1	6.39±0.18	40.5
G-CPGCPG-C	36.5±3.6	101.2±11.8	5.09±0.17	32.1

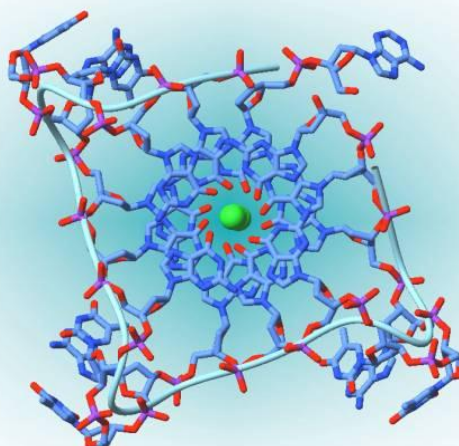
B. Parametry termodynamiczne dupleksów zbudowanych z powtórzeń CGG (205)				
G-(CGG) ₃ -C	50.7±3.2	134.3±9.7	9.09±0.45	59.5
G-(CGG) ₄ -C	58.0±7.6	153.0±23.8	10.56±0.20	65.6
C. Parametry termodynamiczne spinek zbudowanych z powtórzeń CGG (205)				
G-(CGG) ₅ -C	19.9±4.50	58.20±13.5	1.86±0.29	69
G-(CGG) ₆ -C	23.9±3.30	69.80±9.6	2.24±0.33	69
G-(CGG) ₇ -C	23.4±4.00	67.5±11.7	2.51±0.39	74.2
bufor - 1M NaCl, 20 mM kakodylan sodu, 0.5 mM EDTA, pH 7, a – obliczone dla stężenia oligomeru 10 ⁻⁴ M				

Niewielka zmiana w sekwencji zawierającej powtórzenia r(CG_nG)_n, jak np. modyfikacja chemiczna także powoduje istotne zmiany w trwałości oligomeru. Zastąpienie jednej z reszt guanozyny w parze G:G 8-bromoguanozyną (^{Br}G) podwyższa trwałość termodynamiczną cząsteczek G-C^{Br}GGCGG-C i G-CGGC^{Br}GG-C o ponad 4 kcal/mol (205). Dla cząsteczki zawierającej resztę ^{Br}G w pozycjach 3 i 6 parametry termodynamiczne były podobne do referencyjnego dupleksu. Wprowadzenie modyfikacji takich jak reszta purynorybozydu (P) czy inozyny (I) w dowolne miejsce w cząsteczce zawsze powodowało jej destabilizację (tab. 14). Podsumowując, modyfikacje wymuszające konformację *syn* jednej reszty w parze zasad G:G zwiększały trwałość cząsteczki G-CGGCGG-C, co świadczyło o zawiązywaniu się wiązań wodorowych w jej obrębie. O obecności wiązań wodorowych pomiędzy niekanoniczną parą zasad G:G świadczył również efekt destabilizacji wywołany wprowadzeniem modyfikacji, które nie posiadały grup funkcyjnych koniecznych do utworzenia takich wiązań wodorowych (P, I).

Z badań termodynamicznych wynikało, że znacznie dłuższa cząsteczka RNA, zbudowana z 20 powtórzeń CGG, prawdopodobnie także tworzy strukturę spinki. Temperatura topnienia tej cząsteczki nie zależała od rodzaju kationu jednowartościowego, Na⁺ czy K⁺, i wynosiła ~ 75°C, jednak wraz ze zmianą buforu sodowego na potasowy energia swobodna znacząco wzrosła ($\Delta\Delta G^{\circ}_{37} = 2,36$ kcal/mol). Dla porównania w przypadku cząsteczek (AGG)₁₇ i (UGG)₁₇ tworzących kwadrupleks, w obecności kationów potasu, obserwowano znaczną zmianę trwałości tych cząsteczek, rzędu 20°C oraz spadek energii swobodnej o ponad 5 kcal/mol (152).

Wyniki pomiarów termodynamicznych były bezpośrednią inspiracją dla Zespołu Biomolekularnego NMR do badania modyfikowanych chemicznie cząsteczek RNA.

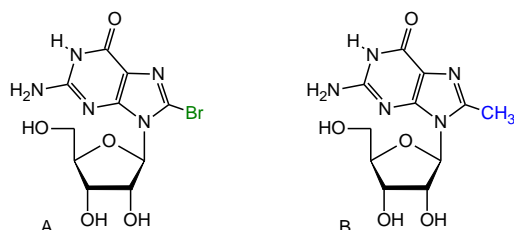
III. OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ WŁASNYCH



III.1. Synteza i analiza NMR nukleozydów modyfikowanych w pozycji C8	89
III.2. Analiza cząsteczek RNA zawierających modyfikowane reszty ^{Br} G oraz ^{Me} G	92
III.2.1. Analiza widm ¹ H NMR cząsteczek RNA zawierających modyfikację ^{Br} G lub ^{Me} G	101
Ustalenie konformacji <i>syn/anti</i> wokół wiązania <i>N</i> -glikozydowego dla modyfikowanych reszt ^{Me} G i ^{Br} G	108
Struktura kwadrupleksu a widma NMR	118
III.2.2. Zależność temperaturowa widm ¹ H NMR cząsteczek RNA zawierających modyfikację ^{Me} G lub ^{Br} G	120
III.2.3. Wpływ typu soli i siły jonowej roztworu na widma ¹ H NMR cząsteczek RNA zawierających modyfikację ^{Me} G lub ^{Br} G	122
III.2.4. Wpływ stężenia RNA na widma ¹ H NMR cząsteczek RNA zawierających modyfikację ^{Me} G lub ^{Br} G	126
III.2.5. Widma masowe cząsteczek RNA zawierających modyfikację ^{Me} G lub ^{Br} G	128
III.2.6. Model struktury antyrównoległego kwadrupleksu	131
III.3. Analiza cząsteczek RNA zawierających oprócz modyfikacji ^{Me} G i ^{Br} G dodatkowo resztę inozyny lub grupę fosforanową na końcu 5'	133
III.4. Analiza cząsteczki RNA zbudowanej z powtórzeń CGG, zawierającej modyfikację ^{Br} G oraz pętle.	143
III.5. Analiza cząsteczek zbudowanych z dwóch powtórzeń CGG, zawierających różne sekwencje flankujące	146
III.6. Analiza cząsteczki RNA zawierającej dodatkową grupę fosforanową na końcu 5'	167
III.7. Analiza równowag konformacyjnych cząsteczek G(CCG) _n C, G(CGG) _n C oraz G(CGG) _n C/G(CCG) _n C (n = 2-4)	169

III. OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ WŁASNYCH

Obiektem moich badań były początkowo trzy cząsteczki RNA zbudowane z dwóch powtórzeń CGG, zawierające modyfikowane reszty nukleotydydowe (8-bromoguanozynę i 8-metyloguanozynę, rys. 93) o następujących sekwencjach:

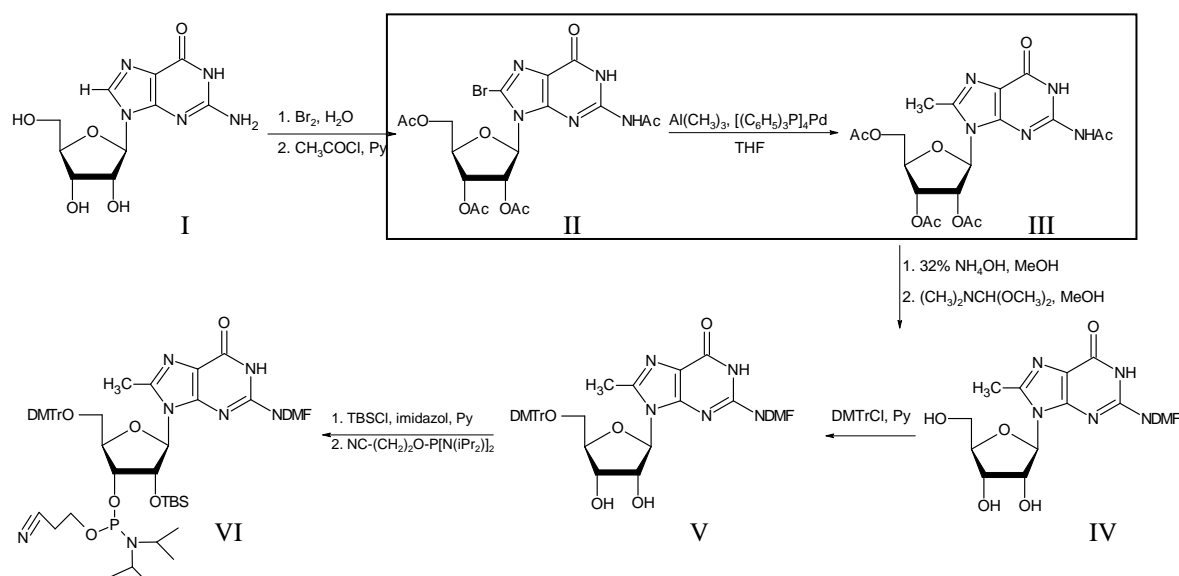


Rys. 93. Wzór strukturalny 8-bromoguanozyny, ^{Br}G (A) oraz 8-metyloguanozyny, ^{Me}G (B)

W nukleozydach purynowych obecność objętościowego podstawnika w pozycji C8 wymusza zazwyczaj konformację *syn* wokół wiązania glikozydowego (206;207). Takim podstawnikiem jest atom bromu lub grupa metylowa. Dla badań strukturalnych metodami NMR zastąpienie atomu wodoru atomem bromu nie jest optymalne, ponieważ w ten sposób traci się niezwykle cenne informacje o oddziaływaniach dipolowych w najbardziej interesującym fragmencie cząsteczki. Dużo lepszym modelem do badań metodami spektroskopii NMR jest cząsteczka zawierająca modyfikację ^{Me}G, gdyż obecność grupy metylowej w pozycji C8 pozwala na uzyskanie niezbędnych więzów strukturalnych.

III.1 Synteza i analiza NMR nukleozydów modyfikowanych w pozycji C8

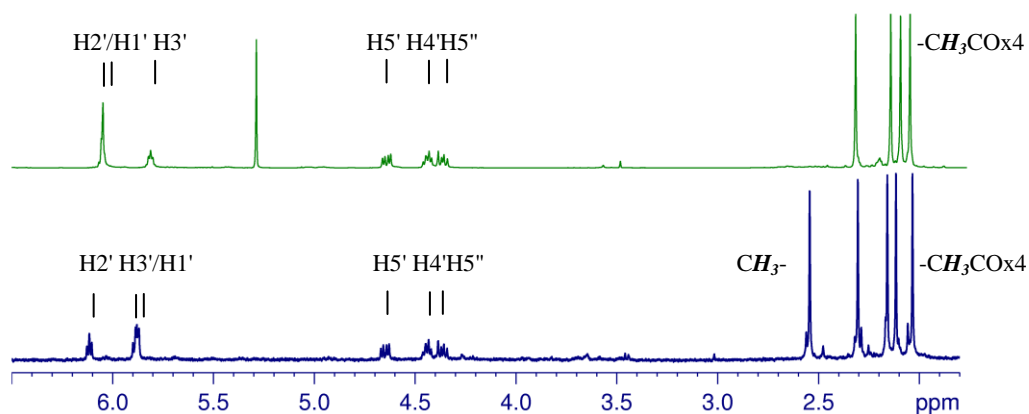
Kluczowy dla moich badań związek 2',3',tri-O-acetylo-N2-acetylo-8-metyloguanozynę (III) otrzymałam według schematu przedstawionego na rys. 94.



Rys. 94. Szlak syntezy chemicznej 3'-O-amidofosorynu 5'-O-dimetoksytrytylo-2'-O-terbutylodimetylsililo-2N-((dimetyloamino)metyleno)-8-metyloguanozyny (VI)

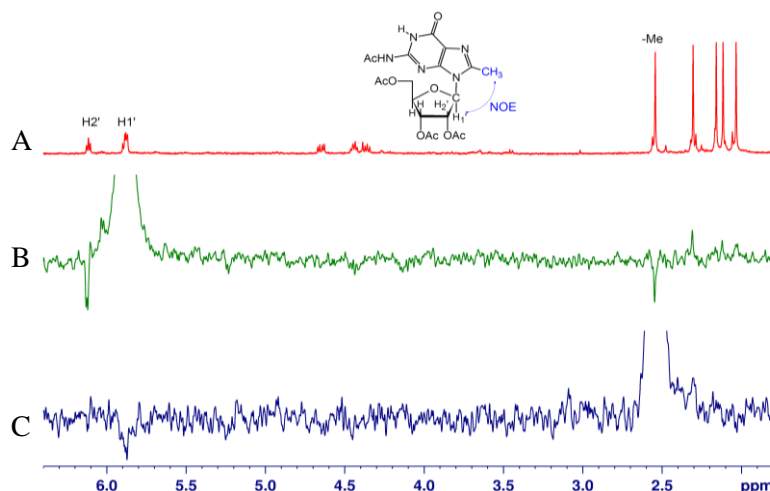
Synteza 3'-O-amidofosforynu 5'-O-dimetoksytrytylo-2'-O-tertbutylodimetylsililo-2N-((dimetyloamino)metyleno)-8-metyloguanozyny (VI) przebiegała wieloetapowo i wymagała selektywnego blokowania grup funkcyjnych nukleozydu. Punktem wyjścia do otrzymania związku **III** była 8-bromoguanozyna, którą otrzymuje się standardowo (208). Efektywne podstawienie atomu bromu grupą metylową wymagało użycia wysokiej czystości, całkowicie bezwodnego tetrahydrofuranu (THF) firmy Aldrich. Typowa, powszechnie stosowana w chemii organicznej metoda osuszania THF poprzez ogrzewanie z metalicznym sodem w obecności wskaźnika benzofenonu nie była wystarczająco dobrą metodą dla potrzeb tej reakcji. Zamiast 8-bromoguanozyny w reakcji tej użyłam 2',3',tri-O-acetylo-N2-acetylo-8-bromoguanozynę oraz zastosowałam inny niż w cytowanej metodzie katalizator palladowy (str. 193) (209).

Po oczyszczeniu surowego produktu ($\text{Ac}_4\text{G}^{\text{Me}}$, związek **III**) na kolumnie chromatograficznej widmo ^1H NMR wykazało (rys. 95), że związek **III** nie był już zanieczyszczony substratem ($\text{Ac}_4\text{G}^{\text{Br}}$, związek **II**).



Rys. 95. Widma ^1H NMR związków **II** oraz **III**

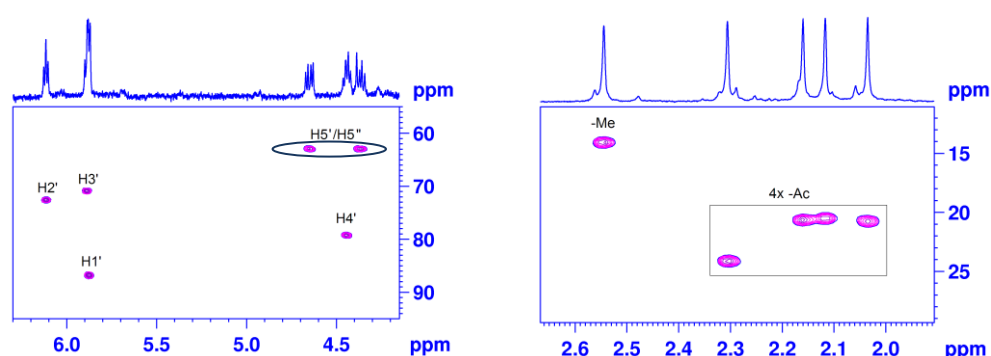
Wykorzystując technikę 1D NOE potwierdziłam, że objętościowy podstawnik w pozycji C8 wymusza konformację *syn* dla cząsteczki $\text{Ac}_4\text{G}^{\text{Me}}$ (rys. 96).



Rys. 96. Referencyjne widmo ^1H NMR cząsteczki $\text{Ac}_4\text{G}^{\text{Me}}$ (A), Widmo 1D NOE, w którym selektywnie naświetlano proton $\text{H1}'$ - wzmocnieniu uległ sygnał od atomu $\text{H2}'$ oraz sygnał od atomów wodoru grupy metylowej (B). Widmo 1D NOE, w którym selektywnie naświetlane były atomy wodoru grupy metylowej - wzmocnieniu uległ sygnał od atomu $\text{H1}'$ (C)

Selektywne napromieniowanie atomu H1' lub atomów wodoru grupy -CH₃ powodowało zmianę intensywności sygnałów atomów wodoru oddziałujących z jądrem napromieniowywanym, odpowiednio atomów wodoru grupy -CH₃, H2' (rys. 96 B) i atomu H1' (rys. 96 C). Odległość między tymi atomami nie może być zatem większa niż 4 Å. Napromieniowanie atomów wodoru grupy -CH₃ nie powodowało zmiany intensywności sygnału H2', co oznaczało, że w cząsteczce Ac₄G^{Me} grupa metylowa znajduje się w odległości większej niż 4 Å od atomu H2'. Jest to możliwe tylko wtedy, gdy cząsteczka Ac₄G^{Me} przyjmuje konformację *syn*.

Przypisania sygnałów pochodzących od atomów wodoru reszty cukrowej, grupy metylowej oraz grup ochronnych -OAc dla blokowanych rybonukleozydów **II** i **III** dokonałam na podstawie analizy przesunięć chemicznych atomów węgla w widmach ¹H-¹³C HSQC (rys. 97, 98).



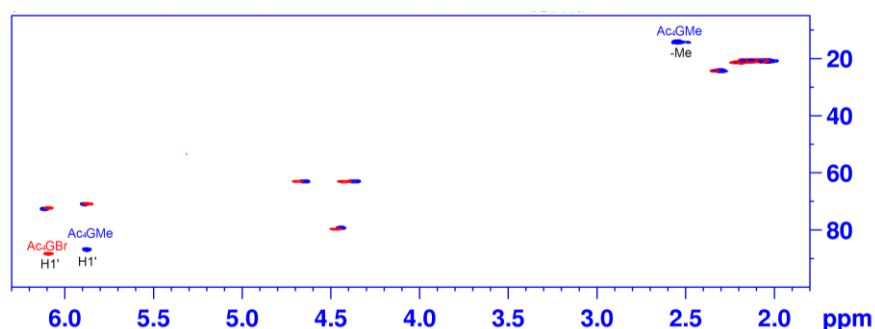
Rys. 97. Fragmenty widma ¹H-¹³C HSQC cząsteczki Ac₄G^{Me} wraz z przypisaniami

Przesunięcia chemiczne ¹H i ¹³C NMR dla pierścieni cukrowych cząsteczek **II** i **III** podane są w tabeli 15. Według reguły Remina i Shugara (210) przyjąłam, że prochiralne atomy H5'' (pro-R) leżą przy mniejszych wartościach ppm niż prochiralne atomy H5' (pro-S).

Tabela. 15. Przesunięcia chemiczne ¹H i ¹³C NMR półproduktów **II** i **III** [ppm]

Nukleozyd	H ₁ '	C1'	H ₂ '	C2'	H ₃ '	C3'	H ₄ '	C4'	H ₅ '/H ₅ ''	C5'	-CH ₃	-CH ₃
II Ac ₄ G ^{Br}	6.08	88.2	6.08	72.3	5.86	70.7	4.46	79.6	4.68, 4.40	62.9	-	-
III Ac ₄ G ^{Me}	5.87	86.7	6.12	72.5	5.89	70.9	4.44	79.2	4.65, 4.37	62.9	2.55	14.1

Przesunięcia chemiczne sygnałów H1' w związkach **II** i **III** różnią się o 0.21 ppm. Efekt ten może być zarówno wynikiem wpływu różnych podstawników w pozycji C8, jak również różnic konformacyjnych wokół wiązania N-glikozydowego.



Rys. 98. Porównanie przesunięć chemicznych związków Ac₄G^{Me} oraz Ac₄G^{Br} w widmie ¹H-¹³C HSQC. Zaznaczone są sygnały korelacyjne H1'-C1' dla obu związków oraz sygnał od grupy metylowej.

III.2. Analiza cząsteczek RNA zawierających modyfikowane reszty ^{Br}G oraz ^{Me}G

W wyniku wzajemnej asocjacji cząsteczek zbudowanych z powtórzeń CGG oprócz par zasad G:C typu Watsona-Cricka mogą powstawać także niekanoniczne pary zasad G:G. Z uwagi na możliwe występowanie w roztworze uśrednienia konformacyjnego pomiędzy parami G(*syn*):G(*anti*) oraz G(*anti*):G(*syn*), ten typ niedopasowania jest bardzo trudny do analizy metodami spektroskopii NMR. Z doświadczenia naszej pracowni było wiadomo, iż jeśli jedna z reszt guanozyny w obrębie pary G:G jest usztywniona w konformacji *syn*, to możliwe są do osiągnięcia stabilne wiązania wodorowe pomiędzy takimi resztami. Taką nietypową dla RNA formę *syn* przyjmuje reszta 8-bromoguanozyny. W strukturze krystalograficznej dupletu o sekwencji (G-C^{Br}GGCGG-C)₂ uczestniczy ona w tworzeniu pary zasad ^{Br}G(*syn*):G(*anti*) (1). Dla cząsteczek o sekwencjach **1** i **2** zastąpienie jednej z reszt guanozyny w parze G:G 8-bromoguanozyną (^{Br}G) znacznie podwyższa ich trwałość termodynamiczną (205). Okazało się, że również obecność ^{Me}G w cząsteczce **3** prowadzi do powstania stabilnych struktur. Przeprowadzone przeze mnie pomiary termodynamiczne (tab. 16) pokazały, iż ^{Me}G tworzy mniej stabilne struktury niż cząsteczka **1**, niezależnie od stężenia jonów sodu. W 1M NaCl różnica temperatur topnienia pomiędzy cząsteczkami **1** i **3** wynosi 9°C. W warunkach stosowanych zazwyczaj do pomiarów NMR (150 mM NaCl) różnica ta wynosi ~ 6°C.

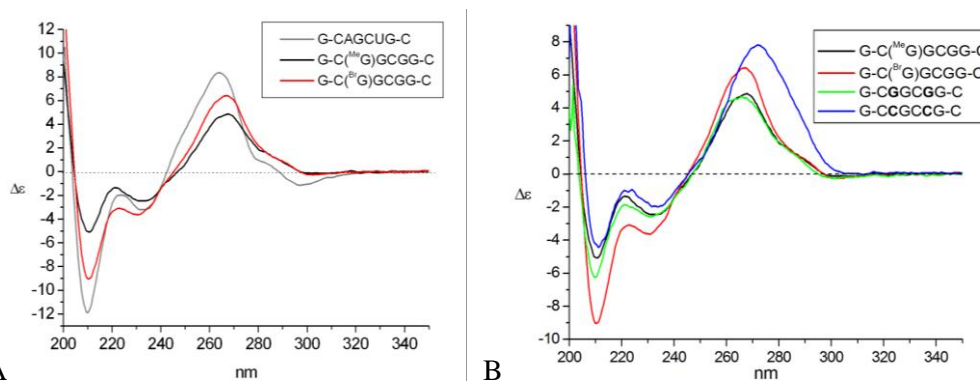
W celu poznania struktury cząsteczek zawierających modyfikacje ^{Br}G oraz ^{Me}G wykorzystałam takie metody jak dichroizm kołowy (CD), analiza absorpcyjnych widm różnicowych (TDS), analiza profilu migracji cząsteczek RNA w żelu poliakrylamidowym, spektroskopia NMR oraz spektrometria mas.

Tabela. 16. Parametry termodynamiczne cząsteczek **1** i **2**, zawierających modyfikowane reszty ^{Me}G i ^{Br}G.

Sekwencja RNA	stężenie NaCl ^x	Średnia dopasowania krzywych topnienia				Wykres zależności T _M ⁻¹ od log C _T					
		-ΔH° (kcal/mol)	-ΔS° (eu)	-ΔG° ₃₇ (kcal/mol)	T _M (°C)	-ΔH° (kcal/mol)	-ΔS° (eu)	-ΔG° ₃₇ (kcal/mol)	T _M (°C)	ΔΔG° ₃₇ (kcal/mol)	ΔT _M (°C)
Parametry termodynamiczne cząsteczek zawierających modyfikowane reszty guanozyny ^{Me} G lub ^{Br} G											
G-C ^{Me} GGCGG-C (1)a	1M NaCl	70.98±8.37	202.68±25.83	8.12±0.44	48.1	52.62±6.87	145.28±21.47	7.56±0.28	48.5	2a-1a: -2.9	2a-1a: 9.2
G-C ^{Me} GGCGG-C (1)b	0.15M NaCl	83.98±15.12	248.39±48.46	6.94±0.15	41.7	76.13±4.66	223.12±14.81	6.92±0.07	42.2	2b-1b: -1.6	2b-1b: 6.2
G-C ^{Me} GGCGG-C (1)c	-	75.49±8.61	229.60±28.83	4.28±0.51	31.4	87.63±15.37	269.85±35.1	3.94±0.34	31.0	2c-1c: -1.7	2c-1c: 5.9
G-C ^{Br} GGCGG-C (2)a	1M NaCl	98.70±5.00	280.90±15.40	11.53±0.24	56.6	76.40±3.20	212.70±9.60	10.45±0.33	57.7		
G-C ^{Br} GGCGG-C (2)b	0.15M NaCl	84.18±16.42	243.30±50.96	8.72±0.62	48.6	79.11±5.62	227.70±17.46	8.49±0.20	48.4		
G-C ^{Br} GGCGG-C (2)c	-	74.81±7.76	222.90±24.87	5.67±0.17	37.0	75.69±10.45	225.81±33.81	5.65±0.23	36.9		

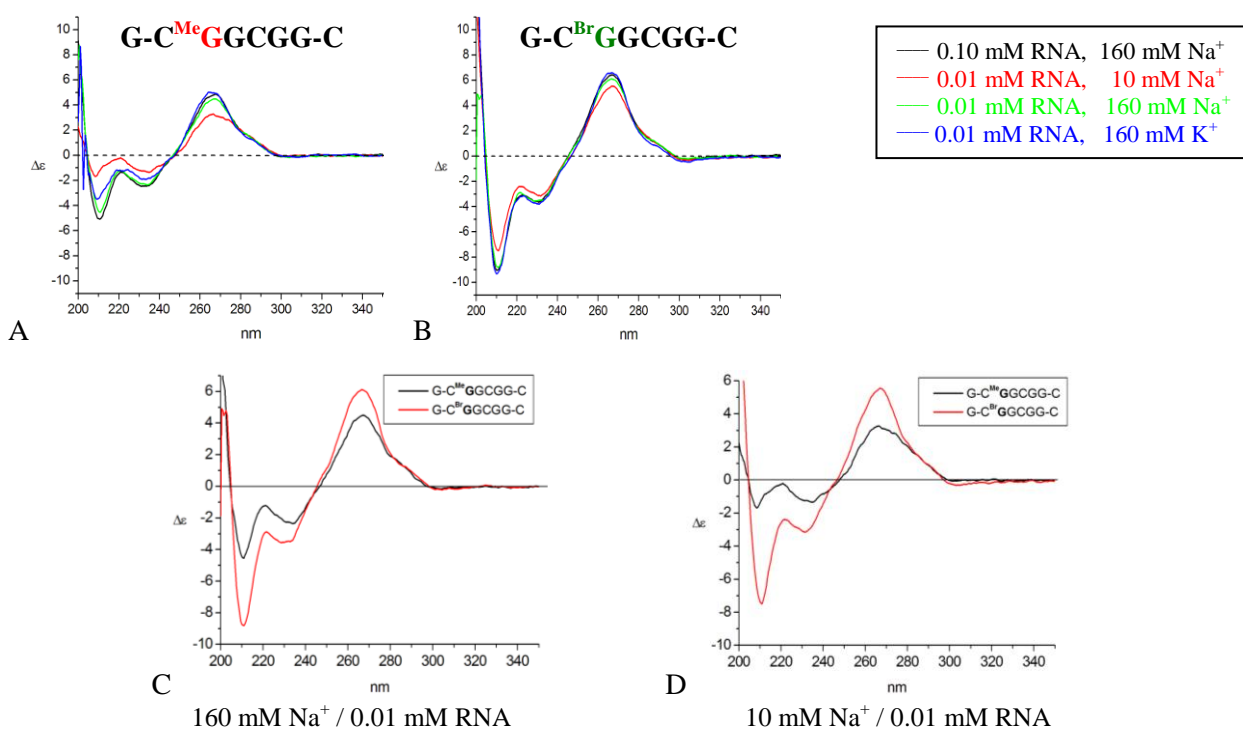
x – bufor podstawowy zawiera, 20 mM kakodylan sodu, 0.5 mM EDTA, pH 7

Na rysunku 99 zestawione są widma CD cząsteczek $G-C^{Br}GGCGG-C$ oraz $G-C^{Me}GGCGG-C$ z widmem wzajemnie komplementarnego dupleksu o sekwencji G-CAGCUG-C (99 A) oraz z widmem oktamerów $G-CGCGG-C$ i $G-CCGCGG-C$ (99 B). Warunki, w których wykonałam widma podane są pod rysunkami. Kształt krzywych oraz położenie poszczególnych pasm dla tych cząsteczek są charakterystyczne dla widm CD dupleksów RNA (rys. 69 C).



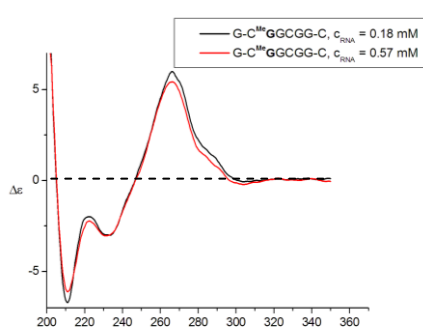
Rys. 99. Porównanie widm CD cząsteczek RNA (~ 0.01 mM) o sekwencjach zasad podanych w legendzie. [150 mM NaCl, 10 mM bufor fosforanowy, 0.1 mM EDTA]

Z kolei na rysunku 100 przedstawiłam zmiany obserwowane w widmach CD w zależności od stężenia i typu soli (NaCl lub KCl) oraz stężenia RNA. Widma CD dla $G-C^{Br}GGCGG-C$ niewiele zmieniały się w zależności od warunków roztworu (rys. 100 B), znacznie mniej niż dla cząsteczki zawierającej modyfikację ^{Me}G (rys. 100 A). Jedynie dla 10 mM stężenia kationów Na^+ amplituda pasm przy ~ 260 nm oraz ~ 210 nm dla cząsteczki **3** była wyraźnie niższa niż w widmach CD zarejestrowanych w pozostałych warunkach (rys. 100 A, kolor czerwony).



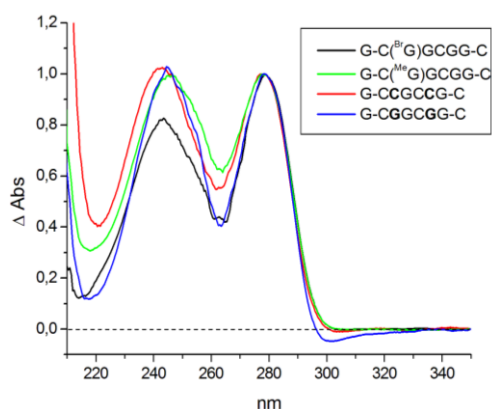
Rys. 100. Zależność widm CD od: stężenia RNA, stężenia i typu soli (NaCl lub KCl) (A, B), typu modyfikacji (C, D) dla cząsteczek $G-C^{Me}GGCGG-C$ oraz $G-C^{Br}GGCGG-C$.

Niezależnie od stężenia kationów sodu widma CD cząsteczek **1** i **3** różnią się między sobą głównie amplitudą poszczególnych pasm (rys. 100 C, D). Oznacza to, że cząsteczka **3** w mniejszych stężeniach soli jest mniej ustrukturalizowana od cząsteczki **1**. Jednak dla obu cząsteczek obserwowaliśmy pasma przy takich samych długościach fal, co sugerowało, iż dominująca konformacja cząsteczki **3** jest taka sama jak cząsteczki **1**. W zakresie stężeń RNA porównywalnych do tych stosowanych w spektroskopii NMR (~ 0.6 mM), widmo CD cząsteczki G-C^{Me}GGCGG-C nie zmieniało się, co wskazywało, że dalszy wzrost stężenia RNA nie wpływał znacząco na strukturę powstającą w roztworze (rys. 101).



Rys. 101. Zależność widm CD od stężenia G-C^{Me}GGCGG-C, [150 mM NaCl, 10 mM fosforan sodu, 0.1 mM EDTA].

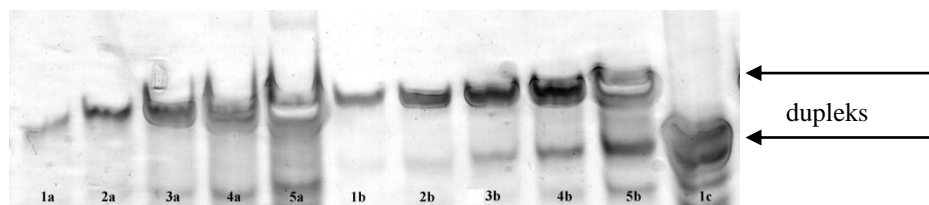
Aby uzyskać więcej informacji o typie zawiązujących się w roztworze struktur wykonałam serię różnicowych widm UV. Widma TDS przypominają swoim wyglądem te, które uważa się za charakterystyczne dla struktur dupleksów (rys. 102). Chociaż dla cząsteczki zawierającej modyfikację ^{Br}G pasmo przy 240 nm ma znacznie niższą intensywność niż dla innych oktamerów, to kształty krzywych TDS cząsteczek G-C^{Me}GGCGG-C i G-CGGCGG-C są bardzo zbliżone. Jedynie w widmie TDS cząsteczki G-CCGCCG-C, pasmo przy 240 nm jest nieznacznie przesunięte w kierunku krótszych długości fali.



Rys. 102. Porównanie różnicowych widm absorpcyjnych cząsteczek: G-C^{Br}GGCGG-C, G-C^{Me}GGCGG-C, G-CGGCGG-C oraz G-CCGCCG-C, [150 mM NaCl, 10 mM fosforan sodu, 0.1 mM EDTA].

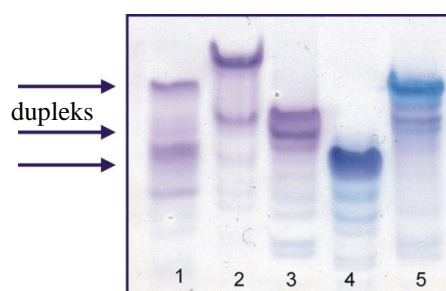
Zaobserwowanie różnic w widmach TDS (rys. 102) oraz CD (rys. 100 C) cząsteczek zawierających modyfikacje ^{Br}G i ^{Me}G było nieoczekiwane. Największe zmiany obserwowaliśmy

w widmach CD zarejestrowanych dla niskich stężeń kationów Na^+ (rys. 100 D). Na podstawie samych widm UV i CD nie mogłam jednoznacznie odpowiedzieć na pytanie, czy różnice w intensywności poszczególnych pasm wynikały z przyjmowania przez te cząsteczki odmiennych struktur. Aby uzyskać dodatkowe informacje o strukturze tych cząsteczek postanowiłam wykorzystać inne techniki eksperymentalne. Jako pierwszą zastosowałam analizę profilu migracji RNA w żelu poliakrylamidowym w warunkach niedenaturujących. Na rysunku 103 przedstawiłam eksperyment, w którym porównałam migrację cząsteczek $\text{G-C}^{\text{Me}}\text{GGCGG-C}$ (**3**) (pasma 1a-5a) oraz $\text{G-C}^{\text{Br}}\text{GGCGG-C}$ (**1**) (pasma 1b-5b) w zależności od stężenia RNA. Jako cząsteczkę referencyjną zastosowałam oktamer G-CGGCGG-C (**12**). Niespodziewanie okazało się, że cząsteczki zawierające modyfikacje $^{\text{Me}}\text{G}$ i $^{\text{Br}}\text{G}$ migrują znacznie wolniej niż cząsteczka referencyjna. Dodatkowo widoczne były słabe pasma, które w przypadku cząsteczki **1** migrowały podobnie, a w przypadku cząsteczki **3** szybciej, niż cząsteczka **12**. Sugerowało to, że zarówno $\text{G-C}^{\text{Me}}\text{GGCGG-C}$ jak i $\text{G-C}^{\text{Br}}\text{GGCGG-C}$ mogą przyjmować alternatywne formy obok spodziewanej struktury dupleksu. Dla cząsteczki G-CGGCGG-C obserwowałam dwa pasma o podobnej szybkości migracji (rys. 103, pasmo 1c, 104, pasmo 3). Uzyskane wyniki pokazały, że dla większych stężeń RNA dominujące formy oktamerów $\text{G-C}^{\text{Me}}\text{GGCGG-C}$ i $\text{G-C}^{\text{Br}}\text{GGCGG-C}$ są różne od tej jaką przyjmuje cząsteczka G-CGGCGG-C . Ponieważ na podstawie analizy otrzymanego żelu nie można było jednoznacznie stwierdzić, z jaką równowagą miałam do



Rys. 103. Profil migracji w żelu natywnym 15% (277 K) w zależności od stężenia RNA. Pasma 1a-5a: $\text{G-C}^{\text{Me}}\text{GGCGG-C}$, pasma 1b-5b: $\text{G-C}^{\text{Br}}\text{GGCGG-C}$, pasmo 1c: G-CGGCGG-C , [150 mM NaCl, 10 mM fosforan sodu, 0.1 mM EDTA].

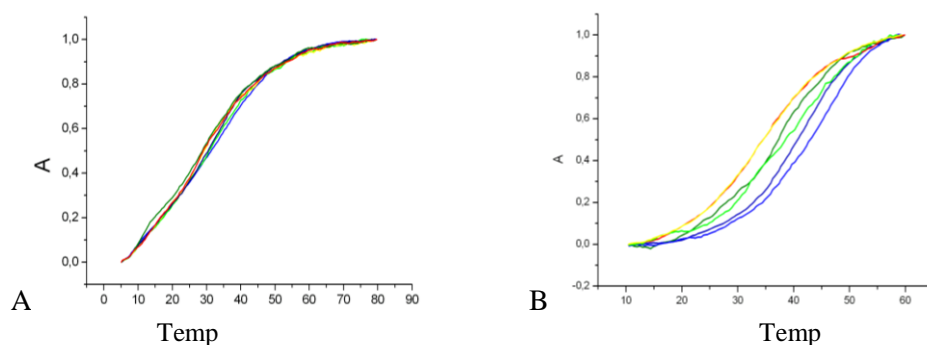
czynienia, wykonałam kolejny eksperyment, w którym porównałam szybkość migracji większej liczby oktamerów o sekwencjach kolejno: $\text{G-C}^{\text{Me}}\text{GGCGG-C}$, $\text{G-C}^{\text{Br}}\text{GGCGG-C}$, G-CGGCGG-C , G-CCGCCG-C oraz złane w równomolowym stosunku cząsteczki zawierające powtórzenia CCG i CGG, które powinny utworzyć całkowicie komplementarny dupleks: 5'- G-CGGCGG-C /5'- G-CCGCCG-C (rys. 104).



1. G-C^{Me}GGCGG-C
2. G-C^{Br}GGCGG-C
3. G-CGGCGG-C
4. G-CCGCCG-C
5. G-CGGCGG-C/G-CCGCCG-C

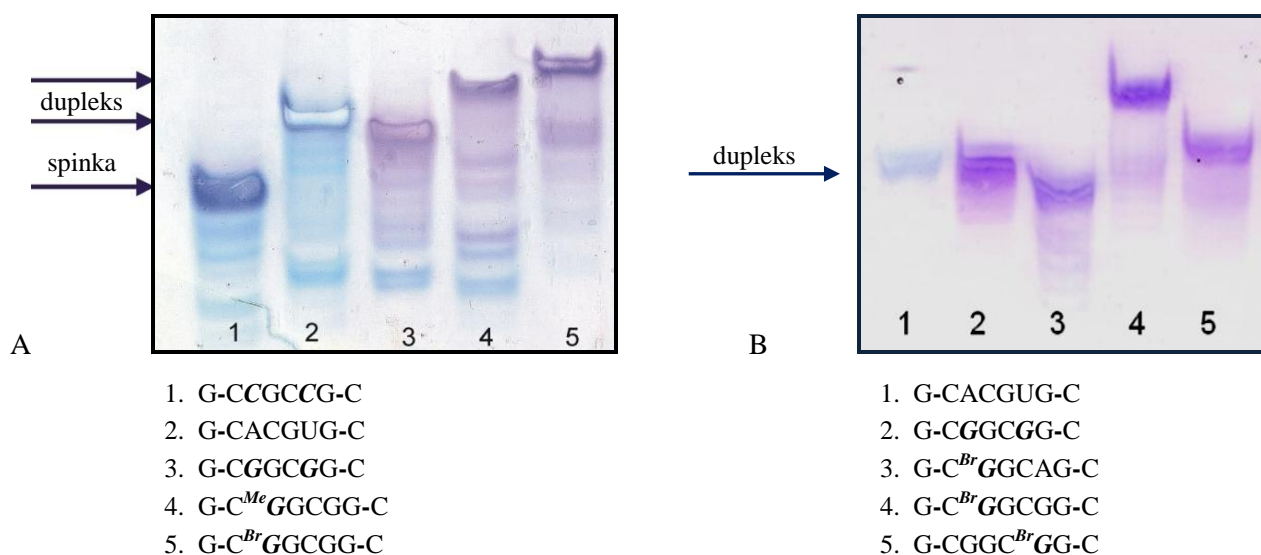
Rys. 104. Porównanie profilu migracji w żelu natywnym 15% (277 K), [150 mM NaCl, 10 mM fosforan sodu, 0.1 mM EDTA].

Również i tym razem uzyskałam niejednoznaczną odpowiedź. Częsteczki zawierające modyfikacje ^{Br}G i ^{Me}G oraz 5'-G-CGGCGG-C/5'-G-CCGCCG-C odpowiadają pasmom migrującym najwolniej, natomiast cząsteczka zbudowana z powtórzeń CCG migruje najszybciej, a zbudowana z powtórzeń CGG z szybkością pośrednią. Gdyby cząsteczka zbudowana z nici 5'-G-CGGCGG-C/5'-G-CCGCCG-C rzeczywiście tworzyła oczekiwaną strukturę duplektu oznaczałoby to, że w roztworze cząsteczka o sekwencji G-CGGCGG-C przyjmuje strukturę spinki. Pozostawało więc pytanie, jaką strukturę posiadała w tych warunkach cząsteczka zbudowana z powtórzeń CCG? Poszukując dodatkowych informacji o strukturze tych cząsteczek wykonałam pomiary temperatury topnienia wykorzystując spektroskopię UV w zależności od stężenia RNA (w obecności 0.15 mM NaCl lub 1M NaCl). Cząsteczka G-CCGCCG-C w roztworze zawierającym 0.15 mM NaCl nie była wystarczająco trwała aby można było uzyskać prawidłowy przebieg krzywych topnienia. Dla cząsteczki G-CCGCCG-C zaobserwowałam jedynie niewielką zależność temperatury topnienia od stężenia RNA, co wskazywało, że cząsteczka ta w badanym zakresie stężeń i w 10 mM buforze fosforanowym z dodatkiem 1 M NaCl przyjmuje strukturę spinki (rys. 105 A). Z kolei zależność temperatury topnienia od stężenia RNA dla cząsteczki G-CGGCGG-C wskazywała, że dominującą jej formą jest najprawdopodobniej struktura duplektu (rys. 105 B).



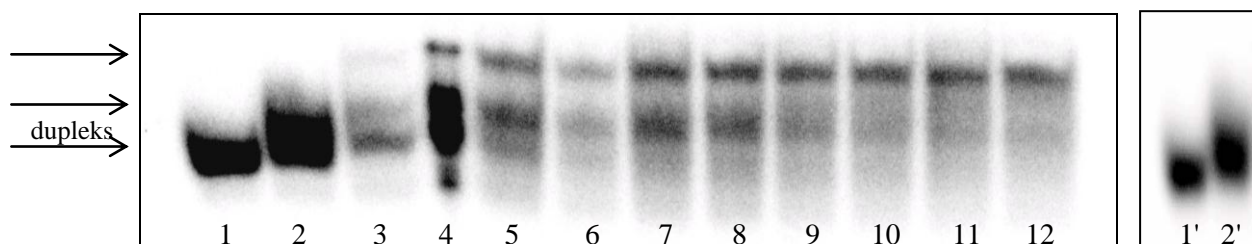
Rys. 105. Krzywe topnienia dla G-CCGCCG-C (10 mM fosforan sodu, 1 M NaCl) oraz G-CGGCGG-C (10 mM fosforan sodu, 0.15 M NaCl) w zależności od sześciu stężeń RNA, w zakresie 10^{-4} - 10^{-6} M.

Biorąc pod uwagę wyniki otrzymane z analizy widm UV i z porównania profili migracji w żelach natywnych założyłam, że jeśli cząsteczka G-CCGCCG-C tworzy strukturę spinki, G-CGGCGG-C migruje jak dupleks, to cząsteczki zawierające modyfikacje ^{Me}G i ^{Br}G oraz cząsteczka G-CGGCGG-C/G-CCGCCG-C tworzą prawdopodobnie struktury zbudowane z więcej niż dwóch nici i dlatego migrują w żelu wolniej w stosunku do dupleksu. Sugerowało to, że być może w roztworze dwa dupleksy RNA asocjują tworząc struktury czteroniciowe. Aby wykluczyć możliwość złej interpretacji wyników analizowanych żeli, otrzymałam dodatkowo inne oktamermy o sekwencjach G-CACGUG-C oraz G-C^{Br}GGCAG-C. W żelu poliakrylamidowym, w warunkach natywnych, cząsteczka o sekwencji wzajemnie komplementarnego dupleksu G-CACGUG-C, która nie zawierała powtórzeń trójnukleotydowych CGG czy CCG, migrowała jak cząsteczka C-CGGCGG-C (rys. 106). Także oktamermy o sekwencji G-C^{Br}GGCAG-C oraz G-CGGC^{Br}GG-C migrowały z szybkością porównywalną do dupleksu.



Rys. 106. Porównanie profilu migracji w 15% żelu natywnym cząsteczek RNA o sekwencjach podanych pod rysunkami [277 K, 150 mM NaCl, 10 mM fosforan sodu, 0.1 mM EDTA].

Zdolność cząsteczek **1** i **3** do asocjacji powinna silnie zależeć od stężenia RNA, postanowiłam więc przeprowadzić eksperyment, w którym do cząsteczki znakowanej radioaktywnym izotopem ³²P na końcu 5' dodawałam cząsteczkę pozbawioną radioaktywności. Pozwoliłoby mi to na przebadanie szerokiego zakresu stężeń RNA. Eksperymenty te dały jednak znowu niejednoznaczne wyniki. Okazało się mianowicie, że obecność dodatkowej, obdarzonej ładunkiem ujemnym grupy fosforanowej wpływa na istniejące równowagi konformacyjne oraz na szybkość migracji oligomerów. Cząsteczki G-C^{Br}GGCGG-C (rys. 107) oraz G-C^{Me}GGCGG-C (rys. 108) wyznakowane izotopem ³²P tworzą główne konformery w innym stosunku ilościowym, niż te same sekwencje bez dodatkowej grupy fosforanowej na końcu 5'.

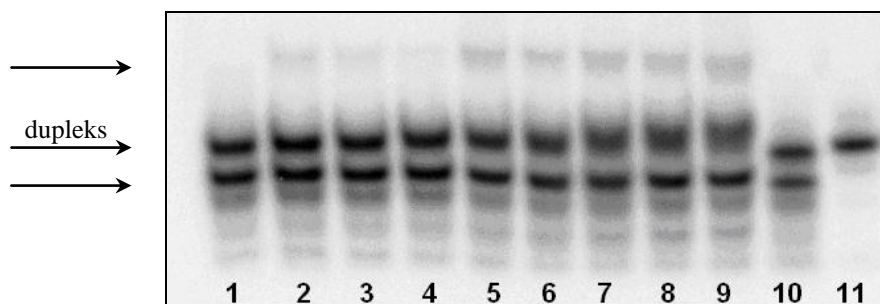


pasmo 1-3, 5-12: 150 mM NaCl, 4: 150 mM KCl

1. $^{32}\text{p-G-CGGCGG-C}$	-	7. $^{32}\text{p-G-C}^{Br}\text{GGCGG-C}$	+ 0.016 OD RNA
2. $^{32}\text{p-G-CGGCGG-C}$	+ 0.5 OD RNA	8. $^{32}\text{p-G-C}^{Br}\text{GGCGG-C}$	+ 0.03 OD RNA
3. $^{32}\text{p-G-C}^{Br}\text{GGCGG-C}$	-	9. $^{32}\text{p-G-C}^{Br}\text{GGCGG-C}$	+ 0.06 OD RNA
4. $^{32}\text{p-G-C}^{Br}\text{GGCGG-C (KCl)}$	-	10. $^{32}\text{p-G-C}^{Br}\text{GGCGG-C}$	+ 0.125 OD RNA
5. $^{32}\text{p-G-C}^{Br}\text{GGCGG-C}$	+ 0.004 OD RNA	11. $^{32}\text{p-G-C}^{Br}\text{GGCGG-C}$	+ 0.25 OD RNA
6. $^{32}\text{p-G-C}^{Br}\text{GGCGG-C}$	+ 0.008 OD RNA	12. $^{32}\text{p-G-C}^{Br}\text{GGCGG-C}$	+ 0.5 OD RNA

1', 2' - pasma 1 i 2, ale pokazane przy mniejszej intensywności

Rys. 107. Porównanie profilu migracji różnych cząsteczek RNA w 15% żelu natywnym [277 K, 150 mM NaCl, 10 mM fosforan sodu, 0.1 mM EDTA].



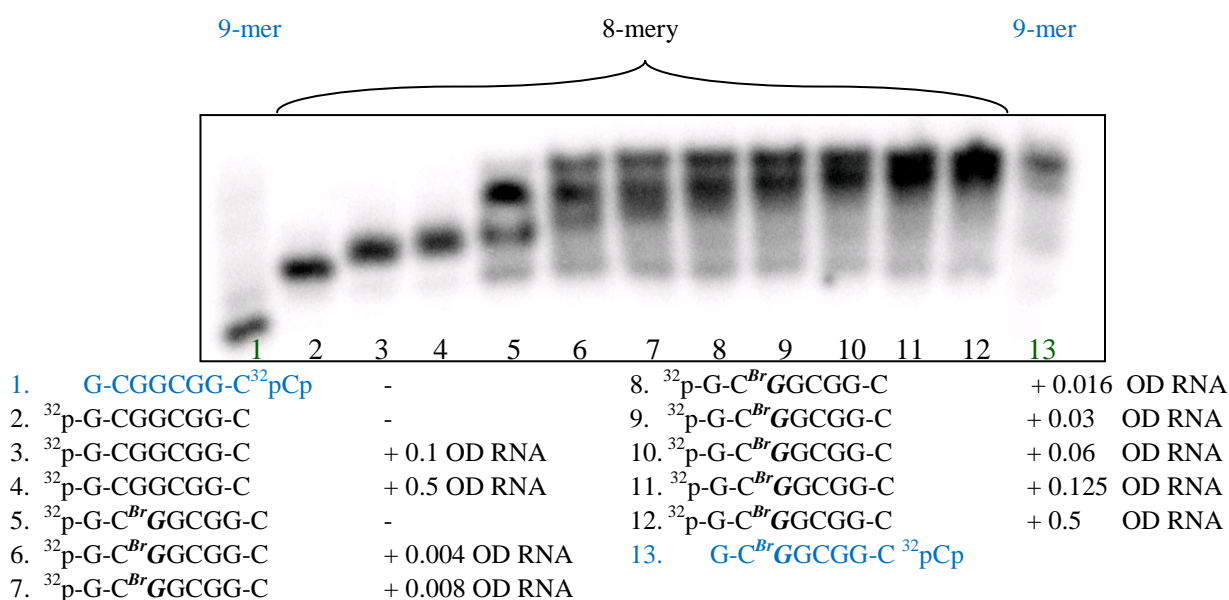
1. $^{32}\text{p-G-C}^{Me}\text{GGCGG-C}$	-	7. $^{32}\text{p-G-C}^{Me}\text{GGCGG-C}$	+ 0.125 OD RNA
2. $^{32}\text{p-G-C}^{Me}\text{GGCGG-C}$	+ 0.004 OD RNA	8. $^{32}\text{p-G-C}^{Me}\text{GGCGG-C}$	+ 0.25 OD RNA
3. $^{32}\text{p-G-C}^{Me}\text{GGCGG-C}$	+ 0.008 OD RNA	9. $^{32}\text{p-G-C}^{Me}\text{GGCGG-C}$	+ 0.5 OD RNA
4. $^{32}\text{p-G-C}^{Me}\text{GGCGG-C}$	+ 0.016 OD RNA	10. $^{32}\text{p-G-C}^{Me}\text{GGCGG-C}$	-
5. $^{32}\text{p-G-C}^{Me}\text{GGCGG-C}$	+ 0.03 OD RNA	11. $^{32}\text{p-G-CGGCGG-C}$	-
6. $^{32}\text{p-G-C}^{Me}\text{GGCGG-C}$	+ 0.06 OD RNA		

Rys. 108. Porównanie profilu migracji różnych cząsteczek RNA w 15% żelu natywnym [277 K, 150 mM NaCl, 10 mM fosforan sodu, 0.1 mM EDTA].

Dla znakowanych radioizotopem ^{32}P cząsteczek $\text{p-G-C}^{Br}\text{GGCGG-C}$ oraz $\text{p-G-C}^{Me}\text{GGCGG-C}$ wykonałam wiele eksperymentów, jednak na ich podstawie mogłam wyciągnąć jedynie ogólne wnioski dotyczące dynamiki przejść pomiędzy poszczególnymi formami. Szybkość migracji dupleksu pG-CGGCGG-C nie zależy od stężenia RNA (rysunek 107, pasmo 1-2; 109, pasmo 2-4), natomiast dla cząsteczki o sekwencji $\text{p-G-C}^{Br}\text{GGCGG-C}$ zaobserwowałam tworzenie się trzech różnych form w zależności od stężenia RNA (rysunek 107, 109). Po przyłączeniu dodatkowej grupy fosforanowej na końcu 5' oligomer $\text{pG-C}^{Me}\text{GGCGG-C}$ tworzy również trzy konformery, lecz w innym niż cząsteczka 3 stosunku ilościowym. Dla niskich stężeń oligomeru $\text{p-G-C}^{Me}\text{GGCGG-C}$ preferowane jest prawdopodobnie powstawanie struktury spinki/formy jednoniciowej oraz dupleksu (rys. 108), a obecność dodatkowej grupy fosforanowej może wpływać zarówno na kinetykę powstawania, jak także na stabilność formy czteroniciowej (211). Jak już wcześniej wynikało

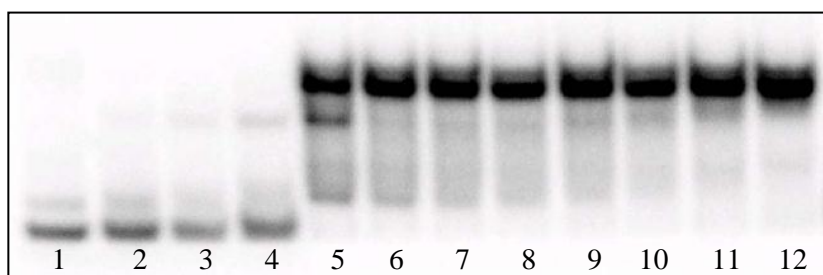
z widm CD (rys. 100 B), cząsteczka **1** z modyfikacją ^{Br}G asocjuje najłatwiej, niezależnie od warunków środowiska oraz tworzy jedną dominującą formę w roztworze.

Ponieważ znakowanie na końcu 5' wpływa na równowagi konformacyjne badanych przezemnie oktamerów, chciałam sprawdzić jaki efekt na szybkość migracji będzie miało znakowanie na końcu 3'. Radioizotopowe znakowanie końca 3' polega na przyłączeniu dodatkowej reszty cytydyny [5'-³²P] pCp do grupy 3'-OH terminalnej reszty nukleotydowej. Okazało się, że cząsteczki wyznakowane na końcu 3' tworzą jedną, dominującą konformację, niezależnie od stężenia RNA (rys. 110). Cząsteczka 9-meru o sekwencji G-CGGCGG-C³²pCp migruje znacznie szybciej niż cząsteczka ³²p-G-CGGCGG-C (rys. 109, pasmo 1 i 2). Sposób znakowania nie wpływa natomiast na szybkość migracji głównego pasma pochodzącego od cząsteczki G-C^{Br}GGCGG-C (rys. 109, pasmo 5-13, rys. 110).



Rys. 109. Porównanie profilu migracji różnych cząsteczek RNA w 15% żelu natywnym, [277 K, 150 mM NaCl, 10 mM fosforan sodu, 0.1 mM EDTA]

Porównując szybkość migracji cząsteczek G-CGGCGG-C³²pCp i ³²p-G-CGGCGG-C (rysunek 109, pasmo 1 i 2) oraz G-CGGCGG-C i G-CCGCCG-C (rys. 106 A) można zauważyć, iż różnica w szybkości migracji pomiędzy nimi jest podobna. Może to sugerować, że cząsteczka G-CGGCGG-C³²pCp zawierająca dodatkową resztę cytydyny, podobnie jak G-CCGCCG-C, przyjmuje strukturę spinki. Jednak na podstawie analizy profili migracji w żelu nie można jednoznacznie ustalić jaka forma powstaje w tych warunkach. Nie można wykluczyć również, iż cząsteczka G-CGGCGG-C³²pCp migruje w żelu jako forma nieuporządkowana. Ponieważ w przypadku znakowania na końcu 3' wprowadza się dodatkowo dwie grupy fosforanowe, ich obecność może wpływać na szybkość migracji takiej cząsteczki w żelu natywnym.



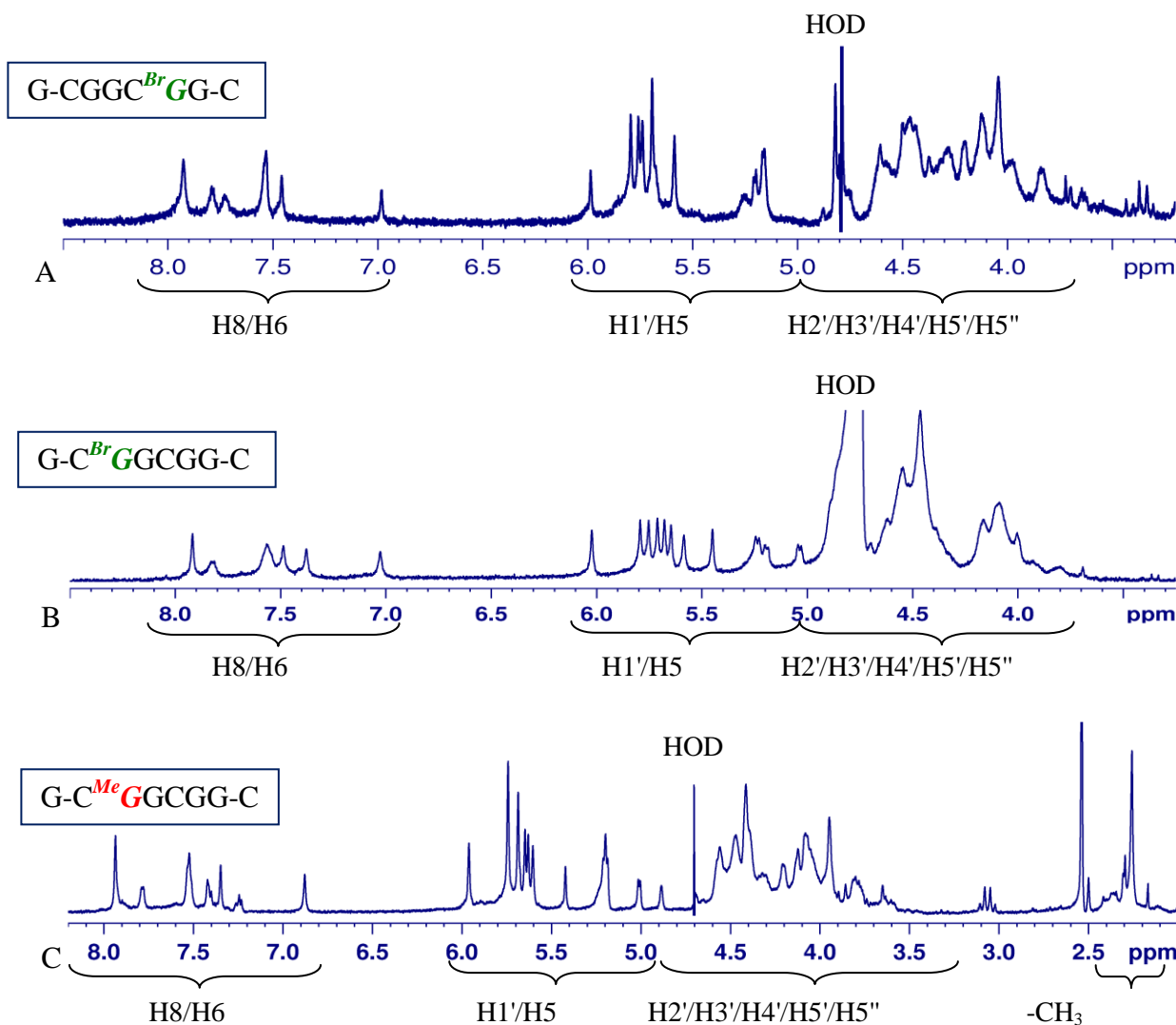
1. G-CGGCGG-C ³² pCp	-	8. G-C ^{Br} GGCGG-C ³² pCp	+ 0.016 OD RNA
2. G-CGGCGG-C ³² pCp	+ 0.06 OD RNA	9. G-C ^{Br} GGCGG-C ³² pCp	+ 0.03 OD RNA
3. G-CGGCGG-C ³² pCp	+ 0.25 OD RNA	10. G-C ^{Br} GGCGG-C ³² pCp	+ 0.06 OD RNA
4. G-CGGCGG-C ³² pCp	+ 0.5 OD RNA	11. G-C ^{Br} GGCGG-C ³² pCp	+ 0.125 OD RNA
5. G-C ^{Br} GGCGG-C ³² pCp	-	12. G-C ^{Br} GGCGG-C ³² pCp	+ 0.5 OD RNA
6. G-C ^{Br} GGCGG-C ³² pCp	+ 0.004 OD RNA	13. G-C ^{Br} GGCGG-C ³² pCp	
7. G-C ^{Br} GGCGG-C ³² pCp	+ 0.008 OD RNA		

Rys. 110. Porównanie profilu migracji różnych cząsteczek RNA znakowanych z końca 3' w 15% żelu natywnym, [277 K, 150 mM NaCl, 10 mM fosforan sodu, 0.1 mM EDTA]

Analiza wyników uzyskanych z widm UV i CD pokazała, że w zakresie niskich stężeń (10^{-6} - 10^{-4} M), w obecności kationów Na^+ , cząsteczka G-CGGCGG-C przyjmuje najprawdopodobniej strukturę dupleksu, natomiast cząsteczka o sekwencji G-CCGCCG-C tworzy strukturę spinki. Z kolei dla cząsteczek zawierających modyfikacje ^{Me}G oraz ^{Br}G widma CD, TDS oraz pomiary termodynamiczne sugerowały, że w roztworze tworzy się dupleks, jednak ich wolna migracja w natywnym żelu poliakrylamidowym mogła świadczyć o tworzeniu się struktur zbudowanych najprawdopodobniej z czterech nici. Taka czteroniciowa cząsteczka mogłaby tworzyć kwadrupleks, jednak nie potwierdziły tego widma UV, gdyż nie obserwowałam charakterystycznego dla typowych kwadrupleksów profilu topnienia przy 295 nm, ani też ujemnego pasma przy 295 nm w widmach TDS.

III.2.1. Analiza widm ¹H NMR cząsteczek RNA zawierających modyfikację ^{Br}G lub ^{Me}G

Ponieważ z widm CD, UV i z eksperymentów wykonanych z użyciem natywnych żeli poliakrylamidowych uzyskałam wyniki, których analiza nie dostarczyła jednoznacznych informacji o strukturze badanych cząsteczek, jako następną metodę wykorzystałam spektroskopię NMR. Widma ¹H NMR związków **1-3** przedstawiłam na rys. 111. Jeśli w objaśnieniu pod rysunkiem nie podałam składu buforu, oznacza to, iż użyłam buforu o składzie: 10 mM fosforan sodu, 150 mM NaCl oraz 0.1 mM EDTA. W RNA obecność grupy hydroksylowej w pozycji C2' powoduje przesunięcie sygnału H2' w kierunku pasm rezonansowych H3', H4', H5' i H5". W efekcie dochodzi do silnego skupienia sygnałów w zakresie 5.2-3.8 ppm. W widmach cząsteczek RNA **1-3** zaznaczyłam charakterystyczne zakresy spektralne.



Rys. 111. Widma ^1H NMR cząsteczek $\text{G-CGGC}^{\text{Br}}\text{GG-C}$ (A), $\text{G-C}^{\text{Br}}\text{GGCGG-C}$ (B) oraz $\text{G-C}^{\text{Me}}\text{GGCGG-C}$ (C). Na widmach zaznaczono charakterystyczne zakresy spektralne: H8/H6, H1'/H5 oraz H2'/H3'/H4'/H5'/H5''; [D_2O , 25°C]

Pomimo powtarzającego się w sekwencji motywu CGG sygnały rezonansowe pochodzące od aromatycznych i anomerycznych atomów wodoru są stosunkowo dobrze rozdzielone. Wyróżniającą cechą widm modyfikowanych cząsteczek **1-3** jest brak sygnału H8 od reszty guanozyny, ponieważ został on zastąpiony atomem bromu ($^{\text{Br}}\text{G}$) lub grupą metylową ($^{\text{Me}}\text{G}$), której sygnał znajduje się przy 2.26 ppm.

Z dwóch cząsteczek zawierających modyfikację $^{\text{Br}}\text{G}$, większość eksperymentów przeprowadziłam dla cząsteczki $\text{G-C}^{\text{Br}}\text{GGCGG-C}$. Jednakże oligomer $\text{G-CGGC}^{\text{Br}}\text{GG-C}$ badałam w takim stopniu, aby mieć pewność, iż oba związki przyjmują taką samą formę w roztworze. Analizę widm 2D przedstawię równolegle (rys. 113).

Na podstawie analizy dwuwymiarowych widm homo- i heterojądrowych (^1H - ^1H NOESY, ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{31}P HSQC) dokonałam przypisania sygnałów dla wszystkich niewymienialnych z wodą atomów wodoru (dla uproszczenia zwanych dalej po prostu niewymienialnymi atomami wodoru) dla cząsteczek **1** i **3**. Ze względu na niedoskonałość metod

wygaszania sygnału wody, w widmie ^1H - ^1H NOESY nie obserwowałam sygnału korelacyjnego C5:H1'-C5:H2' (rys. 112). Bez dodatkowych informacji z widm ^1H - ^1H COSY oraz ^1H - ^{13}C HSQC proces przypisania sygnałów dla cząsteczek **1** i **3** nie byłby możliwy. Wartości przesunięć chemicznych $\delta(^1\text{H})$ dla cząsteczek G-C^{Br}GGCGG-C oraz G-C^{Me}GGCGG-C zebrałam w tabelach **17**, **18**.

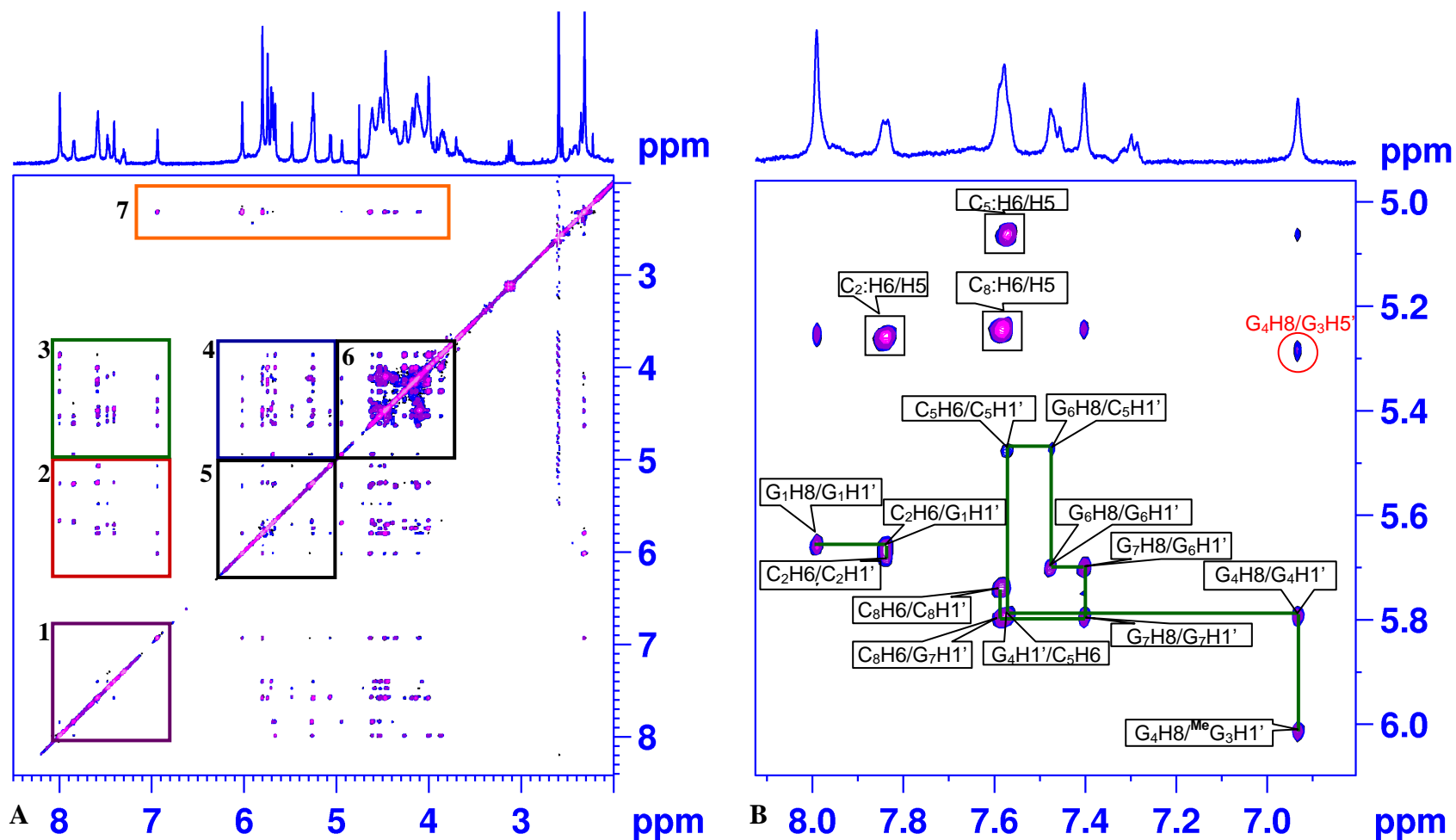
Tabela 17. Wartości przesunięć chemicznych $\delta(^1\text{H})$ dla G-C^{Br}GGCGG-C [ppm]

reszta	H8/H6	H5	H1'	H2'	H3'	H4'	H5'	H5''
G1	8.03	-	5.70	4.65	4.55	4.31	4.02	3.88
C2	7.87	5.28	5.70	4.95	4.59	4.41	4.61	4.16
G3	-	-	6.05	4.88	4.35	4.66	5.29	4.12
G4	7.05	-	5.81	4.64	4.48	4.48	4.46	4.11
C5	7.57	5.06	5.47	4.72	4.54	4.42	4.44	4.10
G6	7.50	-	5.70	4.45	4.58	4.47	4.57	4.11
G7	7.40	-	5.77	4.44	4.52	4.46	4.52	4.07
C8	7.60	5.25	5.76	4.00	4.16	4.17	4.55	4.04

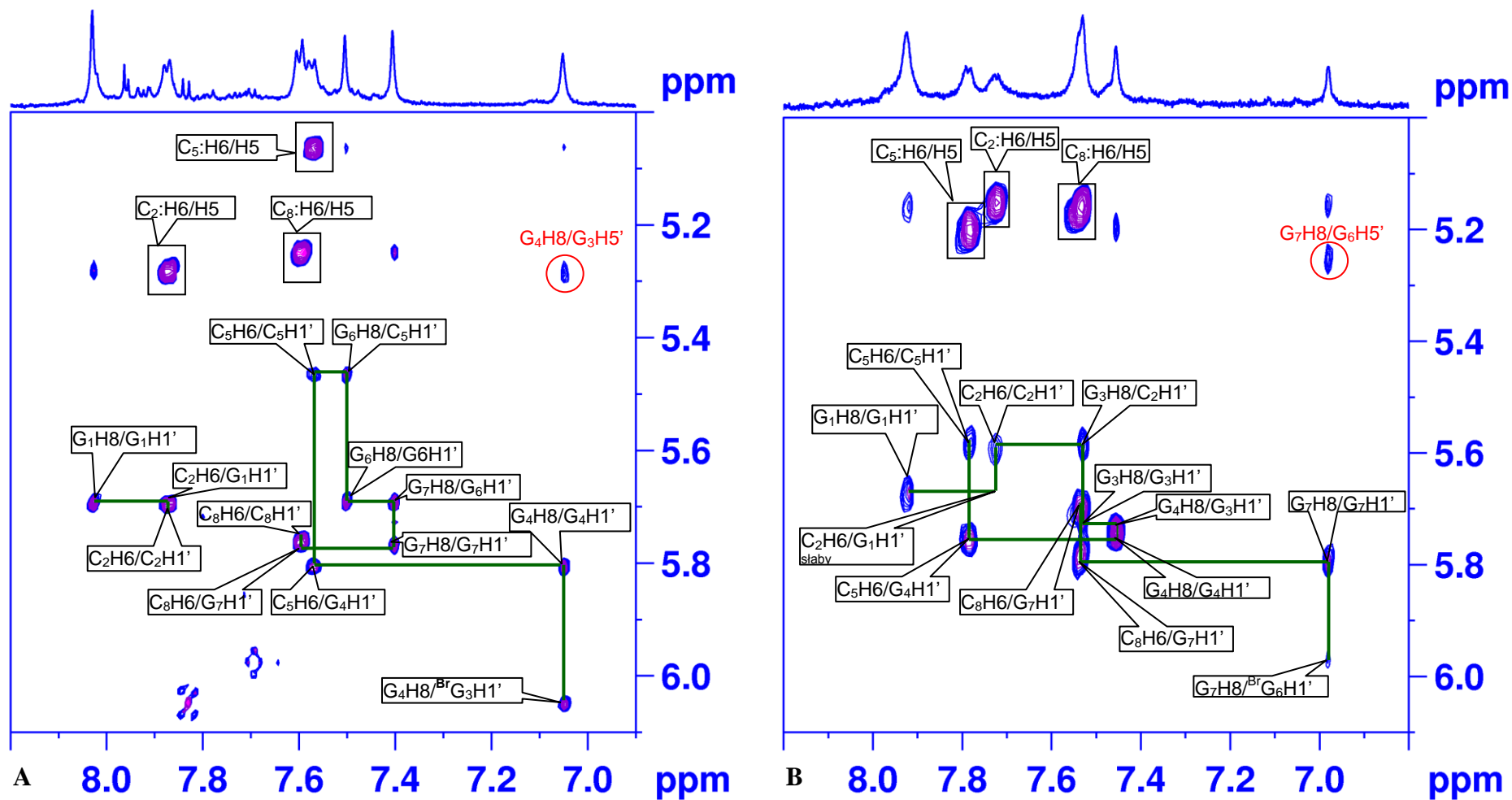
Tabela 18. Wartości przesunięć chemicznych $\delta(^1\text{H})$ dla G-C^{Me}GGCGG-C [ppm]

reszta	H8/H6	H5	H1'	H2'	H3'	H4'	H5'	H5''	Me
G1	7.99	-	5.65	4.61	4.53	4.25	3.99	3.86	-
C2	7.83	5.26	5.68	4.94	4.60	4.39	4.57	4.13	-
G3	-	-	6.01	4.63	4.36	4.64	5.29	4.11	2.31
G4	6.93	-	5.79	4.62	4.47	4.47	4.44	4.10	-
C5	7.57	5.06	5.48	4.70	4.52	4.42	4.47	4.09	-
G6	7.47	-	5.70	4.44	4.58	4.45	4.54	4.10	-
G7	7.40	-	5.79	4.46	4.52	4.46	4.53	4.07	-
C8	7.58	5.24	5.74	4.00	4.13	4.18	4.52	4.04	-

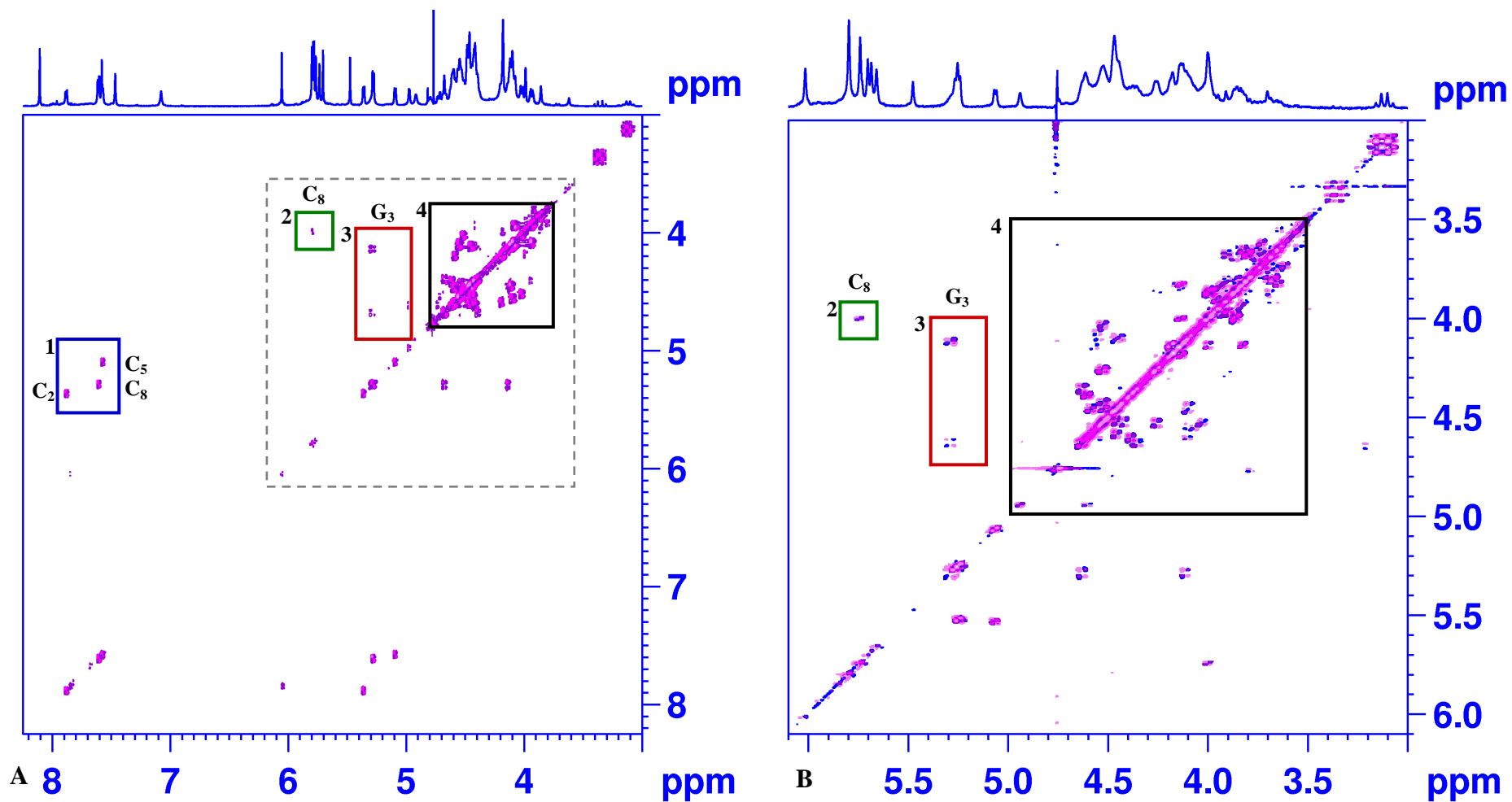
Widma 2D NOESY, 2D COSY oraz ^1H - ^{13}C HSQC obu modyfikowanych w pozycji trzeciej cząsteczek o sekwencjach G-C^{Br}GGCGG-C oraz G-C^{Me}GGCGG-C są bardzo podobne (rys. 114, 115). Obecność w widmach analogicznych sygnałów korelacyjnych, zbliżonych wartości przesunięć chemicznych $\delta(^1\text{H})$ oraz $\delta(^{13}\text{C})$ przemawiały za powstaniem podobnych struktur w roztworze, niezależnie od typu modyfikacji, ^{Br}G lub ^{Me}G. Ze względu na obecność aż trzech atomów wodoru w grupie metylowej cząsteczki **3**, obserwowałam silne a zarazem kluczowe dla ustalenia struktury drugorzędowej sygnały korelacyjne w widmach 2D NOESY (rys. 112, rejon 7). W widmach DQF-COSY cząsteczek **1** i **3** sygnał korelacyjny H1'-H2' obserwowałam tylko dla terminalnej reszty cytydyny **C8** (rys. 114). Brak innych sygnałów korelacyjnych H1'-H2' świadczył o tym, że pozostałe pierścienie cukrowe posiadały konformację C3'-endo. W widmach dwuwymiarowych sygnały od atomów wodoru oraz atomów węgla podzieliłam na kilka charakterystycznych obszarów opisanych pod każdym widmem (rys. 115).



Rys. 112. Widmo NOESY ($d_8 = 150$ ms) dla $G-C^{Me}GGCGG-C$ [D_2O , $25^\circ C$] **A.** Na widmie zaznaczone są rejony: 1. – H8/H6- H8/H6 2. – H8/H6-H1'/H5 3. – H8/H6-H2'/H3'/H4'/H5'/H5'' 4. – H1'/H5-H2'/H3'/H4'/H5'/H5'' 5. – H1'/H5- H1'/H5 6. – H2'/H3'/H4'/H5'/H5''- H2'/H3'/H4'/H5'/H5'' 7. – H8/H6/H1'/H5/H2'/H3'/H4'/H5'/H5''-CH₃; **B.** Rejon H8/H6-H1'/H5 widma NOESY ($d_8=150$ m), na którym zaznaczyłam ścieżkę NOE. Pomiędzy resztami C2 a G3 ścieżka NOE jest przerwana.



Rys. 113. Rejon H8/H6-H1'/H5 widm NOESY ($d_8 = 150$ ms) dla $G-C^{Br}GGCGG-C$ (A) oraz $G-CGGC^{Br}GG-C$ (B) [D_2O , $25^\circ C$]. Na widmach zaznaczone są ścieżki NOE. Zaznaczyłam również sygnały korelacyjne H6:H5. Pomędzy resztami C2 a G3 (A) oraz C5 a G6 (B) ścieżka NOE jest przerwana. W trakcie trwania badań cząsteczka $G-C^{Br}GGCGG-C$ uległa częściowej degradacji.



Rys. 114. Widma DQF-COSY dla $G-C^{Br}GGCGG-C$ [10 mM fosforan sodu, 0.1 mM EDTA](A) oraz $G-C^{Me}GGCGG-C$ (B) [D_2O , 25°C]

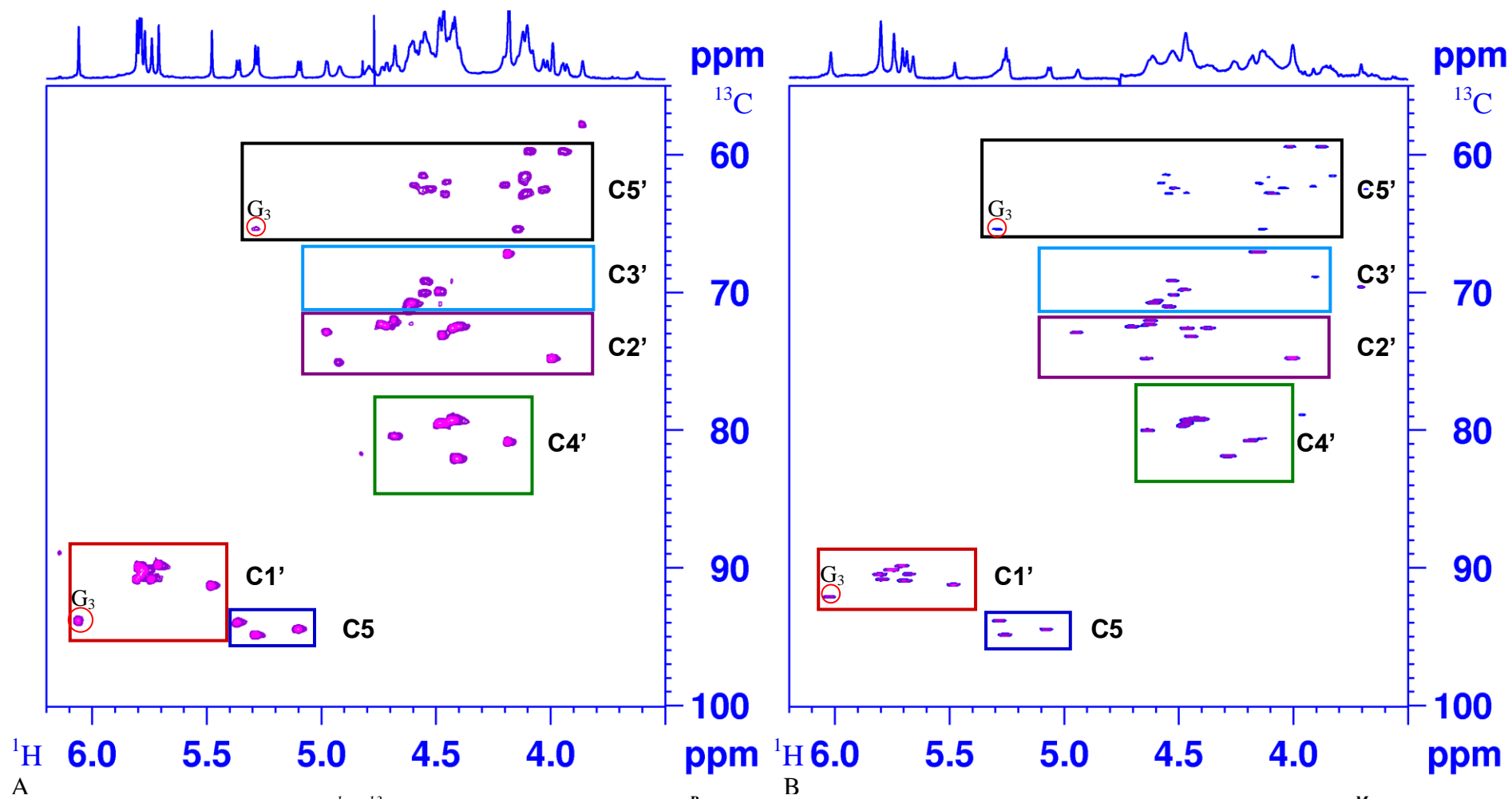
Na widmach zaznaczone są sygnały korelacyjne pochodzące od sprzężeń skalarnych:

1A – H8/H6-H1'/H5 (na niebiesko zaznaczone są sygnały H6:H5 reszt C2, C5 i C8)

2A, B – H1'/H5-H2'/H3'/H4'/H5'/H5'' (na zielono zaznaczony sygnał H1'-H2' reszty C8)

3A, B – H1'/H5-H2'/H3'/H4'/H5'/H5'' (na czerwono zaznaczony nietypowy w tym obszarze sygnał H5'-H4' oraz H5'-H5'' reszty G3)

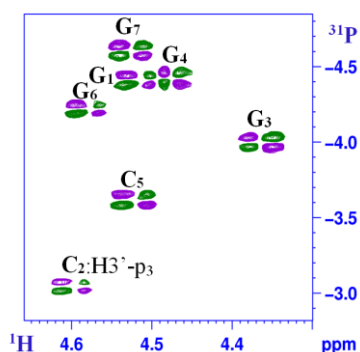
4A, B – H2'/H3'/H4'/H5'/H5'' (zaznaczony kolorem czarnym)



Rys. 115. Widma korelacyjne ^1H - ^{13}C -HSQC [D_2O , 25°C] dla $\text{G-C}^{\text{Br}}\text{GGCGG-C}$ [10 mM fosforan sodu, 0.1 mM EDTA] (A) oraz $\text{G-C}^{\text{Me}}\text{GGCGG-C}$ (B). Na widmach zaznaczyłam zakresy występowania sygnałów korelacyjnych: na czerwono – C5-H5, granatowo- C1'-H1', zielono – C4'-H4', fioletowo – C2'-H2', niebiesko – C3'-H3', czarno – C5'-H5'' oraz w kółku sygnały o nietypowych przesunięciach dla reszty G3

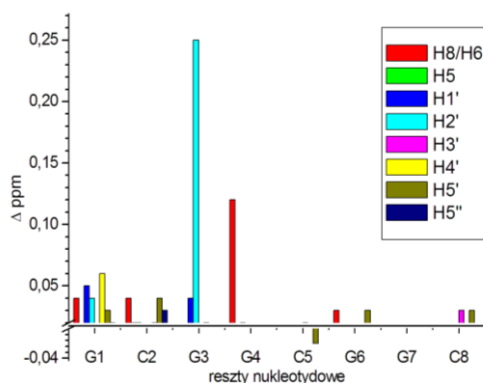
Ustalenie konformacji syn/anti wokół wiązania N-glikozydowego dla modyfikowanych reszt ^{Me}G i ^{Br}G

Przy pomocy widm NMR potwierdziłam, iż w cząsteczkach **1** i **3** modyfikowane reszty guanozyny ^{Me}G oraz ^{Br}G przyjmują konformację *syn* wokół wiązania N-glikozydowego. W konformacji *syn* odległość pomiędzy atomem wodoru H1' reszty **C2** a grupą metylową -CH₃ reszty **G3** jest zbyt duża (> 4 Å), dlatego w widmie NOESY nie obserwuje się sygnału korelacyjnego **C2:H1'-G3:CH₃**, a ścieżka NOE jest przerwana (rys. 112 B). Z kolei sygnał korelacyjny **G3:CH₃-G3:H1'** jest bardzo silny. W orientacji *syn* odległość pomiędzy tymi atomami jest porównywalna z odległością pomiędzy atomami H6:H5 pirymidyn (2.45 Å). Integracja sygnałów korelacyjnych w widmie NOESY zarejestrowanym z krótkim czasem mieszania (150 ms) pokazała, że objętość sygnału korelacyjnego **G3:CH₃-G3:H1'** w przeliczeniu na jeden atom wodoru jest porównywalna z objętością sygnałów **C2:H6-C2:H5** czy **C5:H6-C5:H5**, co oznacza, że odległości te są bardzo zbliżone. Dane te jednoznacznie potwierdziły, że reszta ^{Me}**G3** przyjmuje konformację *syn*. W przypadku cząsteczek z modyfikacją ^{Br}G, z uwagi na brak atomu wodoru w pozycji C8, ścieżka NOE jest także przerwana (rys. 113). Z tego samego powodu na podstawie analizy wielkości efektu NOE nie można wnioskować o konformacji wokół wiązania N-glikozydowego. Konformacja *syn* dla tej reszty została potwierdzona na podstawie analizy przesunięć chemicznych ¹H, ¹³C i ³¹P. Jak już wspominałam (rozdział II.3.1.), charakterystyczne dla reszt guanozyny w konformacji *syn* jest przesunięcie sygnału anomerycznego atomu wodoru H1' w kierunku większych wartości ppm oraz jednocześnie przesunięcie w przeciwnym kierunku sygnału od atomu H3' (tab. 17, 18, rys. 115, 116). Jak widać z tabeli 17, spośród wszystkich sygnałów protonów anomerycznych sygnał **G3-H1'** jest najsilniej odsłaniany, a sygnał **G3-H3'** najsilniej przesłaniany (poza terminalną resztą), co wskazywało na orientację *syn* reszty **G3**. Dodatkowe dowody potwierdzające konformację *syn* reszt ^{Me}G i ^{Br}G pochodziły z analizy widm ¹H-¹³C HSQC oraz ¹H-³¹P HSQC. Zgodnie z oczekiwaniem, również atomy węgla C8 oraz C1' obu reszt, ^{Me}G i ^{Br}G, są przesunięte w kierunku wyższych wartości ppm o ok. 3-4 ppm, w stosunku do analogicznych sygnałów pochodzących od reszt w konformacji *anti*. Ponadto sygnał pochodzący od atomu fosforu ³¹P łączącego reszty C₂pG₃(*syn*) występuje przy wyższych wartościach ppm niż pozostałe atomy ³¹P (rys. 116) (6).



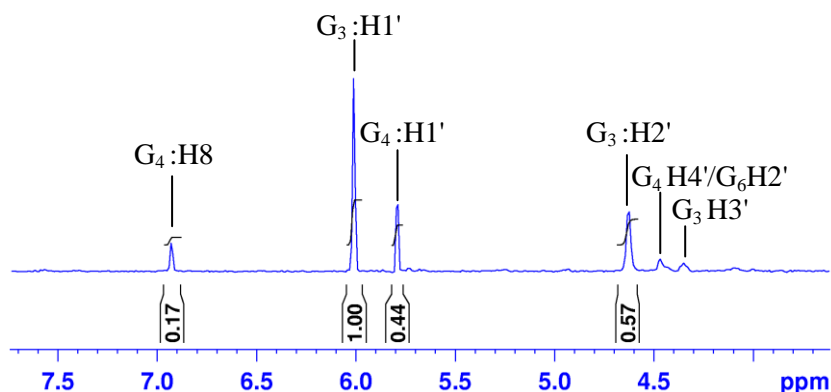
Rys. 116. Widmo korelacyjne ¹H-³¹P-HSQC dla G-C^{Me}GGCGG-C [D₂O, 25°C].

Na rysunku 117 schematycznie przedstawiłam różnice przesunięć chemicznych $\delta(^1\text{H})$ pomiędzy cząsteczkami **1** i **3**. Zastąpienie atomu bromu grupą metylową powoduje jedynie niewielkie zmiany wartości przesunięć chemicznych, na ogół nieprzekraczające 0.05 ppm. Największe różnice przesunięć chemicznych obserwowałam dla atomów wodoru reszt **G3-H2'**, **G4-H6** oraz **G1-H4'** (rys. 117, tab. 17, 18). Niewielka różnica przesunięć chemicznych pozostałych atomów wodoru H8/H6 może świadczyć o podobieństwie oddziaływań warstwowych w obu analizowanych cząsteczkach (rys. 117).



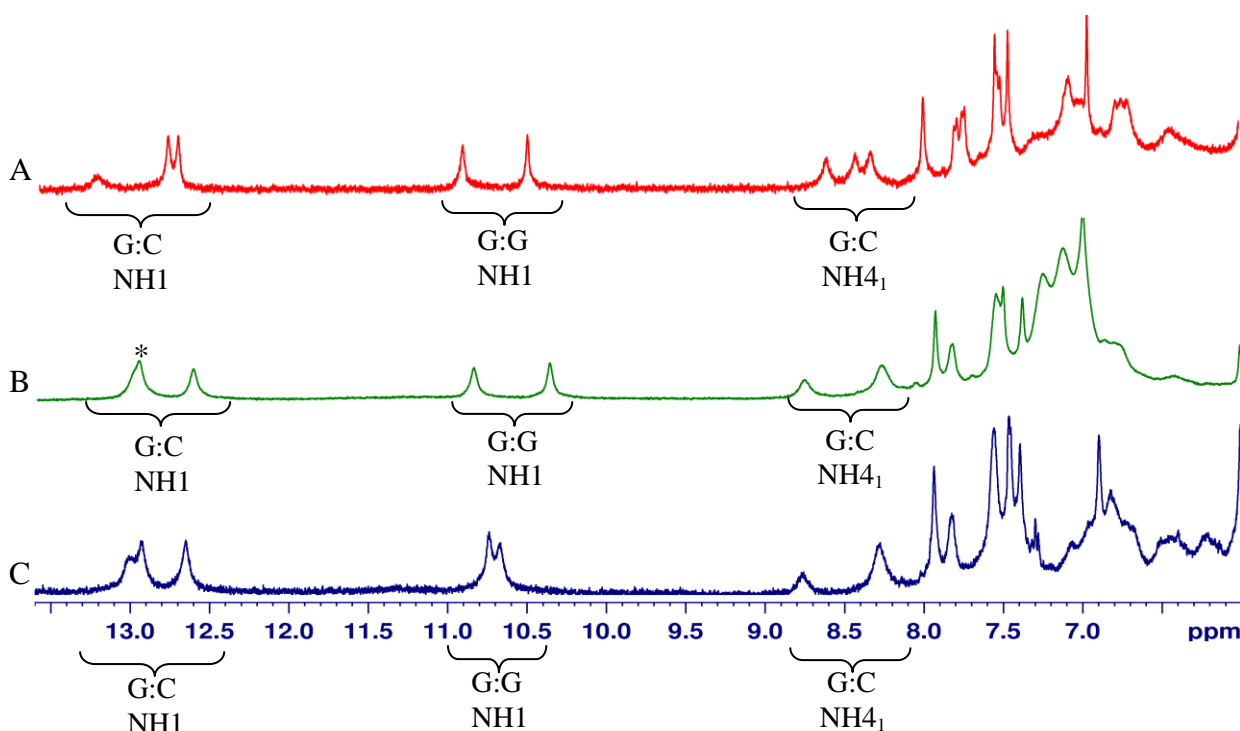
Rys. 117. Różnice przesunięć chemicznych $\delta(^1\text{H})$ [ppm] pomiędzy $G\text{-C}^{\text{Br}}\text{GGCGG-C}$ (**1**) oraz $G\text{-C}^{\text{Me}}\text{GGCGG-C}$ (**3**); $\Delta \text{ppm} = \delta(^1\text{H})(\mathbf{1}) - \delta(^1\text{H})(\mathbf{3})$

Na rysunku 118 przedstawiłam przekrój widma 2D NOESY dla wartości ppm odpowiadającej przesunięciu chemicznemu grupy metylowej. Pomimo, iż odległość pomiędzy grupą $-\text{CH}_3$ a atomem wodoru $\text{H1}'$ jest mniejsza niż odległość $\text{G3CH}_3\text{-G3H2}'$ to obecność podstawnika w pozycji C8 ma wpływ tylko na położenie sygnału $\text{G3-H2}'$. Odległość grupy metylowej lub atomu bromu od atomu $\text{G3-H2}'$ jest zbyt duża, aby zmiana przesunięcia chemicznego atomu $\text{H2}'$ była spowodowana jedynie typem podstawnika na atomie węgla C8 (rys. 118). W resztach $^{\text{Br}}\text{G}$ i $^{\text{Me}}\text{G}$, w obrębie konformacji *syn*, kąt *N*-glikozydowy może przyjmować różne wartości. W każdej z tych reszt ułożenie zasady heterocyklicznej nad pierścieniem cukrowym, szczególnie w stosunku do atomu $\text{H2}'$ jest inne i może w ten sposób wpływać na wartość przesunięcia chemicznego atomu $\text{H2}'$ reszty **G3**.



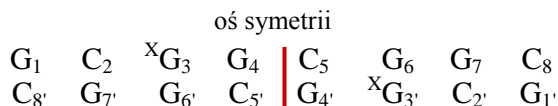
Rys. 118. Przekrój widma 2D NOESY wzdłuż wartości ppm odpowiadającej przesunięciu chemicznemu grupy metylowej, zintegrowano względną objętość sygnałów

W celu ustalenia struktury drugorzędowej cząsteczek G-C^{Br}GGCGG-C (1), G-CGGC^{Br}GG-C (2) oraz G-C^{Me}GGCGG-C (3) w roztworze należało najpierw określić, które atomy są zaangażowane w tworzenie wiązań wodorowych, czyli zidentyfikować zarówno donory i akceptory wiązań wodorowych, jak także same atomy wodoru. Aby spowolnić proces wymiany iminowych i aminowych atomów wodoru z wodą, widma ¹H NMR dla cząsteczek 1-3 rejestrowałam w obniżonej temperaturze od 7°C do 15°C (rys. 119 A-C). Jako rozpuszczalnik stosowałam mieszaninę H₂O/D₂O w stosunku 90%/10% (v/v), w dalszej części pracy nazywaną skrótowo H₂O.



Rys. 119. Fragmenty widm ¹H NMR dla G-CGGC^{Br}GG-C (A), G-C^{Br}GGCGG-C (B) oraz G-C^{Me}GGCGG-C (C) [10°C, H₂O]; zaznaczone są sygnały od iminowych atomów wodoru NH1 pochodzące od reszt guanozyny oraz zaangażowanych w wiązanie wodorowe aminowych atomów wodoru NH₄1 w resztach cytydyny, * - dwa nałożone sygnały rezonansowe

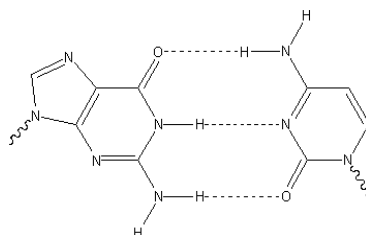
Widma ¹H NMR zarejestrowane w H₂O wydawały się być zgodne z modelem dupleksu, w którym w wyniku asocjacji każdego powtórzenia CGG powstaje ciąg kanonicznych par zasad C:G i G:C, przedzielony pojedynczym niedopasowaniem ^XG:G (rys. 120).



Rys. 120. Schemat dupleksu z zaznaczoną osią symetrii (X = Br, Me)

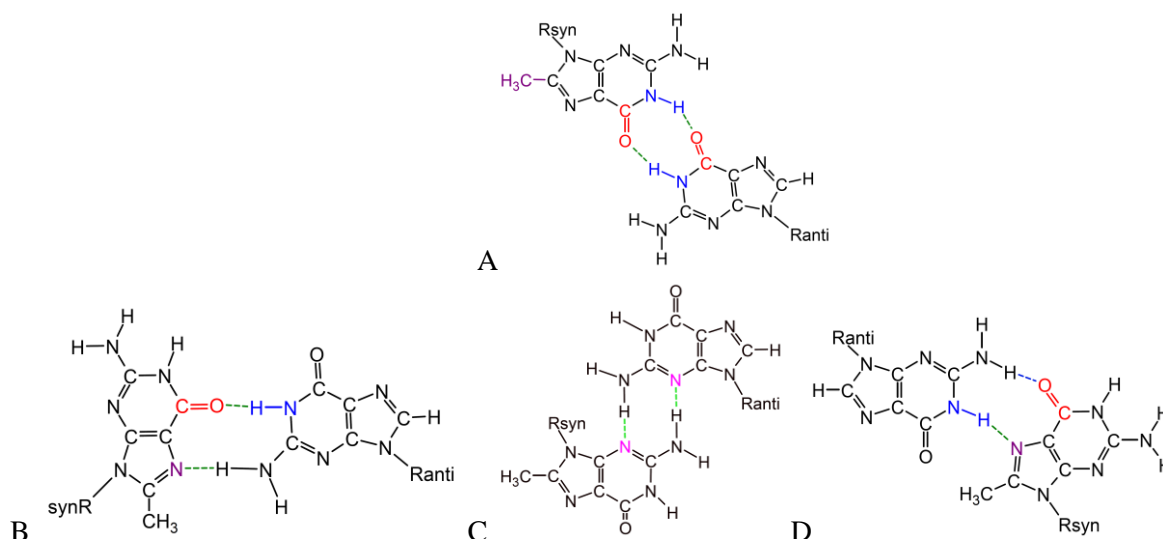
Ze względu na symetrię takiego dupleksu, przesunięcia chemiczne reszt **G1-C8** są identyczne z przesunięciami reszt **G1'-C8'**. Obecność osi symetrii powoduje dodatkowo, iż dla reszt usytuowanych w środkowej części cząsteczki, w widmach NMR nie można rozróżnić sygnałów pochodzących od oddziaływań międzycząsteczkowych **G4:C5'** od oddziaływań wewnątrzcząsteczkowych **G4:C5**.

W widmach pokazanych na rys. 119 A-C, w zakresie 13.5 - 12.5 ppm obserwowałam trzy sygnały typowe dla kanonicznych par zasad G:C oraz dwa dodatkowe, ostre sygnały w zakresie 11.00 - 10.00 ppm. O zawiązaniu się typowych dla par zasad Watsona-Cricka G:C wiązań wodorowych (rys. 121) świadczyło również położenie sygnałów pochodzących od protonów aminowych reszt cytydyny. Sygnały atomów wodoru grup aminowych (NH₁) zaangażowanych w wiązanie wodorowe występują w zakresie 9 - 8 ppm, natomiast te, które nie uczestniczą w wiązaniu wodorowym (NH₂) przesunięte są w górę pola o ok. 1,5 ppm i znajdują się w regionie 7 - 6 ppm (rys. 119).



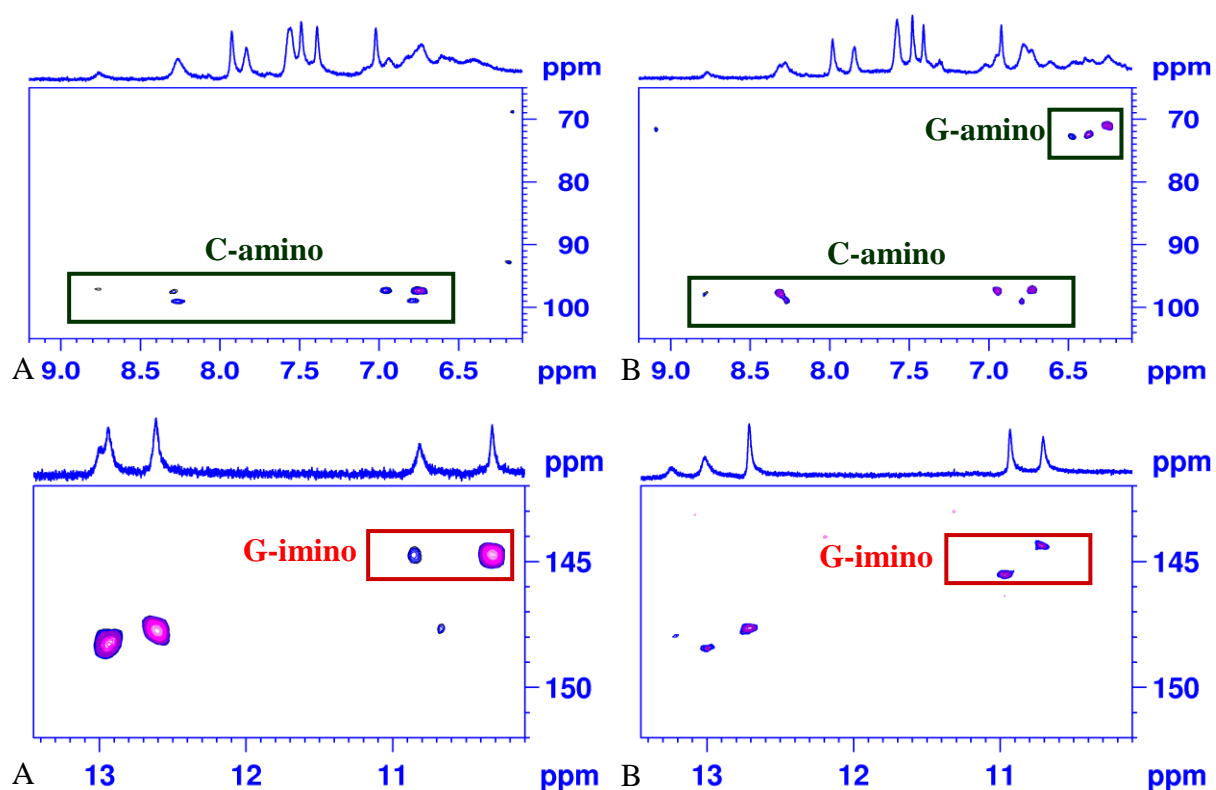
Rys. 121. Schemat typowych wiązań wodorowych w parze zasad Watsona-Cricka G:C.

Obecność dwóch sygnałów w rejonie 11.00 - 10.00 ppm wskazywała na tworzenie się stabilnych par zasad ^{Br}G:G oraz ^{Me}G:G. Spośród wielu wariantów par G:G, możliwe są tylko cztery typy niedopasowania G:G zawierające dwa wiązania wodorowe (rys. 122). Dla antyrównoległego dupleksu, w trzech przypadkach (rys. 122 A-C) wymogiem strukturalnym jest, aby orientacja jednej z reszt guanozyny względem pierścienia rybozy była *syn*, w czwartym przypadku (rys. 122 D) obie reszty guanozyny są w konformacji *anti*. Para typu D występuje w dupleksie niezwykle rzadko. Do tej pory w bazie dla niekanonicznych par zasad (<http://prion.bchs.uh.edu>) został opisany tylko jeden taki przypadek (212). Najczęściej występującą parą zasad G:G jest tzw. para typu *imino-aminowego* (rys. 122 B), w której zawiązują się wiązania wodorowe G(O6):G(N1H) oraz G(N7):G(N2H₂). Para taka obserwowana była również w strukturze krystalograficznej cząsteczki G-C^{Br}GGCGG-C (1).



Rys. 122. Para zasad ^{Me}G(*syn*):G(*anti*) typu N1-karboonylo (A), N1-karboonylo, N7-amino (B), N3-amino (C) oraz N7-imino, możliwa w dupleksie równoległym (D)

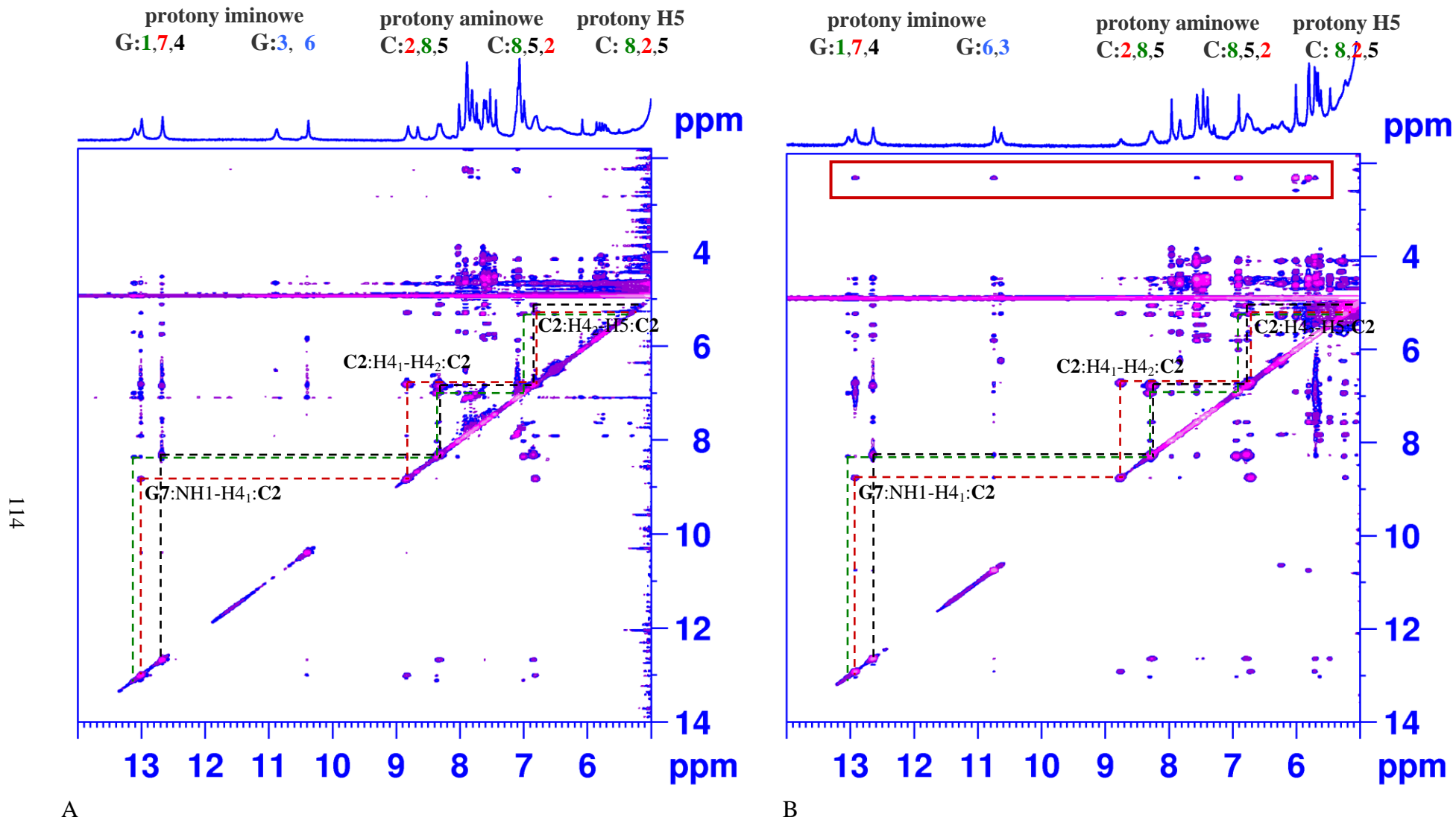
Pojawienie się dwóch sygnałów w rejonie 11.0-10.0 ppm wskazywało na obecność pary zasad G:G typu imino-iminowego (rys. 122 A). Chociaż zakres ten jest typowy dla położenia sygnałów atomów iminowych to nie można było wykluczyć, że są to sygnały pochodzące od protonów grup aminowych, o ile uczestniczyłyby w zawiązaniu silnych wiązań wodorowych. Dla jednoznacznego zidentyfikowania tworzącej się pary zasad należało najpierw z całą pewnością ustalić, czy sygnały te pochodzą od iminowych atomów wodoru. Jedną z metod stosowanych w spektroskopii NMR kwasów nukleinowych do rozróżnienia sygnałów pochodzących od iminowych i aminowych atomów wodoru jest analiza widma korelacyjnego ^1H - ^{15}N HSQC. Rozróżnienie tych atomów wodoru w parze zasad $^{\text{Me/Br}}\text{G3:G6}$ było możliwe na podstawie znajomości przesunięć chemicznych związanych z nimi atomów azotu. Jak podałam w tabeli 9, przesunięcia chemiczne atomów azotu w resztach nukleotydowych mają charakterystyczne wartości. Niestety, czułość eksperymentów korelacyjnych ^1H - ^{15}N HSQC jest bardzo mała (naturalna zawartość izotopu ^{15}N wynosi 0.36 %, a wartość współczynnika magnetogirycznego jest ~ 10 razy mniejsza niż dla ^1H) i dla otrzymania jednego takiego widma konieczne było wykorzystanie spektrometru przez okres 3-4 dni. Fragmenty widm ^1H - ^{15}N HSQC przedstawiłam na rysunku 123.



Rys. 123. Widma ^1H - ^{15}N HSQC dla $\text{G-C}^{\text{Br}}\text{GGCGG-C}$ [H_2O , 15°C] (A) oraz $\text{G-C}^{\text{Me}}\text{GGCGG-C}$ [H_2O , 10°C] (B). Czerwoną ramką zaznaczone są sygnały korelacyjne pochodzące od par zasad $^{\text{Br}}\text{G:G}$ oraz $^{\text{Me}}\text{G:G}$, na zielono zaznaczone są sygnały korelacyjne pochodzące od grup aminowych.

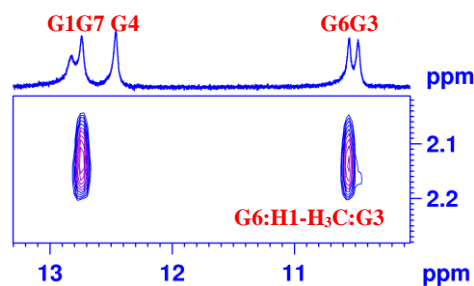
W obu cząsteczkach, $\text{G-C}^{\text{Br}}\text{GGCGG-C}$ oraz $\text{G-C}^{\text{Me}}\text{GGCGG-C}$, sygnały w zakresie 11.00 - 10.0 ppm dają korelacje do atomów azotu przy ~ 145 ppm, pochodzą więc z całą pewnością

od iminowych atomów wodoru. Jeśli oba sygnały pochodzą od protonów iminowych, to jedyną możliwą parą zasad, w zawiązywanie się której zaangażowane są dwa iminowe atomy wodoru, byłaby para typu *NI-karboonylo* pokazana na rysunku 122 A. Aby potwierdzić lub wykluczyć tworzenie się takiej pary potrzebna była pełna interpretacja widm NMR. W celu przypisania iminowych i aminowych atomów wodoru wykorzystałam opisane w metodologii metody, wykorzystując widma 2D NOESY zarejestrowane w H₂O. Niestety, istotne dla badań strukturalnych sygnały pochodzące od grup aminowych reszt guanozyny są bardzo szerokie i na ogół trudne do zaobserwowania z uwagi na pośrednią, w skali czasu NMR, rotację wokół wiązań C-N. Sygnały korelacyjne pomiędzy grupą metylową a protonami wymiennymi, obserwowane w widmie 2D NOESY dla cząsteczki zawierającej modyfikację ^{Me}G, były niezwykle pomocne w ustaleniu typu pary zasad ^{Me}G:G. Na rys. 124 pokazane są widma 2D NOESY wykonane w H₂O dla cząsteczek **1** i **3**.



Rys. 124. Fragmenty widm 2D NOESY ($d8 = 150$ ms) dla $G-C^{Br}GGCGG-C$ (A) oraz $G-C^{Me}GGCGG-C$ (B); [H_2O , $15^\circ C$]. Zaznaczono sygnały na podstawie których przypisano protony wymiennalne np. ($G7:NH1-C2:H4_1$, $C2:H4_1-C2:H4_2$ oraz $C2:H4_2-C2:H5$; czerwonym prostokątem zaznaczono sygnały korelacyjne pochodzące od grupy metylowej

W widmie 2D NOESY zaobserwowałam dwa kontakty NOE pomiędzy grupą metylową a iminowymi atomami wodoru, z czego jeden pochodził od oddziaływania z protonem **G7:NH1**. Ponieważ niemożliwa jest obserwacja sygnału korelacyjnego pomiędzy grupą metylową **G3:CH₃** a iminowym atomem wodoru tej samej reszty (**G3:NH1**), to sygnał przy 10.75 ppm musi pochodzić od iminowego atomu wodoru reszty **G6** (rys. 125). Natomiast dla cząsteczki G-C^{Br}GGCGG-C iminowe atomy wodoru reszt **G3** oraz **G6** przypisałam na podstawie specyficznych kontaktów NOE od tych atomów.



Rys. 125. Fragment widma 2D NOESY. Sygnały korelacyjne pomiędzy grupą metylową i iminowymi atomami wodoru.

W tzw. rejonie iminowo-iminowym widma NMR (rys. 126 C) obserwowałam jedynie sygnały korelacyjne pomiędzy atomem wodoru **G6-NH1** a atomami **G4-NH1** i **G7-NH1**, co świadczyło o istnieniu oddziaływań warstwowych pomiędzy parami zasad **G3:G6** a **C2:G7** i **G4:C5**. Inne charakterystyczne kontakty NOE od reszty **G6**, które opisane są na rys. 126 to: **G6:NH1-G4:H1'**, **G6:NH1-C5:NH₄₂**, **G6:NH1-G4:H8** oraz od reszty **G3** sygnał **G3:NH1-G3:NH_{21,2}**.

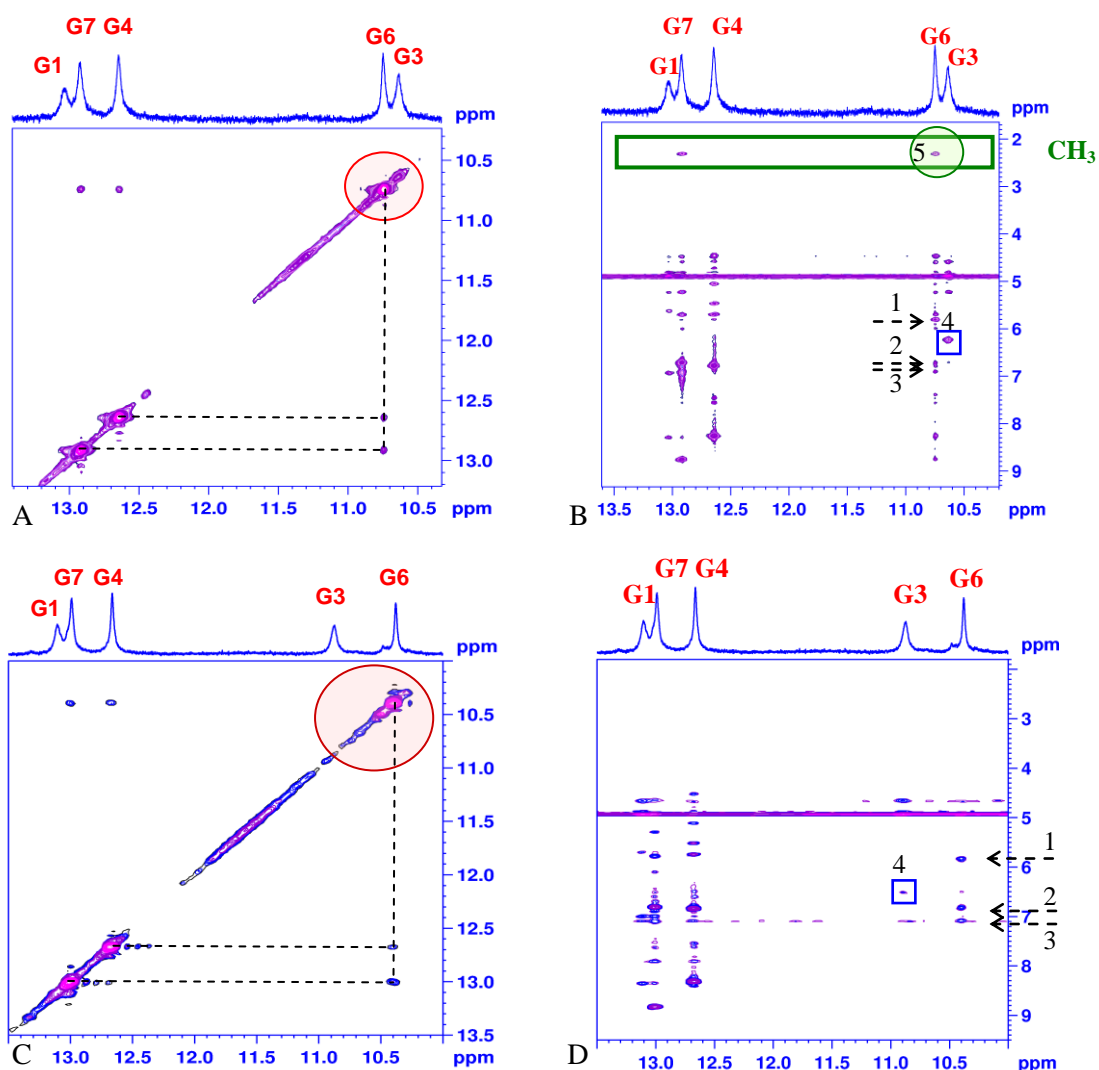
Wartości przesunięć chemicznych sygnałów rezonansowych pochodzących od protonów aminowych reszt cytydyny **C2**, **C5**, **C8** oraz iminowych reszt guanozyny **G1**, **G3**, **G4**, **G6**, **G7** w temperaturze 15°C zestawiałam w tabeli 19.

Tabela. 19. Wartości przesunięć chemicznych $\delta(^1\text{H})$ protonów iminowych i aminowych [ppm]

G-C ^{Br} GGCGG-C					G-C ^{Me} GGCGG-C				
reszta	NH1	NH ₄₁	NH ₄₂	NH _{21,2}	reszta	NH1	NH ₄₁	NH ₄₂	NH _{21,2}
G1	13.12	-	-	-	G1	13.03	-	-	-
C2	-	8.83	6.80	-	C2	-	8.75	6.71	-
G3	10.89	-	-	6.51	G3	10.64	-	-	6.23
G4	12.68	-	-	-	G4	12.64	-	-	-
C5	-	8.32	6.84	-	C5	-	8.25	6.77	-
G6	10.4	-	-	-	G6	10.75	-	-	-
G7	13.00	-	-	-	G7	12.91	-	-	-
C8	-	8.35	7.00	-	C8	-	8.29	6.93	-

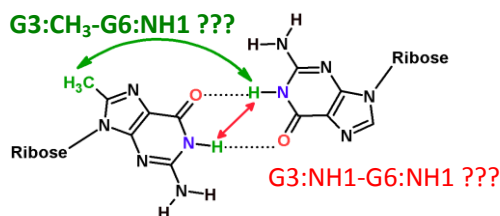
Dla cząsteczek o sekwencjach G-C^{Br}GGCGG-C oraz G-C^{Me}GGCGG-C wyznaczenie atomów i grup zaangażowanych w tworzenie wiązań wodorowych w parach G:G nie było proste. Choć identyfikacja sygnałów w zakresie 11.00 – 10.00 ppm, jako pochodzących od protonów iminowych sugerowała zawiązywanie się pary **G3:G6** typu **A** (rys. 122 A), to jednak pojawienie się kontaktów NOE pomiędzy grupą metylową a atomem wodoru, którego sygnał pojawiał się przy 10.75 ppm

przemawiało za zawiązywaniem się pary pokazanej na rys. 122 B lub 122 D. Dowodów potwierdzających lub wykluczających tworzenie się par zasad G:G typu A, C lub D szukałam analizując szczegółowo sygnały występujące w widmie 2D NOESY. Niezależnie od stężenia próbek G-C^{Br}GGCGG-C oraz G-C^{Me}GGCGG-C i temperatury pomiaru, w widmach 2D NOESY zarejestrowanych w H₂O (rys. 126), nie udało mi się zaobserwować sygnału korelacyjnego pomiędzy protonami iminowymi reszt **G3** i **G6** (zaznaczone na czerwono na rys. 127). Dla pary zasad typu NI-karbylo (para zasad **A**) odległość pomiędzy atomami ^{Br/Me}G3NH1-G6NH1 byłaby niewielka, więc powinienam obserwować silny sygnał korelacyjny pochodzący od tego oddziaływania.



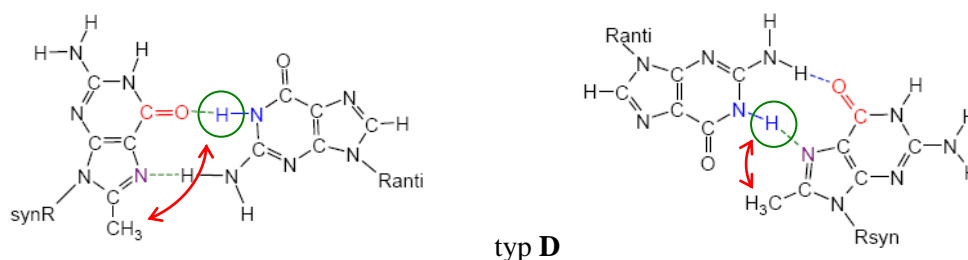
Rys. 126. Fragmenty widm 2D NOESY [H₂O] dla cząsteczek zawierających modyfikację ^{Me}G (A, B) oraz ^{Br}G (C, D); A, C - zaznaczone są rejony, gdzie powinny pojawić się sygnały korelacyjne w przypadku pary zasad pokazanej na rys. 122; B, D - zaznaczone są najważniejsze sygnały korelacyjne: 1. G6:NH1-G4:H1', 2. G6:NH1-C5:NH4₂, 3. G6:NH1-G4:H8, 4. G3:NH1-G3:NH2_{1,2}, 5. G6:NH1-G3:CH₃

Dodatkowo dla pary zasad typu A sygnał korelacyjny G6:NH1-G3:CH₃ nie mógłby być obserwowany ze względu na zbyt dużą odległość pomiędzy grupą metylową G3-CH₃ a protonem G6-NH1 (rys. 127, kolor zielony).



Rys. 127. Para zasad ^{Me}G:G typu N1-karbonylo. Czerwoną strzałką zaznaczyłam atomy wodoru, dla których powinnam zaobserwować silne oddziaływanie NOE, zieloną strzałką zaznaczyłam obserwowane oddziaływanie.

Pary zasad **G3:G6** typu **B** jak i **D** (rys. 128) zawierają po jednym iminowym atomie wodoru zaangażowanym w wiązanie wodorowe. Przesunięcia chemiczne $\delta(^1\text{H})$, przy których obserwowałam ich sygnały, wskazywały na parę typu **B**, gdyż sygnał pochodzący od protonu iminowego obecnego w parze **D** powinien pojawiać się przy znacznie wyższych wartościach ppm. Przykładowo, w typowej parze zasad G:C, w której występują wiązania NH-N, sygnał od protonu iminowego występuje przy ok. 13.5-12.5 ppm, a w przypadku pary zasad **D** taki sygnał występowałby przy ok. 10.8-10.4 ppm.

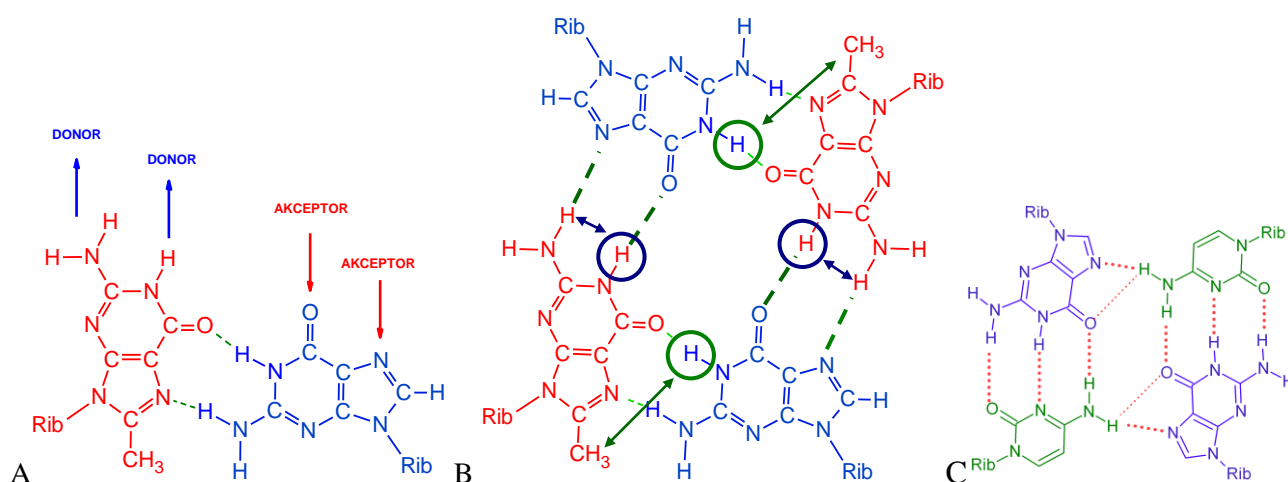


Rys. 128. Pary zasad: N1-karbonylo, N7-amino, (po lewej), N7-imino, (po prawej), w których zaangażowany jest jeden iminowy atom wodoru. Strzałką zaznaczyłam atomy wodoru, dla których powinnam zaobserwować oddziaływanie NOE.

Dla obu typów par zasad **B** i **D**, w widmach 2D NOESY powinny być widoczne sygnały korelacyjne pomiędzy grupą metylową **G3:CH₃** a iminowym atomem wodoru **G6:NH1**, jednak dla tych odmiennych aranżacji wiązań wodorowych odległość pomiędzy grupą metylową a iminowym atomem wodoru drugiej reszty jest zdecydowanie różna. W przypadku pary zasad **D** sygnał korelacyjny **G3:CH₃-G6:NH1** byłby znacznie silniejszy od pozostałych sygnałów korelacyjnych grupy metylowej, tymczasem sygnały korelacyjne pomiędzy grupą metylową a protonami iminowymi (**G3:CH₃-G6:NH1** oraz **G3:CH₃-G7:NH1**) są porównywalnej intensywności (rys. 125 oraz 126 B). W efekcie jedyną możliwą parą zasad, która zgodna byłaby z widmami NMR, była para zasad typu **B**, czyli taka sama, jak w strukturze krystalograficznej (1).

Niezwykle interesującym i trudnym problemem było wyjaśnienie spowolnionej wymiany z wodą atomów wodoru **G3-NH1** oraz **G6-NH1**, nawet w temperaturze pokojowej. W spektroskopii NMR kwasów nukleinowych w temperaturze pokojowej, na ogół obserwuje się tylko te wymienialne z H₂O atomy wodoru, które są zaangażowane w wiązanie wodorowe lub w inny sposób są chronione przed wymianą z wodą. O ile wiadomo było, że atom wodoru **G6-NH1** uczestniczy w zawiązywaniu pary **G3:G6**, to dane NMR sugerowały, że również atom wodoru **G3-NH1** powinien być zaangażowany w tworzenie wiązania wodorowego lub w jakiś inny sposób chroniony przed szybką wymianą z H₂O.

Para zasad typu *N1-karbylo*, *N7-amino* posiada dwie grupy donorowe oraz dwa miejsca akceptorowe wiązań wodorowych od strony szerokiej bruzdy (rys. 129 A). Asocjacja dwóch takich par G:G może prowadzić do powstania typowej G-tetrady (rys. 129 B). Również para zasad G:C od strony szerokiej bruzdy posiada miejsca akceptorowe (N7, O6) oraz donorowy atom wodoru (NH₂), co umożliwia tworzenie tetrady **G:C:G:C** pokazanej na rys. 129 C. Asocjacja dwóch dupleksów do formy czteroniciowej wydaje się więc być prawdopodobna i korzystna termodynamicznie. Teoretycznie taki dupleks może asocjować z drugą cząsteczką bez konieczności rearanżacji już związanych wiązań wodorowych (rys. 129 B, C). W takiej strukturze pojedyncza tetradą **G:G:G:G** przedzielona byłaby dwiema tetradami **G:C:G:C**.



Rys. 129. Dla pary zasad ^{Me}G(*syn*):G(*anti*) strzałkami zaznaczyłam grupy donorowe oraz akceptorowe mogące uczestniczyć w zawiązywaniu dodatkowych wiązań wodorowych (A), dla symetrycznej G-tetrady ^{Me}G(*syn*):G(*anti*):^{Me}G(*syn*):G(*anti*) w kółku zaznaczyłam iminowe atomy wodoru zaangażowane w tworzenie wiązań wodorowych; strzałka pokazuje obserwowane w widmie 2D NOESY sygnały korelacyjne (B), możliwa aranżacja zasad w mieszanej tetradzie G:C:G:C

Tworzenie się G-tetrady wyjaśniałoby spowolnioną wymianę atomu wodoru **G3-NH1**, z uwagi na jego zaangażowanie w tworzenie wiązania wodorowego **G3:NH1-G6:O6** oraz usytuowanie wewnątrz trudno dostępnego dla cząsteczek wody kanału biegnącego wzdłuż struktury utworzonej z dwóch dupleksów. Jak pokazałam na rysunku 129, w przeciwieństwie do dupleksu, w G-tetradzie oba protony iminowe **G3:NH1** i **G6:NH1** są zaangażowane w tworzenie wiązania wodorowego i w widmie ¹H NMR powinny być widoczne jako dwa różne sygnały, co zgadza się z wynikami eksperymentów ¹H-¹⁵N HSQC.

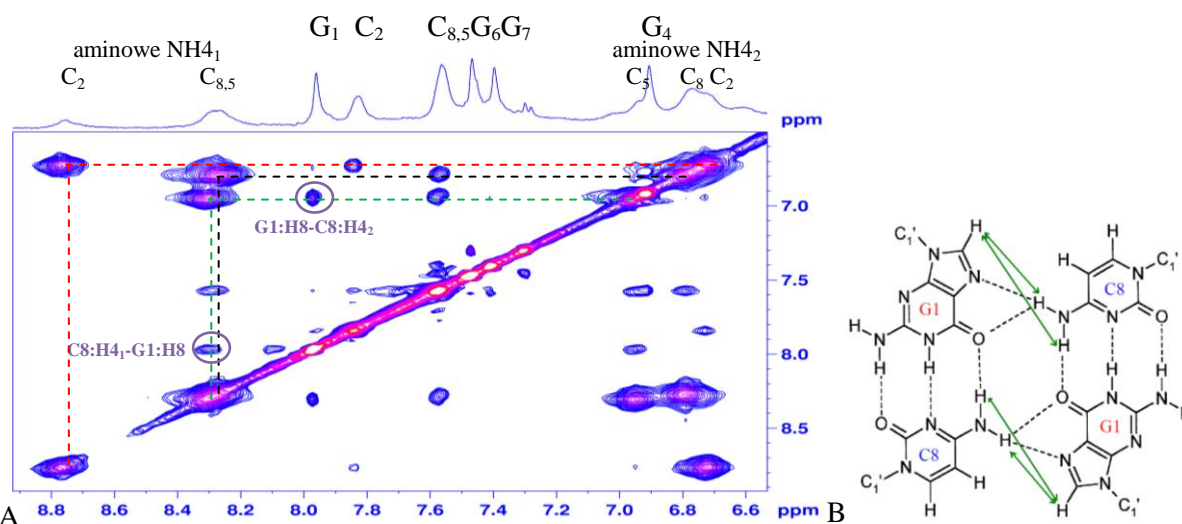
Struktura kwadrupleksu a widma NMR

Rozróżnienie metodami spektroskopii NMR pomiędzy strukturą spinki a dupleksu nie jest zadaniem trywialnym. Podobnie rozróżnienie pomiędzy strukturą dupleksu i kwadrupleksu utworzonego w wyniku asocjacji dwóch dupleksów było również zadaniem niezwykle trudnym. Na tym etapie badań niewiele danych wskazywało na to, że w warunkach pomiaru NMR mam do czynienia z inną strukturą niż dupleks. Poniżej przedstawiłam argumenty uzyskane z analizy widm

NMR, które przemawiały za asocjacją dwóch dupleksów prowadzącą do powstania struktury kwadrupleksu:

- niezgodność obserwowanych kontaktów NOE z tworzeniem się par zasad $^{Br}G:G$ oraz $^{Me}G:G$ typu **A**, **C** oraz **D** (rys. 122), obserwowanych w strukturach dupleksów
- spowolniona wymiana z wodą iminowego atomu wodoru reszty **G3**
Sytuacja taka jest możliwa tylko przy założeniu, że zawiązuje się dupleks z parą zasad **G3:G6** typu *N1-karbonylo, N7-amino*, który następnie asocjuje prowadząc do powstania G-tetrazy.
- pojawienie się w widmie NOESY sygnałów korelacyjnych pomiędzy protonem H8 reszty **G1** oraz protonami grupy aminowej reszty **C8** (rys. 130 A) dla terminalnej tetrazy G1:C8:G1:C8.

Z jednej strony obserwacja tych sygnałów jest niemożliwa w przypadku dupleksu, z drugiej strony kontakty te są charakterystyczne dla struktury kwadrupleksu i świadczą o zawiązywaniu się mieszanej tetrazy pokazanej na rys. 130 B. Typowe dla tetrad G:C:G:C sygnały korelacyjne G1:H8-C8:H4₂ oraz C8:H4₁-G1:H8 obserwowaliśmy także dla cząsteczki **3**, w obecności kationów potasu, jak także dla cząsteczki **1**, w środowisku kationów sodu.



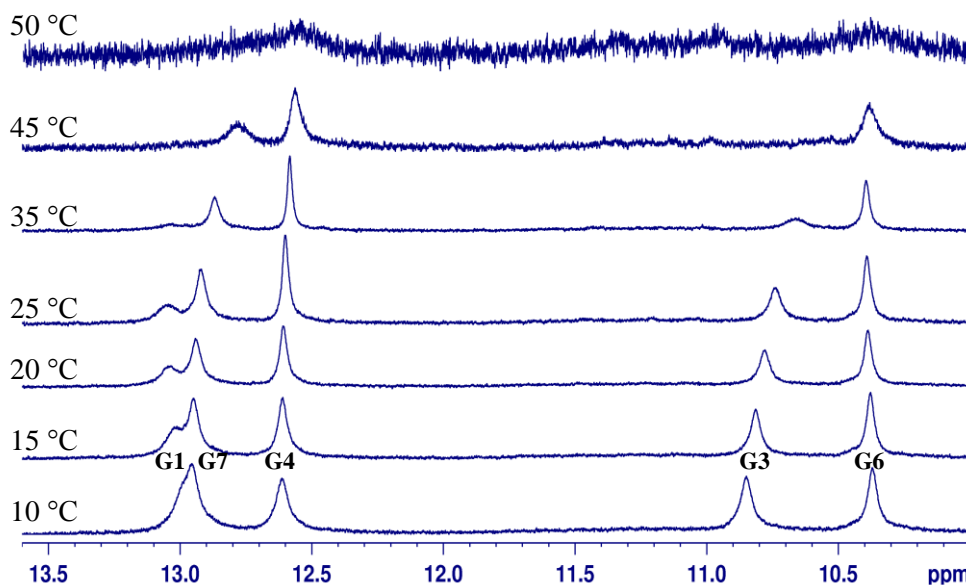
Rys. 130. Fragment widma 2D NOESY dla $G-C^{Me}GGCGG-C$ przedstawiający rejon aminowo-aromatyczny. Zaznaczone są sygnały korelacyjne świadczące o powstawaniu mieszanej tetrazy G1:C8:G1:C8. [H_2O , 150 mM NaCl, 10 mM fosforan sodu, 0.1 mM EDTA] (A), Mieszana tetrada G1:C8:G1:C8, zielonymi strzałkami zaznaczone są atomy wodoru, dla których zaobserwowałam charakterystyczne dla tej tetrazy kontakty NOE. (B)

Niestety, ani dla cząsteczki $G-C^{Br}GGCGG-C$ ani dla $G-C^{Me}GGCGG-C$ nie zaobserwowałam innych sygnałów NOE, które jednoznacznie wskazywałyby na powstawanie struktury kwadrupleksu. W żadnych warunkach nie udało mi się znaleźć sygnałów korelacyjnych pomiędzy atomami wodoru NH1 i H8 (**G6:H8-G3:NH1**), ani też słabych kontaktów typu **G3:NH1-G6:NH1** (rys. 59). Można to jednak wytłumaczyć tym, iż kation Na^+ w takich kwadrupleksach jest na przykład usytuowany w płaszczyźnie G-tetrazy, co wpływa na zwiększenie średnicy kanału oraz przyczynia się do wzrostu odległości międzyprotonowych, co powoduje, iż charakterystyczne dla kwadrupleksów kontakty pomiędzy iminowymi atomami wodoru nie są obserwowane w widmach NMR. Brak tych kontaktów

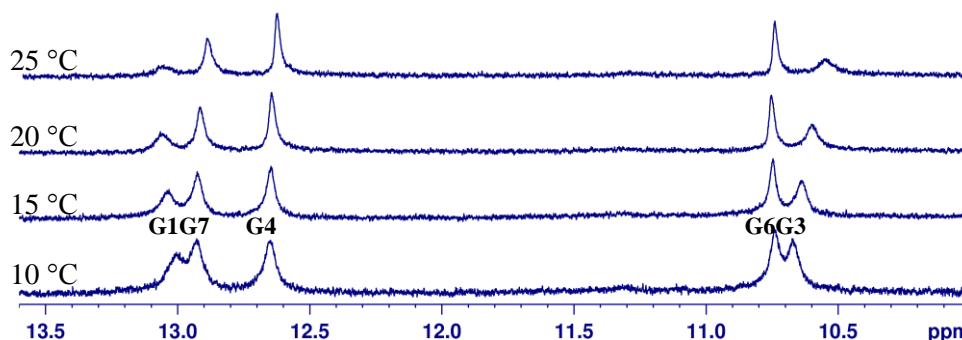
może być także efektem szybkiej wymiany pomiędzy formą dupleksu a kwadrupleksu. Wstępne wyniki analizy trwałości sygnałów iminowych atomów wodoru w zależności od temperatury pokazywały, iż sygnał protonu iminowego reszty **G3** wraz ze wzrostem temperatury szybciej ulegał poszerzeniu, co wskazywało na nieco słabsze wiązanie wodorowe oraz przemawiało za dynamiczną równowagą pomiędzy formą dupleksu a kwadrupleksu. Ponieważ, według mojej wiedzy, nie jest do tej pory znana żadna struktura czteroniciowa z G-tetradą, która powstałaby poprzez asocjację dwóch dupleksów, w dalszej części mojej pracy skupiłam się na wyszukaniu takich cech w widmach NMR, które potwierdziłyby powstanie takiej formy lub ją wykluczyły. Omówię również wpływ takich czynników jak stężenie RNA, typ kationu, stężenie kationu oraz temperatura na równowagę dupleks-kwadrupleks. Analizę tych czynników rozpocznę od omówienia wpływu temperatury na trwałość protonów wymienialnych.

III.2.2. Zależność temperaturowa widm ^1H NMR cząsteczek RNA zawierających modyfikację $^{\text{Me}}\text{G}$ lub $^{\text{Br}}\text{G}$

Zależność temperaturową widm ^1H NMR w rejonie iminowym dla $\text{G-C}^{\text{Br}}\text{GGCGG-C}$ oraz $\text{G-C}^{\text{Me}}\text{GGCGG-C}$ przedstawiłam na rysunkach 131,132.

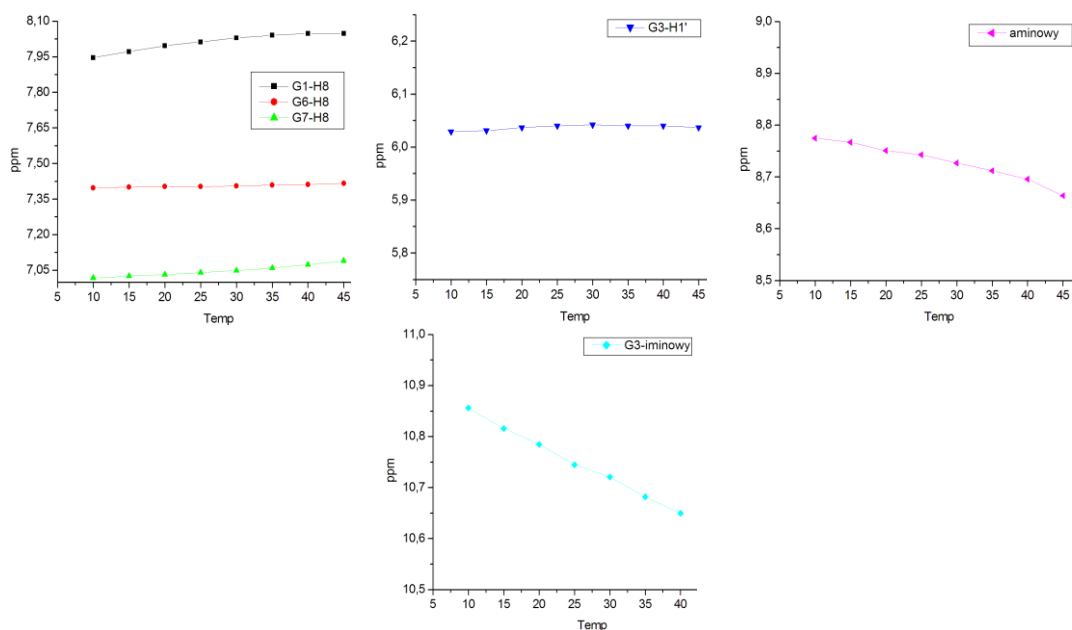


Rys. 131. Widma ^1H NMR dla $\text{G-C}^{\text{Br}}\text{GGCGG-C}$ wykonane w zakresie temperatur od 10°C do 50°C



Rys. 132. Widma ^1H NMR dla $\text{G-C}^{\text{Me}}\text{GGCGG-C}$ wykonane w zakresie temperatur od 10°C do 25°C

Jeśli cząsteczki **1** i **3** tworzyłyby w roztworze typową strukturę dupleksu, wówczas atom wodoru NH1 reszty **G3** z pary **G3:G6** byłby łatwo dostępny dla rozpuszczalnika, ulegałby efektywnej hydratacji i szybko wymieniał się z atomami wodoru wody. Ponadto dla dupleksów DNA i RNA sygnały od protonów iminowych reszt terminalnych zazwyczaj są niewidoczne nawet w temperaturach bliskich 0°C, jednak w przypadku cząsteczek G-C^{Br/Me}GGCGG-C sygnał ten był obecny nawet w temperaturze pokojowej. Stosunkowo duża trwałość sygnału pochodzącego od atomu wodoru NH1 reszty ^{Br}G3 i ^{Me}G3 jest dodatkowym argumentem przemawiającym za tworzeniem się kwadrupleksu. Zmiany przesunięć chemicznych w kierunku mniejszych wartości ppm, obserwowane dla sygnałów iminowych reszt ^{Br}G3 i ^{Me}G3 wraz ze wzrostem temperatury, świadczyły o łatwiejszym rozrywaniu wiązań wodorowych tworzonych z ich udziałem (rys. 131, 132). Wykres zależności przesunięć chemicznych od temperatury dla wybranych sygnałów cząsteczki G-C^{Br}GGCGG-C przedstawiony jest na rysunku 133. W temperaturze poniżej 45°C, zmiany wartości przesunięć chemicznych $\delta(^1\text{H})$ wraz ze wzrostem temperatury są nieznaczne (rys. 133). Dla analizowanych sygnałów rezonansowych zmiany $\delta(^1\text{H})$ przypadające na wzrost temperatury o 1°C są na ogół mniejsze niż 0,004 ppm. Tak małe wartości zmian przesunięć chemicznych są charakterystyczne dla stabilnych struktur helikalnych. Jedynie sygnał NH1 reszty ^{Br}G3 wykazuje zmiany do 0,008 ppm/1°C, co wynika prawdopodobnie z dynamicznego układu dupleks-kwadrupleks.



Rys. 133. Zależność przesunięć chemicznych protonów H1, H8 oraz H1' od temperatury w zakresie od 10°C do 45°C dla G-C^{Br}GGCGG-C.

W temperaturze około 50°C linie rezonansowe ulegały silnemu poszerzeniu i dalsze śledzenie zmian przesunięć chemicznych poszczególnych sygnałów wraz ze wzrostem temperatury było niemożliwe. Z tej przyczyny nie mogłam wyznaczyć temperatury topnienia cząsteczki G-C^{Br}GGCGG-C metodami NMR, a jedynie mogłam określić temperaturę, w której zaczyna zanikać struktura kwadrupleksu, co przejawiało się zwiększoną swobodą konformacyjną cząsteczki i poszerzeniem sygnałów.

III.2.3. Wpływ typu soli i siły jonowej roztworu na widma ^1H NMR cząsteczek RNA zawierających modyfikację $^{\text{Me}}\text{G}$ lub $^{\text{Br}}\text{G}$

W tabelach 20 oraz 21 podane są wartości przesunięć chemicznych $\delta(^1\text{H})$ dla cząsteczek **1** i **3**, w buforze zawierającym jedynie 10 mM fosforan sodu i 0.1 mM EDTA.

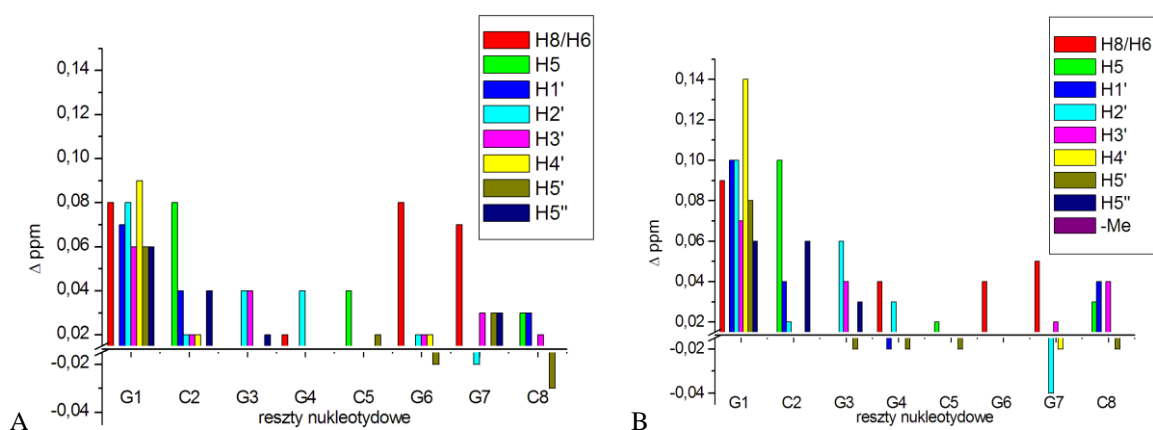
Tabela 20. Wartości przesunięć chemicznych $\delta(^1\text{H})$ [ppm] dla $\text{G-C}^{\text{Br}}\text{GGCGG-C}$ w buforze zawierającym 10 mM fosforan sodu oraz 0.1 mM EDTA

reszta	H8/H6	H5	H1'	H2'	H3'	H4'	H5'	H5''
G1	8.11	-	5.77	4.73	4.61	4.40	4.08	3.94
C2	7.88	5.36	5.74	4.97	4.61	4.43	4.60	4.20
G3	-	-	6.06	4.92	4.39	4.67	5.29	4.14
G4	7.07	-	5.80	4.68	4.49	4.48	4.45	4.11
C5	7.58	5.10	5.48	4.71	4.54	4.42	4.46	4.11
G6	7.58	-	5.71	4.47	4.60	4.49	4.55	4.10
G7	7.47	-	5.78	4.42	4.55	4.47	4.55	4.10
C8	7.61	5.28	5.79	3.99	4.18	4.17	4.52	4.03

Tabela 21. Wartości przesunięć chemicznych $\delta(^1\text{H})$ [ppm] dla $\text{G-C}^{\text{Me}}\text{GGCGG-C}$ w buforze zawierającym 10 mM fosforan sodu, 0.1 mM EDTA

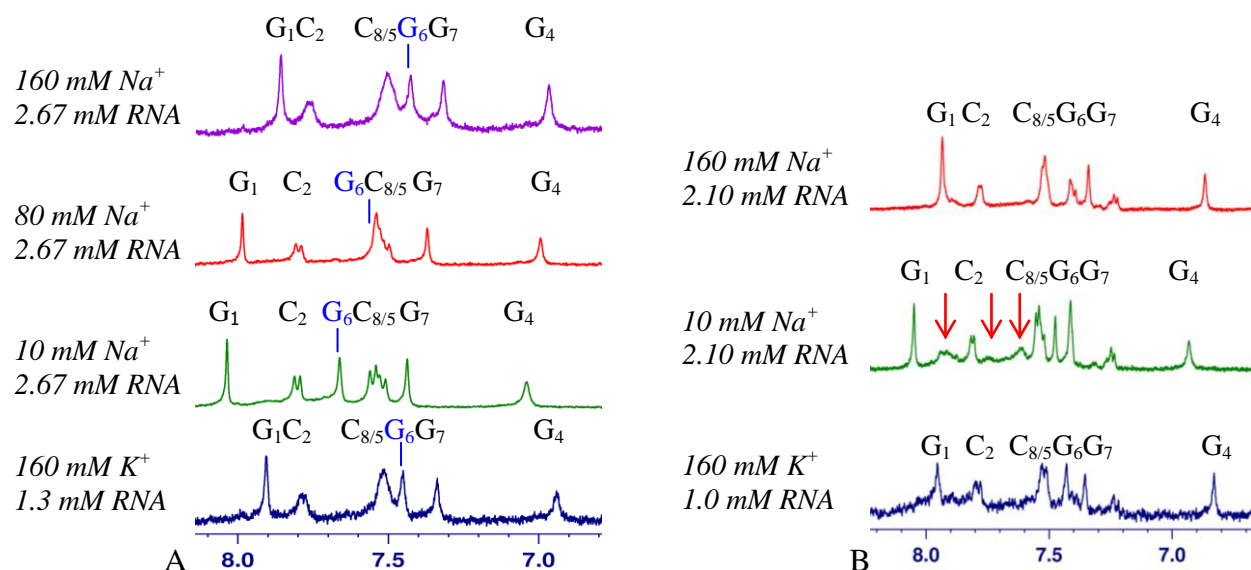
reszta	H8/H6	H5	H1'	H2'	H3'	H4'	H5'	H5''	Me
G1	8.08	-	5.75	4.71	4.6	4.39	4.07	3.92	-
C2	7.84	5.36	5.72	4.96	4.61	4.40	4.57	4.19	-
G3	-	-	6.01	4.69	4.4	4.63	5.27	4.14	2.32
G4	6.97	-	5.77	4.65	4.47	4.47	4.42	4.1	-
C5	7.56	5.08	5.47	4.69	4.52	4.41	4.45	4.1	-
G6	7.51	-	5.7	4.45	4.58	4.46	4.53	4.10	-
G7	7.45	-	5.80	4.42	4.54	4.44	4.54	4.07	-
C8	7.58	5.27	5.78	3.99	4.17	4.18	4.5	4.02	-

W porównaniu do widm zarejestrowanych w roztworze zawierającym oprócz 10 mM fosforanu sodu dodatkowo 150 mM NaCl (tab. 17, 18), największej zmianie ulegają położenia protonów terminalnej reszty **G1**, protonów H5 reszty **C2** oraz protonów H8 reszt **G6** oraz **G7** (rys. 134, tabela 20, 21). Jednak w przypadku cząsteczki $\text{G-C}^{\text{Me}}\text{GGCGG-C}$ silniejszym zmianom ulegają przesunięcia chemiczne protonów H5 reszty **C2**, H8 reszty **G4**, H2' reszty **G3**. W mniejszym stopniu zmiany warunków roztworu odczuwają protony H8 reszt **G6** oraz **G7**.



Rys. 134. Różnice przesunięć chemicznych $\delta(^1H)$ [ppm] w zależności od stężenia jonów sodu dla: $G-C^{Br}GGCGG-C$ (A) oraz $G-C^{Me}GGCGG-C$ (B); (1. 10 mM Na⁺) (2. 160 mM Na⁺), na osi rzędnych zaznaczono różnice większe niż 0.015 ppm, Δ ppm = $\delta(^1H)$ (1) – $\delta(^1H)$ (2)

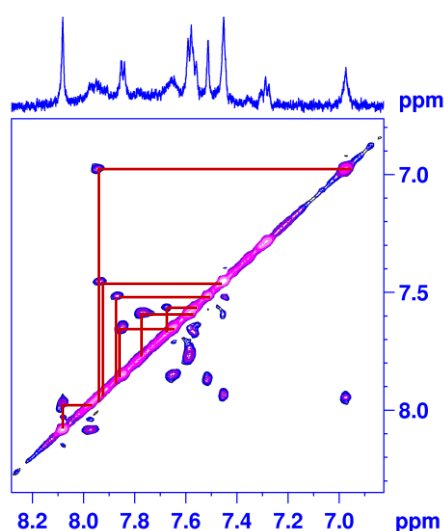
Na rysunku 135 pokazane są fragmenty widm 1H NMR zarejestrowanych w D_2O , w zależności od rodzaju i stężenia soli, obejmujące zakres protonów aromatycznych H8/H6. W tym regionie dla obu cząsteczek **1** i **3**, obserwovałam zależne od stężenia NaCl przesunięcie linii rezonansowych reszt **G1**, **G4**, **G6** i **G7** w kierunku wyższego pola (rys. 135). Położenie sygnału pochodzącego od atomu H8 reszty **G6** cząsteczki **1** jest bardzo czułe na zmianę stężenia NaCl (rys. 135 A, kolor niebieski).



Rys. 135. Fragment widm 1H NMR obejmujący rejon aromatycznych atomów wodoru dla $G-C^{Br}GGCGG-C$ (A) oraz $G-C^{Me}GGCGG-C$ (B) w zależności od rodzaju i stężenia soli; strzałkami oznaczyłam dodatkową formę obecną w roztworze; [D_2O , 25°C]

W obecności kationów potasu, pomimo dwukrotnie mniejszego stężenia RNA, także obserwovałam diamagnetyczne przesunięcie sygnałów aromatycznych atomów wodoru, równe co do wartości przesunięciom obserwowanym w widmie zarejestrowanym w obecności 150 mM NaCl. Wynik ten sugeruje, że w obecności kationów potasu kwadrupleks powstaje łatwiej. Natomiast, dla cząsteczki **3** w roztworze zawierającym jedynie 10 mM stężenie kationów Na⁺ obserwovałam pojawienie się

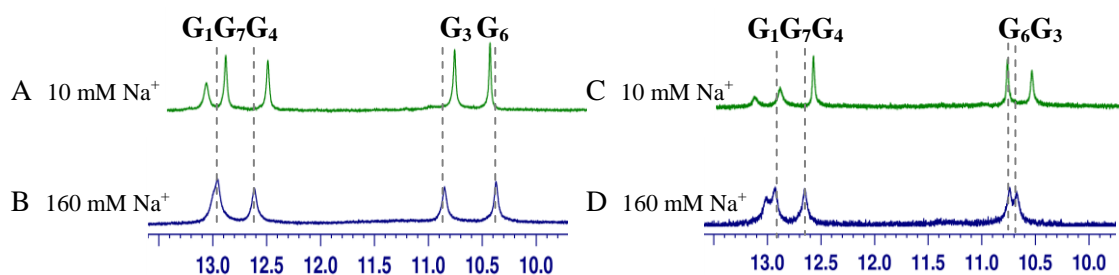
dodatkowych, szerokich sygnałów o małej intensywności, co oznaczyłam strzałkami na rys. 135 B. W porównywalnych warunkach dla cząsteczki $G-C^{Br}GGCGG-C$ dodatkowe sygnały nie były widoczne. W widmie 2D NOESY, zarejestrowanym w tych warunkach dla cząsteczki $G-C^{Me}GGCGG-C$, w rejonie przydiagonalnym obserwowałam sygnały korelacyjne pochodzące od wymiany chemicznej (rys. 136). Obecność tych sygnałów świadczyło o wolnej, w skali czasu NMR, wymianie pomiędzy dwiema formami współistniejącymi w roztworze. Niestety, nie istnieje żadna metoda NMR, która w jednoznaczny sposób mogłaby rozstrzygnąć, jaka dodatkowa forma powstaje w tych warunkach. Jedynie obecność dodatkowych sygnałów korelacyjnych $H1'-H2'$ w widmie 2D COSY wskazywała na obecność formy, w której wiele reszt rybozy występuje w konformacji $C2'-endo$, co jest najczęściej obserwowane dla nieuporządkowanej formy jednoniciowej.



Rys. 136. Region przydiagonalny widma 2D NOESY dla $G-C^{Me}GGCGG-C$; liniami połączyłam sygnały pochodzące od wymiany chemicznej. Widmo wykonano w D_2O w buforze fosforanowym o stężeniu 10 mM Na^+ , w temperaturze 25°C .

Wynik ten jest zgodny z danymi otrzymanymi z widm CD (rys. 100 A), w których dla cząsteczki **3** obserwowałam zmiany w zależności od stężenia kationów Na^+ . Niższa amplituda w widmie CD dla 10 mM stężenia kationów Na^+ , dla cząsteczki $G-C^{Me}GGCGG-C$, mogła wynikać z obecności pewnej frakcji formy jednoniciowej.

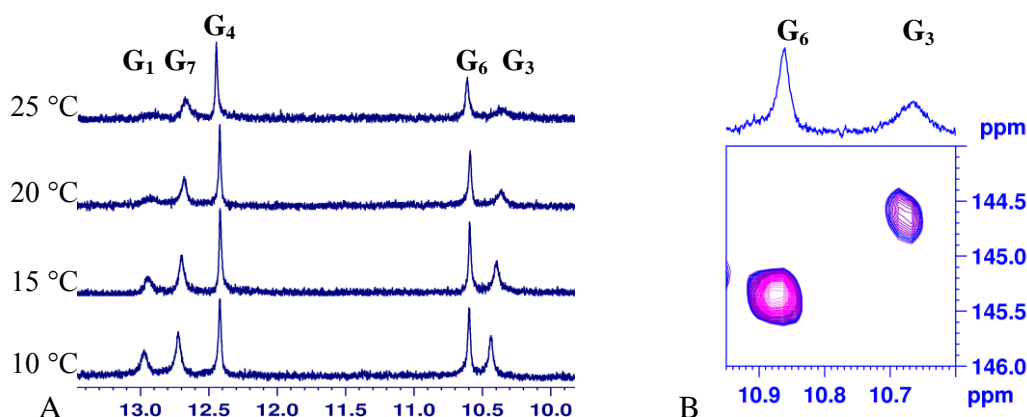
Dla obu badanych cząsteczek, w widmach wykonanych w H_2O (rys. 137), w obecności 10 mM stężenia kationów Na^+ , obserwowałam dwa intensywne sygnały w zakresie $11.10\text{--}10.50\text{ ppm}$. Za pomocą widm $^1\text{H}\text{--}^{15}\text{N}$ HSQC potwierdziłam, iż sygnały te pochodzą od protonów iminowych reszt **G3** oraz **G6** (rys. 138 B). Obecność tych charakterystycznych sygnałów wskazywała, że również w niskim stężeniu kationów Na^+ dominującą strukturą w roztworze jest kwadrupleks. Dodatkowym argumentem przemawiającym za tworzeniem się formy czteroniciowej był efekt diamagnetyczny obserwowany dla sygnałów pochodzących od iminowych atomów wodoru wraz ze wzrostem stężenia soli (rys. 137).



Rys. 137. Rejon iminowy widm ^1H NMR dla: $G\text{-C}^{\text{Br}}\text{GGCGG-C}$ (A, B) oraz $G\text{-C}^{\text{Me}}\text{GGCGG-C}$ (C, D) w zależności od stężenia soli: 10 mM Na^+ (A, C), 160 mM Na^+ (B, D); [H_2O , 10°C]

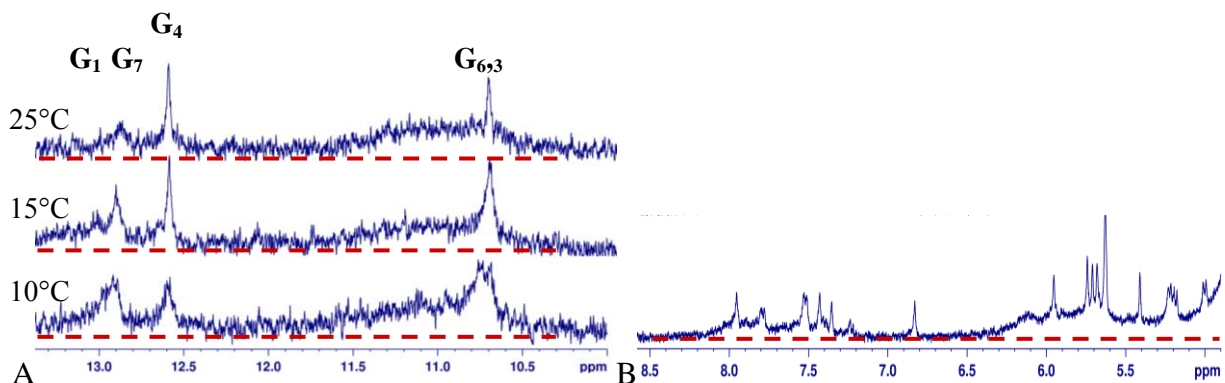
Słabe i szerokie sygnały pochodzące od dodatkowej formy, które pojawiały się w widmach cząsteczki **3** wykonanych w D_2O były niewidoczne w widmach zarejestrowanych w H_2O . Może to wynikać z szybkiej wymiany z wodą iminowych atomów wodoru pochodzących od formy nieuporządkowanej i/lub odfiltrowania z widma szerokich sygnałów w wyniku zastosowanej metody wygaszania wody [WATERGATE, (213)].

W roztworze zawierającym jedynie 10 mM fosforan sodu kwadrupleks utworzony z czterech nici $G\text{-C}^{\text{Me}}\text{GGCGG-C}$ jest również dość trwały, pomimo obecności dodatkowej formy. Sygnał pochodzący od protonu $\text{G}_3\text{-NH1}$ jest widoczny jeszcze w temperaturze 25°C (rys. 138 A).



Rys. 138. Zależność temperaturowa widm ^1H NMR dla $G\text{-C}^{\text{Me}}\text{GGCGG-C}$, [H_2O] (A), Fragment widma $^1\text{H}\text{-}^{15}\text{N}$ HSQC przedstawiający sygnały korelacyjne od protonów iminowych pary zasad $^{\text{Me}}\text{G}:\text{G}$ (B)

Gdy dla cząsteczki **3** zarejestrowałam widma w buforze potasowym (160 mM K^+), w całym zakresie widma pojawiły się bardzo szerokie sygnały (rys. 139 A, B), pochodzące prawdopodobnie od agregatów powstających w wyniku niespecyficznego asocjacji kwadrupleksów.

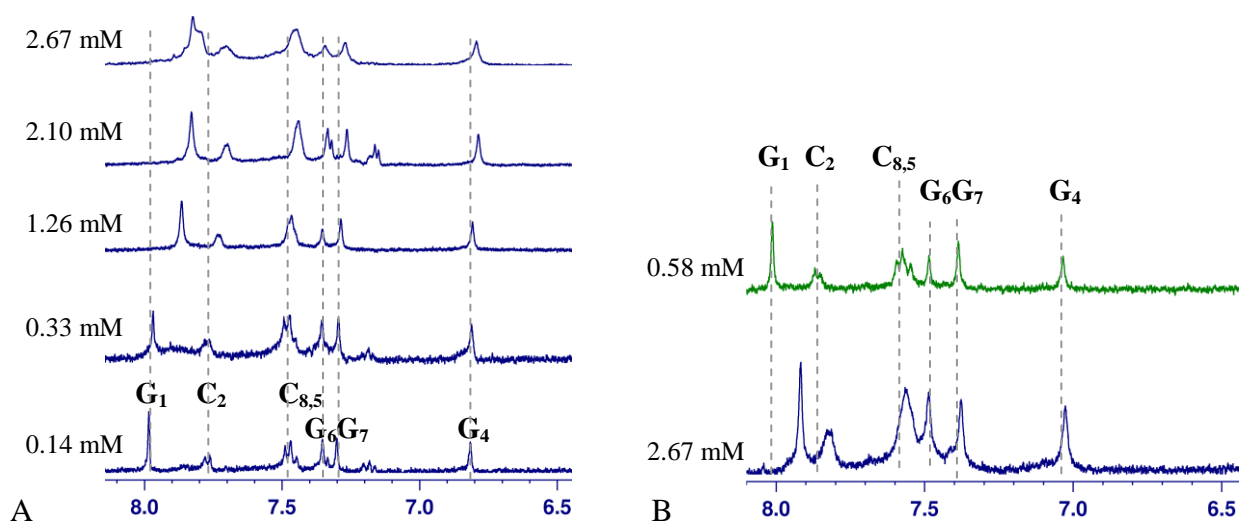


Rys. 139. Zależność temperaturowa widm ^1H NMR, $[\text{H}_2\text{O}, 160 \text{ mM K}^+]$ (A) oraz fragment widma ^1H NMR w D_2O (B) dla $\text{G-C}^{\text{Me}}\text{GGCGG-C}$. Dla uwypuklenia szerokich sygnałów przerywaną linią zaznaczyłam linię bazową.

Kluczowe dla potwierdzenia struktury kwadrupleksu sygnały pochodzące od atomów wodoru **G3-NH1** i **G6-NH1** nakładają się w temperaturze powyżej 10°C , co oprócz obecności szerokich sygnałów dodatkowo utrudniało interpretację widm. Nakładanie się sygnałów potwierdziłam analizując widmo 2D NOESY. Dla sygnału przy ~ 10.7 ppm, oprócz sygnałów korelacyjnych typowych dla reszty **G6** jak np. **G6:NH1-G3:CH₃**, obserwowałam także charakterystyczny dla reszty **G3** sygnał korelacyjny **G3:NH1-G3:NH_{2,1,2}**. Porównanie sygnałów korelacyjnych występujących w widmach 2D NOESY wykonanych w obecności kationów Na^+ i K^+ pozwoliło mi stwierdzić, że w roztworze zawierającym kationy K^+ powstającą główną formą jest także kwadrupleks.

III.2.4. Wpływ stężenia RNA na widma ^1H NMR cząsteczek RNA zawierających modyfikację $^{\text{Me}}\text{G}$ lub $^{\text{Br}}\text{G}$

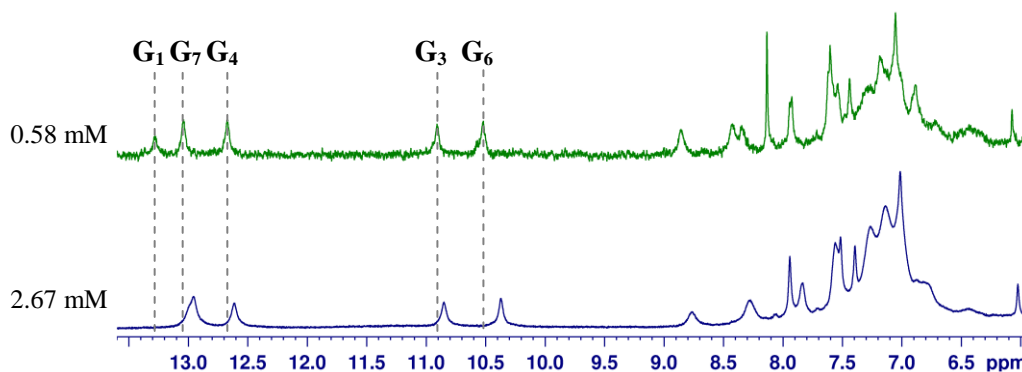
Poniżej pokazałam zmiany obserwowane w widmach ^1H NMR w zależności od stężenia RNA dla cząsteczek $\text{G-C}^{\text{Me}}\text{GGCGG-C}$ oraz $\text{G-C}^{\text{Br}}\text{GGCGG-C}$ (rys. 140).



Rys. 140. Zmiany przesunięć chemicznych w widmach ^1H NMR obserwowane dla $\text{G-C}^{\text{Me}}\text{GGCGG-C}$ (**3**) oraz $\text{G-C}^{\text{Br}}\text{GGCGG-C}$ (**1**) wywołane wzrostem stężenia RNA; $[\text{D}_2\text{O}, 25^\circ\text{C}]$

Wzrost stężenia RNA dla cząsteczki **3**, podobnie jak wzrost stężenia kationów sodu, wpływa na przesunięcie linii rezonansowych wszystkich reszt nukleotydowych w kierunku niższych wartości ppm

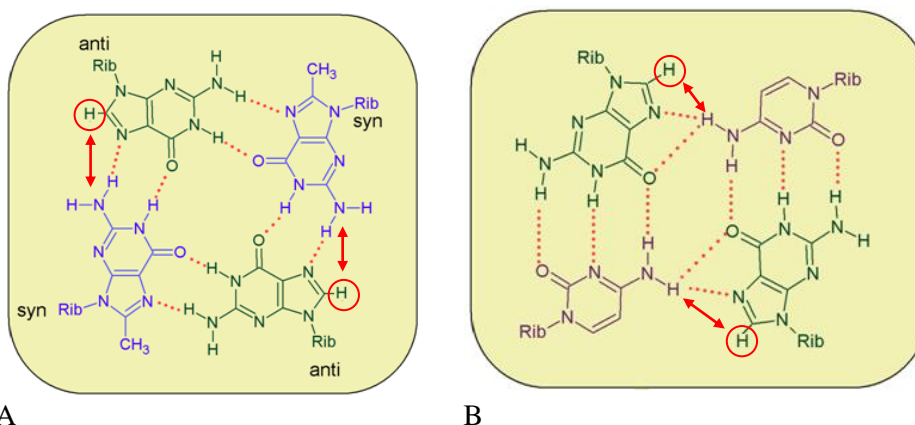
(rys. 140). W przypadku cząsteczki **1** przesunięciu ulegają głównie sygnały reszt **G1** i **C2**. Podobny efekt zaobserwowałam dla sygnałów iminowych atomów wodoru, co pokazane jest na rysunku 141.



Rys. 141. Zmiany przesunięć chemicznych w widmach ^1H NMR dla $\text{G-C}^{\text{Br}}\text{GGCGG-C}$ wywołane wzrostem stężenia RNA; [H_2O , 10°C]

W wyższych stężeniach RNA, czyli w warunkach sprzyjających asocjacji dupleksu do kwadrupleksu, dla cząsteczek **1** i **3** obserwowałam diamagnetyczne przesunięcia sygnałów. Wraz ze wzrostem stężenia RNA oraz stężenia kationów Na^+ obserwowałam przesunięcie równowagi w stronę formy czteroniciowej. Obecność kationów K^+ zazwyczaj sprzyja powstawaniu kwadrupleksów, jednak w tych warunkach dodatkowo tworzyły się struktury wyższych rzędów, więc do dalszych badań metodami NMR korzystniejsze było stosowanie kationu Na^+ .

Podczas asocjacji dwóch dupleksów do kwadrupleksu zmienia się otoczenie chemiczne protonów aromatycznych wszystkich reszt guanozyny. W wyniku asocjacji atom H8 reszty **G6** znajduje się w bliskiej odległości do grup aminowych reszt $^{\text{Me}}\text{G3}$ lub $^{\text{Br}}\text{G3}$ (rys. 142 A), natomiast atomy wodoru H8 reszt **G1**, **G4**, i **G7** uczestniczące w tworzeniu tetrad G:C:G:C znajdują się w niewielkiej odległości do protonów aminowych reszt cytydyn (rys. 142 B).



Rys. 142. Schemat G-tetrady (A) oraz mieszanej tetrady G:C:G:C (B), zaznaczyłam aromatyczne atomy wodoru w resztach guanozyny oraz grupy aminowe w ich bliskim sąsiedztwie

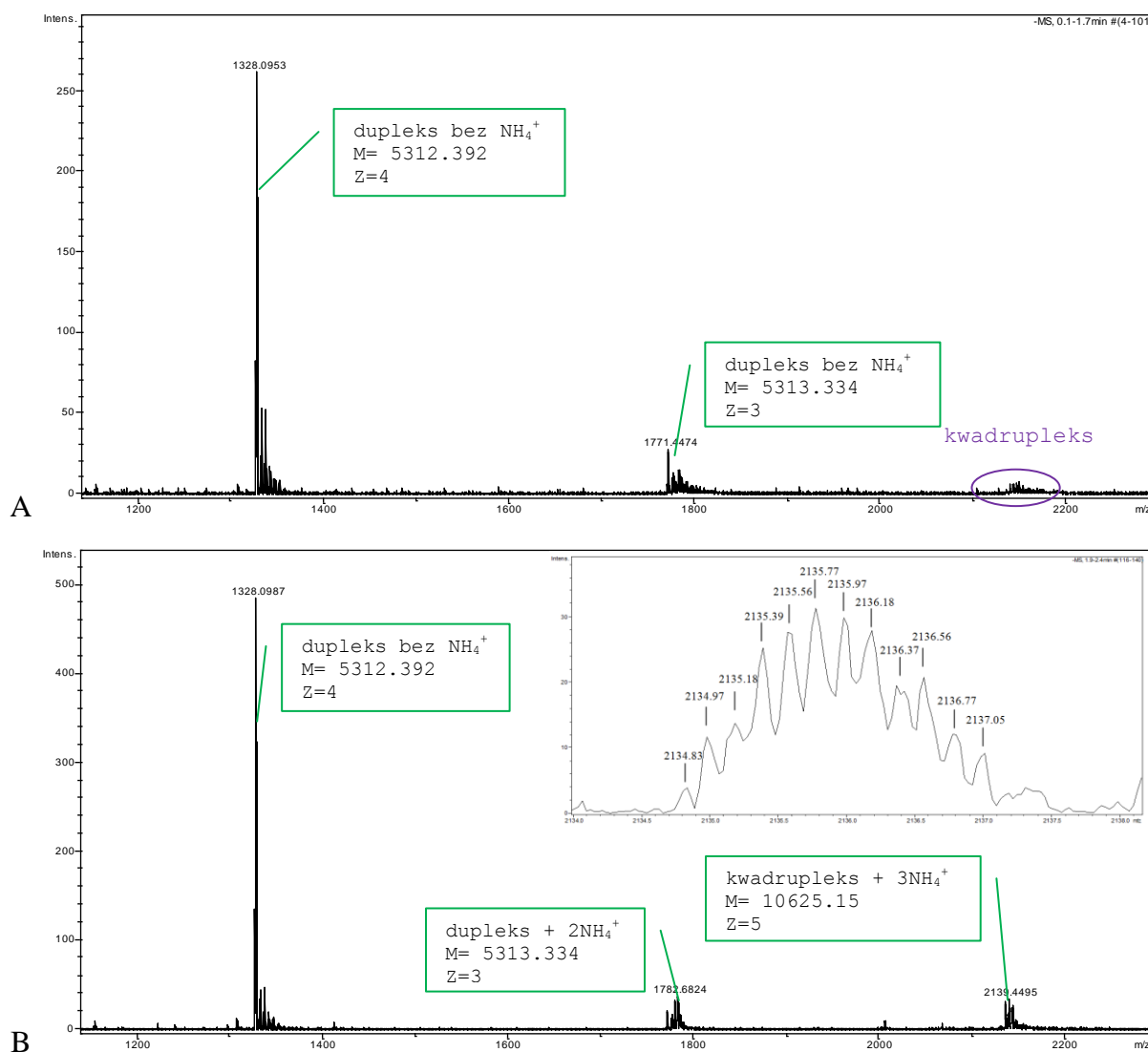
Wymiana pomiędzy formą dupleksu a kwadrupleksu jest szybka w skali czasu NMR i we wszystkich przebadanych przeze mnie warunkach sygnały pochodzące od obu tych form uśredniały się.

III.2.5. Widma masowe cząsteczek RNA zawierających modyfikację ^{Me}G lub ^{Br}G

Do tej pory nie jest znana żadna struktura antyrównoległego, czteroniciowego kwadrupleksu z pojedynczą G-tetradą. Ponieważ w widmach NMR nie obserwowałam większości spodziewanych dla takiej struktury sygnałów, dlatego aby mieć całkowitą pewność, że cząsteczki **1** i **3** tworzą kwadrupleks, poszukiwałam niezależnej w stosunku do spektroskopii NMR metody, która jednoznacznie potwierdziłaby powstawanie zaproponowanej przeze mnie wcześniej formy. Taki niepodważalny dowód świadczący o zawiązywaniu się struktury czteroniciowej dla cząsteczek **1** i **3** otrzymałam przy użyciu spektrometrii mas. Jak już wcześniej wspominałam w rozdziale II.3.5 nawet dla typowych, bardzo trwałych kwadrupleksów (temp. topnienia > 90°C) eksperyment ten wymaga odpowiedniego doboru parametrów. Tym bardziej, w przypadku znajdujących się w szybkiej wymianie form dupleksu i kwadrupleksu, znalezienie właściwych warunków pomiaru miało kluczowe znaczenie dla detekcji interesującej mnie formy. Okazało się, że aby zarejestrować sygnał od form czteroniciowych (G-C^{Br}GGCGG-C)₄ i (G-C^{Me}GGCGG-C)₄, należało obniżyć temperaturę pomiaru aż o ok. 50°C w stosunku do parametrów zalecanych dla typowych kwadrupleksów. Pomimo trudności, dzięki pomocy dr Łukasza Marcza z Zespołu Biochemii Roślinnych Metabolitów Wtórnych ICHB PAN, dla cząsteczek **1** oraz **3** potwierdziłam tworzenie się kwadrupleksu w obecności kationów amonowych. Wraz ze wzrostem stężenia RNA narastała intensywność pików kwadrupleksu. Dla ~ 5 μM roztworu G-C^{Br}GGCGG-C obserwowałam tylko śladowy pik od formy czteroniciowej (rys. 143 A), natomiast w widmie masowym wykonanym dla ~70 μM próbki RNA (**1**) widoczny był wyraźny pik odpowiadający tej formie, która związała trzy jony NH₄⁺ (rys. 143 B). We wszystkich widmach MS masy cząsteczkowe RNA zostały wyliczone według wzoru: $m/z = [M_{\text{RNA}} + n \times 17 - z]/z$ (n - liczba NH₄⁺, z - ładunek).

Monoizotopowe masy cząsteczkowe dla poszczególnych form G-C^{Br}GGCGG-C oraz G-C^{Me}GGCGG-C wynoszą:

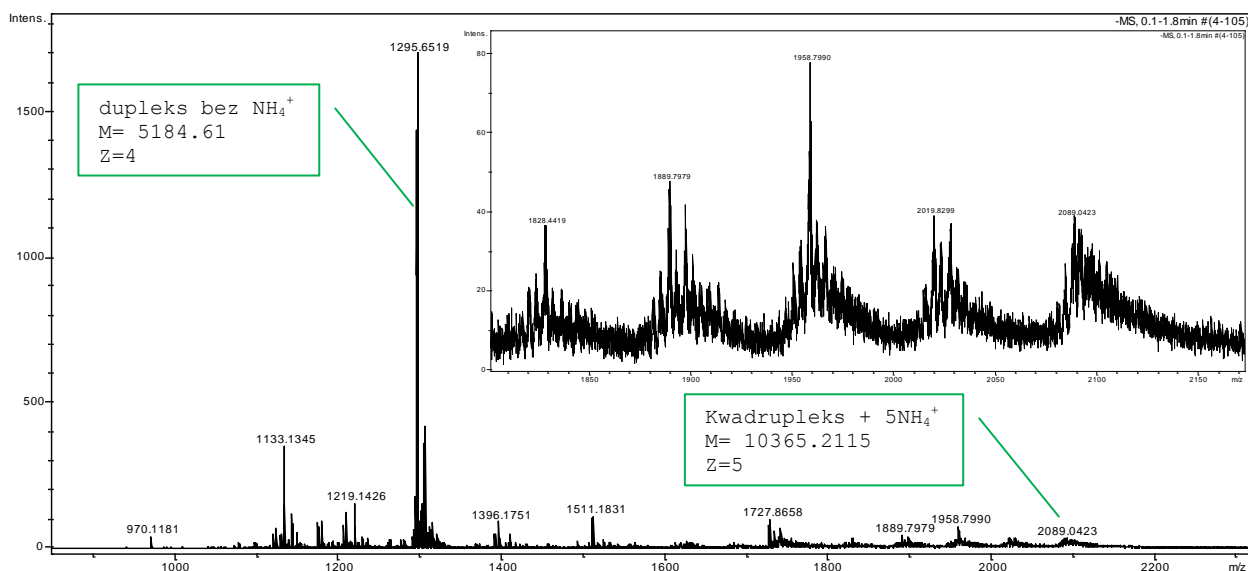
	G-C ^{Br} GGCGG-C	G-C ^{Me} GGCGG-C
[M] pojedyncza nić	2656.3158	2592.4209
[M] dupleks	5312.6316	5184.418
[M] kwadrupleks	10625.2632	10368.836



Rys. 143. Widmo masowe cząsteczki $\text{G-C}^{\text{Br}}\text{GGCGG-C}$ w obecności kationów amonowych; jonizacja poprzez elektrorozpraszanie: stężenie RNA $\sim 5 \mu\text{M}$ (A), $\sim 70 \mu\text{M}$, (B)

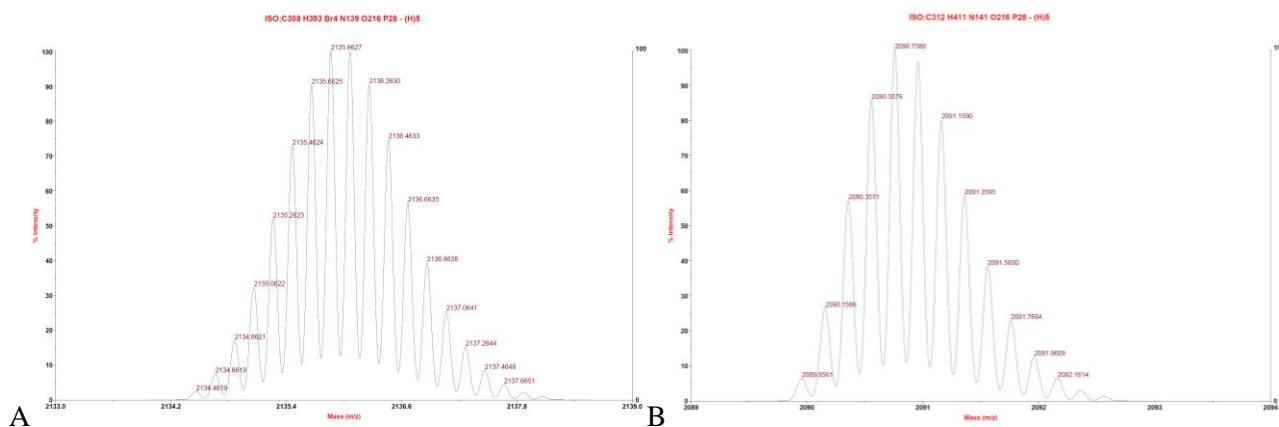
Chociaż widmo masowe uzyskane dla cząsteczki **3** (rys. 144) było znacznie gorsze niż dla cząsteczki **1**, jednak i w tym przypadku udało mi się potwierdzić obecność pików pochodzącego od kwadrupleksu, który związał pięć kationów NH_4^+ . Mniej jednoznaczne wyniki uzyskane dla cząsteczki **3** mogą wynikać na przykład z faktu, że cząsteczka ta może trudniej tworzyć kwadrupleks w obecności jonów amonowych oraz metanolu.

Ze względu na stosunkowo skomplikowaną syntezę cząsteczki $\text{G-C}^{\text{Me}}\text{GGCGG-C}$, do eksperymentów metodą elektrorozpraszania mogłam przeznaczyć mniejszą ilość związku, niż w przypadku cząsteczki zawierającej modyfikację BrG . Ponieważ dla zarejestrowania widma pokazanego na rys. 144 zużyłam bezpowrotnie cały materiał przeznaczony na ten cel, eksperymentu nie powtarzałam. Zależało mi przede wszystkim na potwierdzeniu tworzenia się kwadrupleksu także przez tą cząsteczkę i ten cel udało mi się zrealizować.



Rys. 144. Widmo masowe cząsteczki $G-C^{Me}GGCGG-C$ [$\sim 70 \mu M$] w obecności kationów amonowych; jonizacja poprzez elektrorozpraszanie

Zespoły pików molekularnych pochodzące od formy kwadrupleksu dla cząsteczek **1** i **3** zgadzały się z tymi obliczonymi teoretycznie (rys. 145).

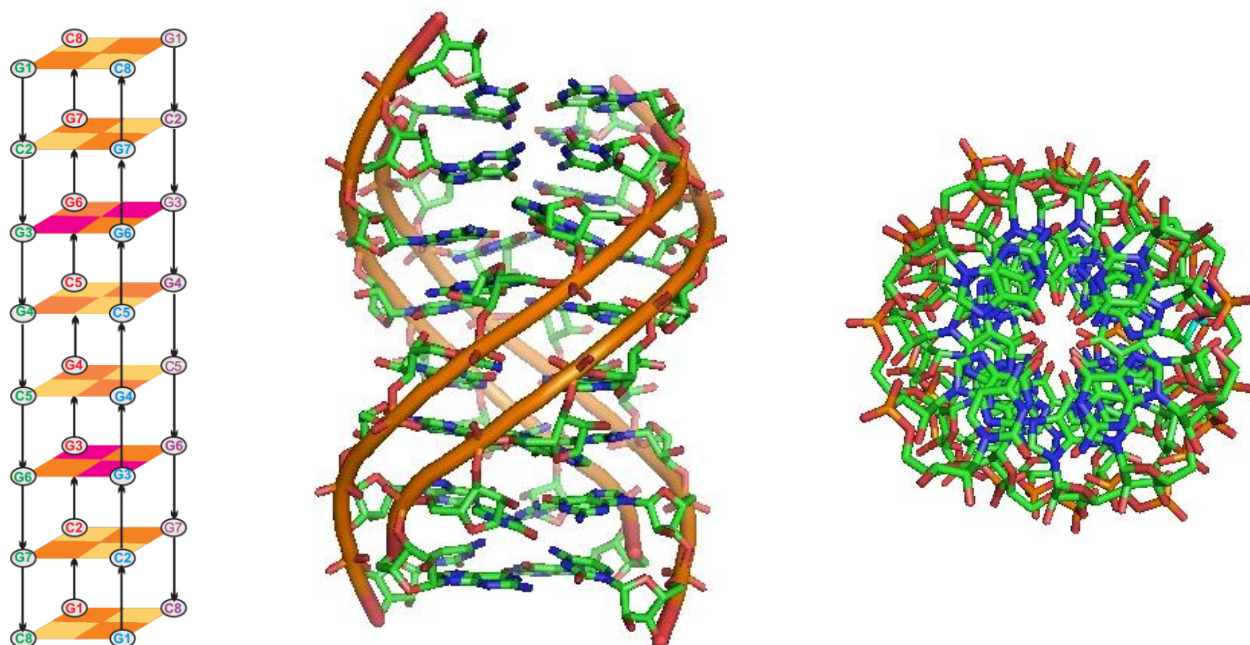


Rys. 145. Zespół pików molekularnych wyliczony teoretycznie dla $(G-C^{Br}GGCGG-C)_4 + 3NH_4^+$ (A), $(G-C^{Me}GGCGG-C)_4 + 5NH_4^+$ (B)

III.2.6. Model struktury antyrównoległego kwadrupleksu

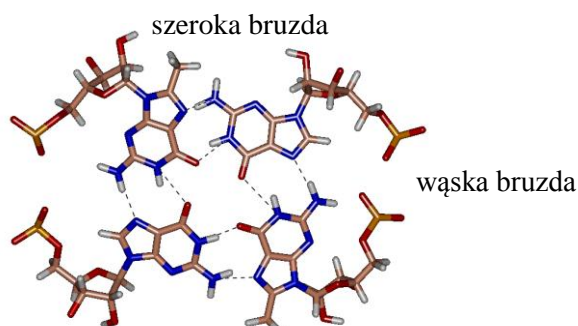
W oparciu o widma NMR, MS oraz na podstawie analizy profilu migracji oktamerów G-C^{Br}GGCGG-C i G-C^{Me}GGCGG-C w żelu poliakrylamidowym w warunkach niedenaturujących pokazałam, że dominującą formą cząsteczek **1** i **3** jest struktura kwadrupleksu. W roztworze cztery nici RNA asocjują tworząc antyrównoległe, helikalne kwadrupleksy (rys. 146) zbudowane z tetrad G:(^{Br/Me}G):G:(^{Br/Me}G) przedzielonych dwiema tetradami G:C:G:C (rys. 129). W tetradach G:(^{Br/Me}G):G:(^{Br/Me}G) obie reszty ^{Br/Me}G przyjmują konformację *syn*, a reszty guanozyny występują w formie *anti*. Struktury tetrad G:C:G:C utworzonych z dwóch par Watsona-Cricka stabilizowane są prawdopodobnie siecią wiązań wodorowych, w które zaangażowana jest krawędź Hoogsteena reszt guanozy oraz grupa aminowa reszt cytydyny.

W oparciu o informacje uzyskane z analizy widm NMR zbudowałam model cząsteczki kwadrupleksu pokazany na rysunku 146.



Rys. 146. Model struktury antyrównoległego kwadrupleksu otrzymany na podstawie analizy widm NMR. Widok z boku (po środku) i wzdłuż osi głównej (po prawej)

W strukturze tej widoczne są cztery bruzdy – dwie szerokie i dwie bardzo wąskie (rys. 147).

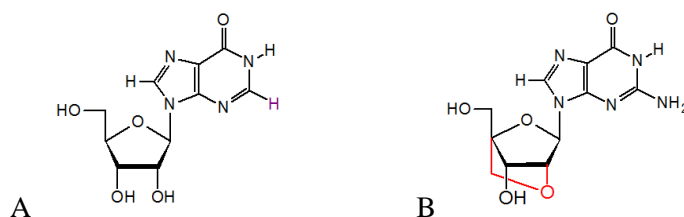


Rys. 147. Szerokości bruzd dla G-tetrad w układzie *syn•anti•syn•anti*.

Kwadrupleks pokazany na rys. 146 jest nietypowy, ponieważ powstaje w wyniku asocjacji dwóch wzajemnie komplementarnych dupleksów. Dowiodłam, że równowaga między formą dupleksu a kwadrupleksu zależy przede wszystkim od takich czynników jak: typ modyfikacji (^{Br/Me}G), rodzaj kationu i jego stężenie, stężenie RNA czy temperatura pomiaru. W przypadku badanych przeze mnie antyrównoległych kwadrupleksów zaobserwowałam, że są one czułe na typ oraz stężenie kationów jednowartościowych, jednak w zależności od tych czynników ich topologia pozostawała niezmienna. W niskim stężeniu kationów sodu oprócz kwadrupleksu powstaje dodatkowo druga nieuporządkowana forma. Obecność kationów potasu promuje z kolei powstawanie struktur wyższych rzędów.

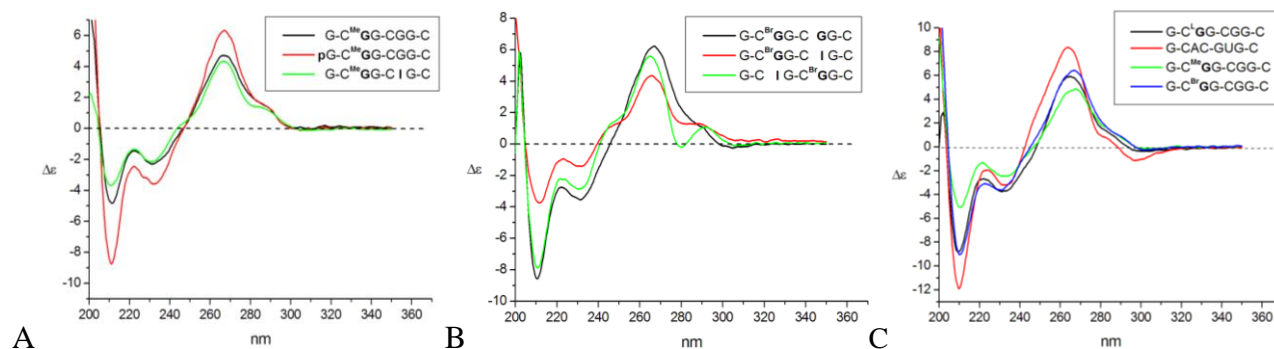
III.3. Analiza cząsteczek RNA zawierających oprócz modyfikacji ^{Me}G i ^{Br}G dodatkowo resztę inozyny lub grupę fosforanową na końcu 5'

W dalszym etapie badań zamierzałam sprawdzić, jak inne modyfikacje zasad heterocyklicznych lub reszty cukrowej wpłyną na równowagę konformacyjną dupleks - kwadrupleks. W tym celu otrzymałam różne cząsteczki RNA, z których najważniejsze to G-C^{Me}GGCIG-C (4), G-C^{Br}GGCIG-C (5), G-CIGC^{Br}GG-C (6), pG-C^{Me}GGCGG-C (7), pG-C^{Br}GGCGG-C (8) oraz G-C^LGGCGG-C (9), które oprócz reszt ^{Br/Me}G zawierały dodatkowe modyfikacje takie jak reszta inozyny (I), grupa fosforanowa na końcu 5' (p) lub reszta LNA-G (^LG) zamiast ^{Br/Me}G (rys. 149). Najbardziej interesującym zagadnieniem z punktu widzenia badań struktury RNA było sprawdzenie, czy cząsteczki te także będą wykazywały tendencję do asocjacji prowadzącej do tworzenia kwadrupleksów. Brak grupy aminowej na atomie węgla C2 w resztach inozyny może wpływać znacząco na tworzące się struktury. Pomimo, iż inozyna posiada słabszy niż guanozyna potencjał do tworzenia wiązań wodorowych, to znane są tetrazy utworzone z czterech reszt inozyny (23), analogiczne do G-tetrad, jednakże wprowadzenie reszty inozyny do G-tetrazy zazwyczaj silnie ją destabilizuje (214).



Rys. 149. Wzory strukturalne modyfikowanych rybonukleozydów: inozyny (A) LNA- guanozyny (B)

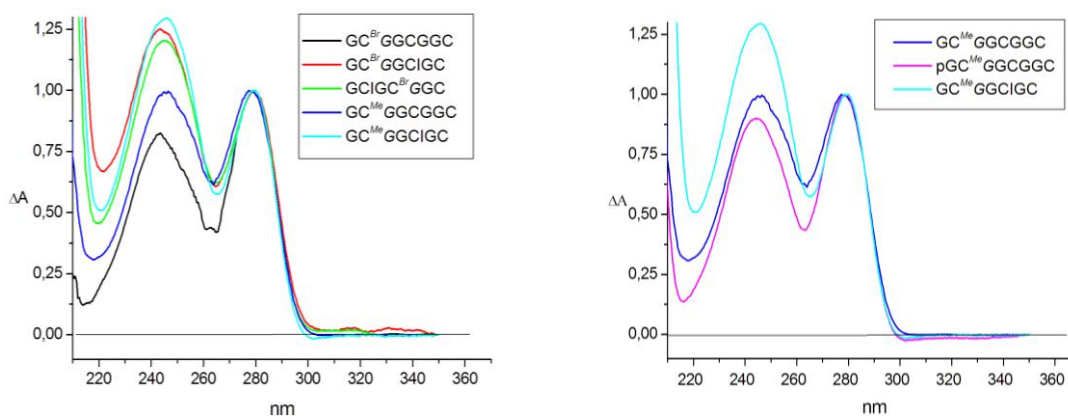
Również i tym razem wstępne informacje o strukturze cząsteczek 4-9 uzyskałam z widm dichroizmu kołowego, różnicowych widm UV oraz z analizy krzywych topnienia. W widmach CD zarejestrowanych dla tych cząsteczek, podobnie jak uprzednio dla cząsteczek G-C^{Me}GGCGG-C oraz G-C^{Br}GGCGG-C, obserwowane pasma występowały przy długościach fal charakterystycznych dla dupleksów RNA (rys. 150). Jako wzorec duplexu posłużyła mi cząsteczka o sekwencji wzajemnie komplementarnego duplexu, G-CAGGUG-C (rys. 150 C).



Rys. 150. Widma dichroizmu kołowego (CD) zarejestrowane dla cząsteczek RNA o sekwencjach podanych w legendzie [10 mM fosforan sodu, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, pH=6.8].

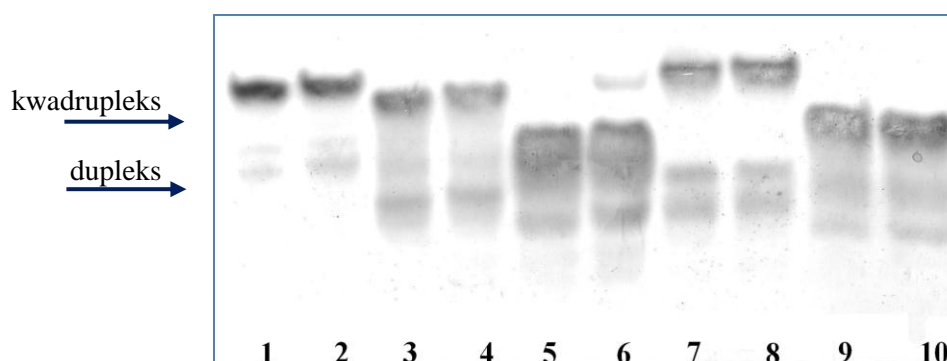
Dotychczas nie jest znane żadne widmo CD kwadrupleksu RNA o topologii pokazanej na rys. 146 lub zawierającego tylko pojedynczą G-tetradę, zatem również dla cząsteczek o sekwencjach $G-C^{Me}GGCIG-C$, $G-C^{Br}GGCIG-C$, $G-CIGC^{Br}GG-C$, $pG-C^{Me}GGCGG-C$, $pG-C^{Br}GGCGG-C$ oraz $G-C^LGGCGG-C$, na podstawie widm CD nie mogłam stwierdzić, czy pasma obserwowane przy ~ 210 nm, 240 nm oraz 260 nm pochodzą od dupleksu, czy też od kwadrupleksu z pojedynczą G-tetradą.

Także w absorpcyjnych widmach różnicowych nie zaobserwowałam charakterystycznego dla kwadrupleksów ujemnego pasma przy 295 nm, natomiast zależnie od badanej sekwencji, zmieniała się intensywność pasma przy ~ 245 nm. Dla cząsteczek zawierających resztę inozyny pasmo przy ~ 245 nm było znacznie bardziej intensywne niż dla cząsteczek $G-C^{Br}GGCGG-C$ oraz $G-C^{Me}GGCGG-C$ (rys. 151). Z kolei dla cząsteczki obdarzonej dodatkową grupą fosforanową (**7**) pasmo to było mniej intensywne, niż dla cząsteczki **3**.



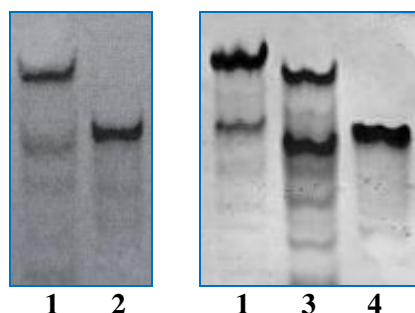
Rys. 151. Temperaturowe widma różnicowe zarejestrowane dla cząsteczek RNA o sekwencjach podanych w legendzie [10 mM fosforan sodu, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, pH=6.8].

Interesujących wyników dostarczyła elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w warunkach niedenaturujących. Na rysunku 152 przedstawiłam eksperyment, w którym porównałam różnice w szybkości migracji cząsteczek $G-C^{Br}GGCGG-C$ (pasma 1-2), $G-C^{Me}GGCGG-C$ (pasma 3-4), z cząsteczkami o sekwencjach $G-C^{Me}GGCIG-C$ (pasma 5-6), $G-C^{Br}GGCIG-C$ (pasma 7-8) oraz $G-CIGC^{Br}GG-C$ (pasma 9-10), w zależności od stężenia soli. Cząsteczka $G-C^{Br}GGCIG-C$, niezależnie od stężenia soli, migruje porównywalnie do cząsteczek tworzących kwadrupleks (rys. 152, pasma 1-4). W warunkach elektroforezy cząsteczka zawierająca modyfikację ^{Me}G i I migruje z szybkością odpowiadającą formie kwadrupleksu dopiero przy dużym stężeniu kationów sodu (rys. 152, pasmo 6). Cząsteczka o sekwencji $G-CIGC^{Br}GG-C$ (rys. 152, pasma 9, 10) niezależnie od stężenia soli migruje szybciej niż cząsteczki wzorcowe i w tych warunkach obserwowałam jedynie pasmo odpowiadające prawdopodobnie szybkości migracji dupleksu.



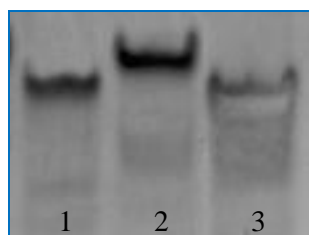
Rys. 152. Profil migracji w żelu natywnym 15% (277 K) cząsteczek RNA utworzonych z trójnukleotydowych powtórzeń CGG (pasma 1-2: $G-C^{Br}GGCGG-C$, pasmo 3-4: $G-C^{Me}GGCGG-C$, pasmo 5-6: $G-C^{Me}GGCIG-C$, pasmo 7-8: $G-C^{Br}GGCIG-C$, pasmo 9-10: $G-CIGC^{Br}GG-C$; cząsteczki w kieszonkach nieparzystych były inkubowane przed nałożeniem na żel w 10 mM buforze fosforanowym, w parzystych dodatkowo z 150 mM NaCl

Jak już wcześniej wspominałam (str. 99-100), wprowadzenie dodatkowej grupy fosforanowej na końcu 5' wpływa na szybszą migrację takiej cząsteczki, co zaobserwowałam podczas eksperymentów, w których stosowałam znakowanie radioizotopem ^{32}P . Dla otrzymanych na drodze syntezy chemicznej cząsteczek posiadających na końcu 5' grupę fosforanową powtórzyłam rozdziały elektroforetyczne w warunkach natywnych. Jak widać na rys. 153 prążki odpowiadające cząsteczkom $pG-C^{Me}GGCGG-C$ oraz $pG-C^{Br}GGCGG-C$, migrują szybciej niż te, które posiadają wolną grupę -OH, co jest związane raczej z obecnością dodatkowego ładunku niż odmienną strukturą.



Rys. 153. Profil migracji w żelu natywnym 15% (277 K) cząsteczek RNA (pasma 1: $G-C^{Br}GGCGG-C$, 2: $pG-C^{Br}GGCGG-C$, 3: $G-C^{Me}GGCGG-C$, 4: $pG-C^{Me}GGCGG-C$)

Cząsteczka o sekwencji $G-C^LGGCGG-C$ zawierająca resztę cukrową typu LNA ($^L G$) migrowała w żelu w warunkach natywnych, z taką samą szybkością jak cząsteczka $G-C^{Me}GGCGG-C$ (rys. 154). Widma CD tych cząsteczek były także podobne (rys. 150). Niestety, widma NMR wykazały współistnienie w roztworze wielu form, więc cząsteczki tej nie analizowałam dalej metodami spektroskopii NMR.

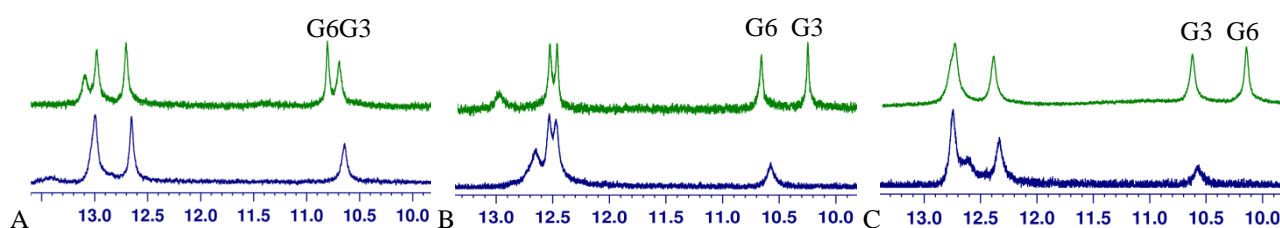


Rys. 154. Profil migracji w żelu natywnym 15% (277 K) cząsteczek RNA (pasma 1: $G-C^{Me}GGCGG-C$, 2: $G-C^{Br}GGCGG-C$, 3: $G-C^LGGCGG-C$)

Informacji o strukturze cząsteczek **4-9**, uzyskanych z analizy profilu migracji w żelu, nie można było bezpośrednio przełożyć na ogólną preferencję tych cząsteczek do tworzenia analogicznych struktur w innych warunkach pomiaru. Inne czynniki, które mogą wpływać na szybkość migracji, jak na przykład obecność dodatkowej grupy fosforanowej, znacznie utrudniały wyciągnięcie jednoznacznych wniosków o typie powstających struktur. Stężenia RNA stosowane w rozdzielach elektroforetycznych są dużo niższe niż stężenia stosowane w spektroskopii NMR. Jeśli cząsteczki **4-9** tworzyłyby kwadrupleks w wyniku wzajemnej asocjacji dwóch dupleksów, to szybkość takiej asocjacji silnie zależałaby od stężenia RNA.

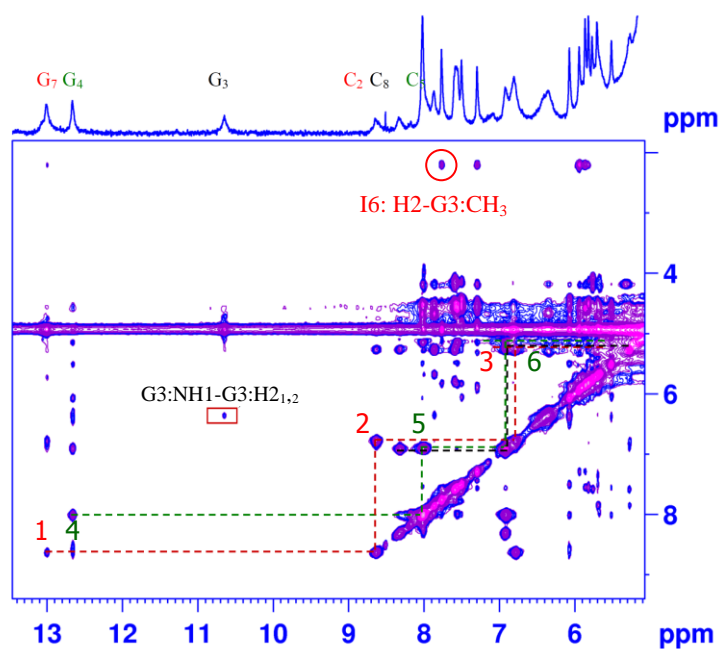
Od samego początku, gdy analizowałam cząsteczki zawierające podwójne modyfikacje ^{Me}G i I, ^{Br}G i I oraz I i G^{Br} lub dodatkową grupę fosforanową na końcu 5' zadawałam sobie pytanie, czy ich obecność wpływa na zmianę konformacji w stosunku do cząsteczek G-C^{Me}GGCGG-C, G-C^{Br}GGCGG-C oraz G-CGGC^{Br}GG-C? Poszukując odpowiedzi na to pytanie wykorzystałam spektroskopię NMR.

Na rysunku 155 zestawione są kolejno widma NMR cząsteczek G-C^{Me}GGCGG-C i G-C^{Me}GGCIG-C, G-CGGC^{Br}GG-C i G-CIGC^{Br}GG-C oraz G-C^{Br}GGCGG-C i G-C^{Br}GGCIG-C. Jak widać, położenia sygnałów w widmach cząsteczek zawierających jedną modyfikację, ^{Br}G lub ^{Me}G, oraz cząsteczek posiadających w swojej sekwencji dodatkowo resztę inozyny są bardzo podobne. We wszystkich trzech przypadkach można było zaobserwować zanik jednego z sygnałów (**I3-NH1** lub **I6-NH1**). Porównanie widm wskazywało, że sygnał widoczny przy ~10.6 ppm pochodził najprawdopodobniej od reszty **G3** w przypadku cząsteczek G-C^{Br}GGCIG-C i G-C^{Me}GGCIG-C, oraz od reszty **G6** cząsteczki G-CIGC^{Br}GG-C (rys. 155).



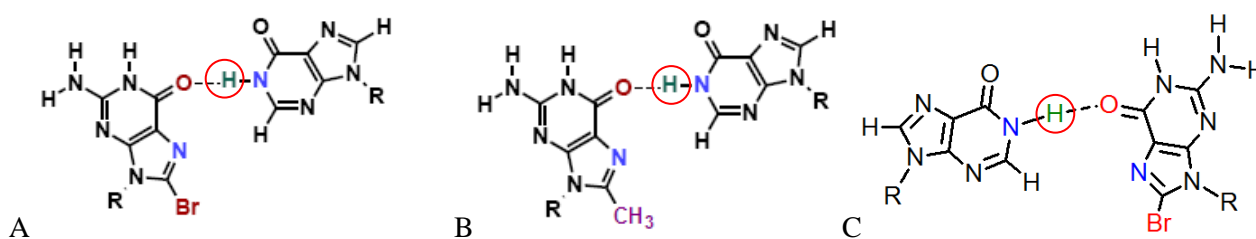
Rys. 155. Porównanie przesunięć chemicznych w zakresie występowania protonów iminowych dla sekwencji: G-C^{Me}GGCGG-C oraz G-C^{Me}GGCIG-C (A), G-CGGC^{Br}GG-C oraz G-CIGC^{Br}GG-C (B), G-C^{Br}GGCGG-C oraz G-C^{Br}GGCIG-C (C); [H₂O] (kolor zielony - cząsteczki **1-3**, kolor granatowy - cząsteczki **4-6**)

Aby upewnić się, że jest to na pewno sygnał iminowy reszty ^{Me}G**3**, a nie reszty **I6** (rys. 155 A), dla cząsteczki G-C^{Me}GGCIG-C wykonałam widmo 2D NOESY. Gdyby sygnał przy ~ 10.6 ppm pochodził od reszty inozyny, należałoby oczekiwać silnego sygnału korelacyjnego do protonu H2 tej reszty. Zamiast tego w widmie widoczna jest korelacja pomiędzy protonem iminowym a aminowym reszty ^{Me}G**3** (rys. 156).



Rys. 156. Fragment widma 2D-NOESY dla $G-C^{\text{Me}}\text{GGCIG-C}$, [H_2O , 15°C]; zaznaczone są sygnały, które posłużyły do przypisania sygnałów protonów wymiennych (kolor czerwony: 1- $G_7:\text{NH1-C}_2:\text{H}_{4,2}$, 2- $C_2:\text{H}_{4,2-C_2}:\text{H}_{4,1}$, 3- $C_2:\text{H}_{4,1-C_2}:\text{H}_5$; kolor zielony: 4- $G_4:\text{NH1-C}_5:\text{H}_{4,2}$, 5- $C_5:\text{H}_{4,2-C_5}:\text{H}_{4,1}$, 6- $C_5:\text{H}_{4,1-C_5}:\text{H}_5$); czerwonym prostokątem zaznaczono sygnał korelacyjny pochodzący od protonu iminowego reszty G_3

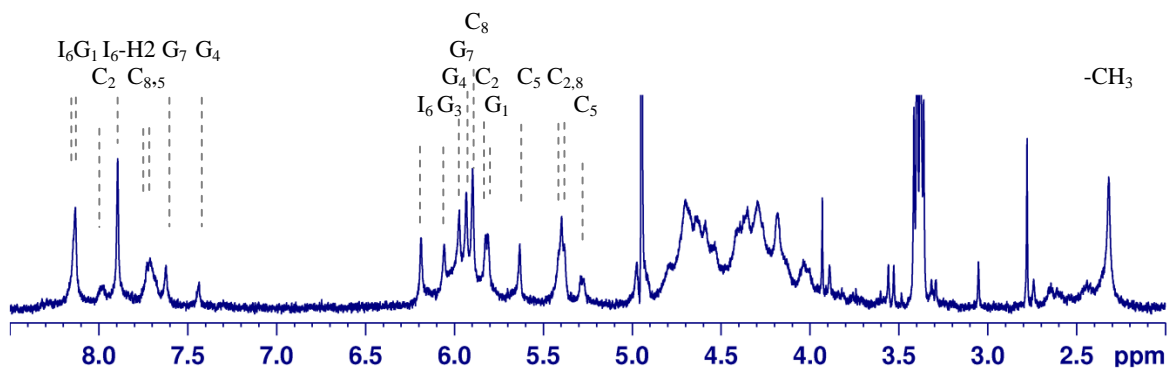
W parach zasad $^{\text{Br}}G_3:I_6$, $^{\text{Me}}G_3:I_6$ oraz $I_3:^{\text{Br}}G_6$, przedstawionych na rys. 157, iminowy atom wodoru reszt **I6** lub **I3** jest zaangażowany w wiązanie wodorowe, a jego sygnał powinien być widoczny w widmach NMR przy ok. 13.5 ppm (141). Należało więc wyjaśnić, czy w przypadku cząsteczek **4-6** rzeczywiście zawiązują się pary zasad $^{\text{Br}}G_3:I_6$, $^{\text{Me}}G_3:I_6$ oraz $I_3:^{\text{Br}}G_6$, analogiczne do pary typu *N1-karbonylo*, *N7-amino*. Z drugiej strony, nie było zrozumiałe, że jeśli inozyna uczestniczyłaby w zawiązywaniu par zasad (rys. 157), to dlaczego w widmach nie obserwowałam sygnałów od iminowych atomów wodoru **I6-NH1** lub **I3-NH1**.



Rys. 157. Pary zasad: $^{\text{Br}}G_3:I_6$ (A), $^{\text{Me}}G_3:I_6$ (B) oraz $I_3:^{\text{Br}}G_6$ (C); w kółku zaznaczyłam atom iminowy reszty **I6** lub **I3**, którego sygnału nie obserwowałam w widmach NMR

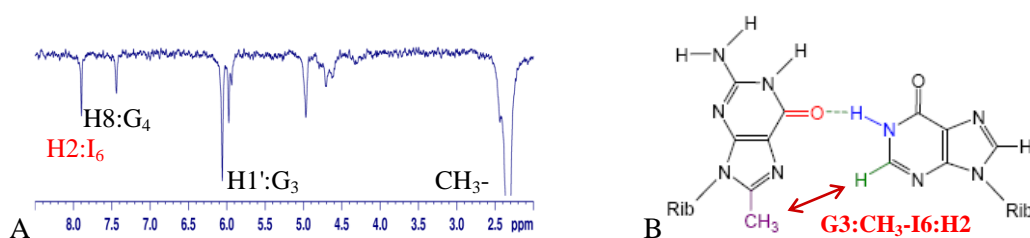
Fakt, że sygnały NH1 reszt inozyny nie były widoczne w widmach NMR wynikać mógł z łatwiejszej dostępności cząsteczek wody do wnętrza ich struktury, prowadząc do szybkiej wymiany protonów iminowych z wodą. Dla porównania, w tetradzie $^{\text{Br/Me}}G:\text{G}:\text{G}:\text{G}$ obecność grupy aminowej, zaangażowanej w tworzenie wiązania wodorowego z atomem azotu N7 reszty $^{\text{Br/Me}}G$, skutecznie chroni atom wodoru NH1 reszt guanozyny przed wymianą z wodą.

Widmo ^1H NMR zarejestrowane dla cząsteczki $\text{G-C}^{\text{Me}}\text{GGCIG-C}$ wraz z przypisaniami najważniejszych sygnałów przedstawiam na rysunku 158. W widmie pojawia się dodatkowo singlet pochodzący od protonu I6-H2.



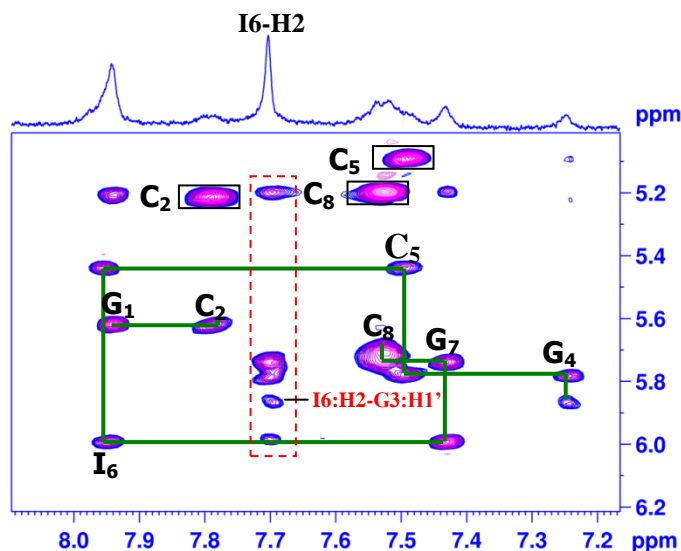
Rys. 158. Widmo ^1H NMR cząsteczki $\text{G-C}^{\text{Me}}\text{GGCIG-C}$ [D_2O , 25°C]

Atom wodoru H2 reszty **I6**, w przeciwieństwie do atomów wodoru grupy aminowej reszty guanozyny **G6**, nie wymienia się na deuter. Dzięki temu mogłam zaobserwować dodatkowe kontakty NOE pochodzące od atomu H2, które dostarczyły mi cennych informacji o strukturze niekanonicznej pary zasad $^{\text{Me}}\text{G3}:\text{I6}$. Na przykład, w przedstawionym na rysunku 159 widmie 1D NOE zaznaczyłam najważniejsze sygnały pochodzące od wzmocnienia NOE, otrzymane w odpowiedzi na naświetlenie sygnału grupy metylowej reszty $^{\text{Me}}\text{G3}$. Pojawienie się sygnału NOE pomiędzy protonem H2 reszty **I6** a grupą metylową reszty $^{\text{Me}}\text{G3}$ potwierdzało powstawanie pary zasad $^{\text{Me}}\text{G}:\text{I}$ (rys. 159), analogicznej do pary $^{\text{Me}}\text{G}:\text{G}$ typu *N1-karboxylo, N7-amino* (rys. 122 B), gdyż tylko dla takiej pary zasad, odległość pomiędzy atomem H2 a atomami wodoru grupy metylowej jest mniejsza niż 5Å .



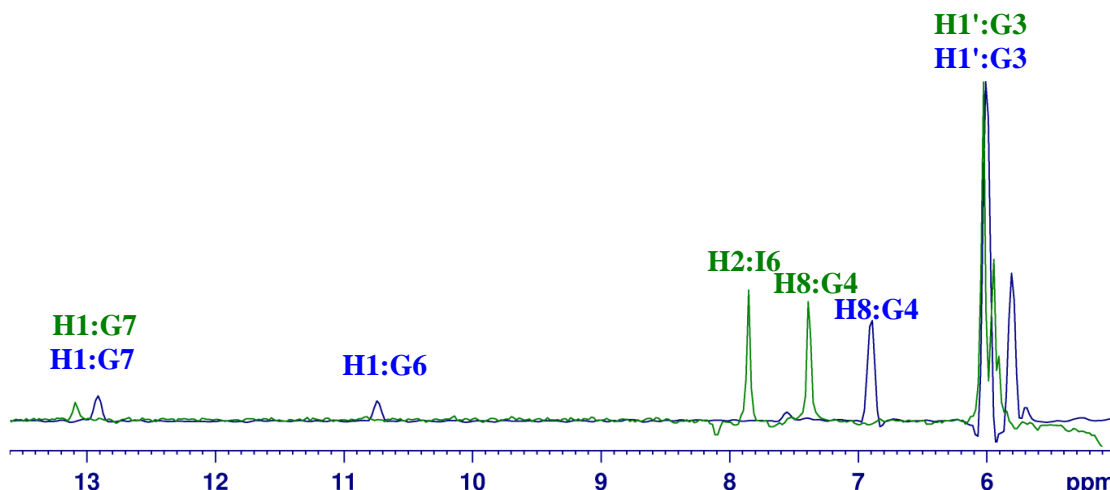
Rys. 159. Widmo 1D NOE zarejestrowane dla cząsteczki $\text{G-C}^{\text{Me}}\text{GGCIG-C}$. W widmie naświetlano atomy wodoru grupy metylowej reszty **G3**. W bliskiej odległości ($< 5\text{Å}$) od grupy metylowej znajdują się atomy H2 reszty **I6**, H8 reszty **G4** oraz H1' reszty **G3**.

Analiza widm dwuwymiarowych wskazywała na podobieństwo struktur tworzonych przez cząsteczki $\text{G-C}^{\text{Me}}\text{GGCGG-C}$ oraz $\text{G-C}^{\text{Me}}\text{GGCIG-C}$. We fragmencie widma 2D NOESY pokazanym na rysunku 160 zaznaczyłam przypisania najważniejszych sygnałów w regionie aromatyczno-anomerycznym. Obecność intensywnego sygnału korelacyjnego $\text{G3}:\text{CH}_3\text{-G3}:\text{H1}'$ oraz brak oddziaływania pomiędzy atomem wodoru **C2-H1'** a grupą metylową reszty $^{\text{Me}}\text{G3}$ wskazywało na konformację *syn* reszty $^{\text{Me}}\text{G3}$. Dla obu cząsteczek, $\text{G-C}^{\text{Me}}\text{GGCIG-C}$ oraz $\text{G-C}^{\text{Me}}\text{GGCGG-C}$, ścieżki NOE są analogiczne (odpowiednio rys. 160, 112 B). W widmie tym obserwowałam także sygnał korelacyjny $\text{I6}:\text{H2-G3}:\text{H1}'$, którego obecność dodatkowo potwierdzała powstawanie pary zasad pokazanej na rys. 159 B.



Rys. 160. Fragment widma 2D NOESY z zaznaczoną ścieżką NOE dla $G-C^{Me}GGCIG-C$ [D_2O , $25^\circ C$]. Pomędzy resztą C2 a G3 ścieżka ta jest przerwana. Czarnym prostokątem zaznaczono sygnały korelacyjne H6-H5 reszt cytydyny, czerwonym sygnały pochodzące od oddziaływań z atomem wodoru I6-H2.

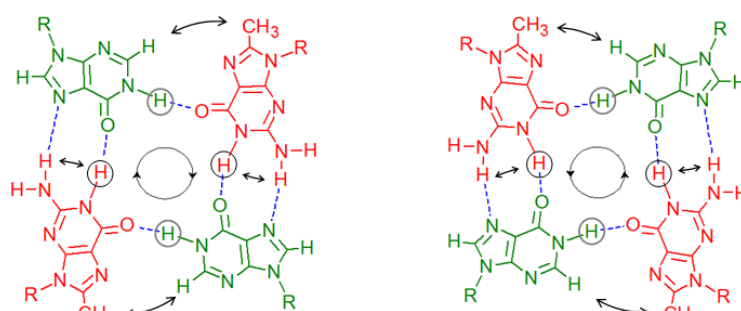
Na rys. 161 porównałam przekroje otrzymane z widm 2D NOESY dla cząsteczek $G-C^{Me}GGCGG-C$ oraz $G-C^{Me}GGCIG-C$ odpowiadające przesunięciu grup metylowych. Otrzymane w ten sposób pseudo-widma 1D NOESY odzwierciedlają względne odległości pomiędzy grupą metylową i zaznaczonymi atomami wodoru. Ponieważ intensywności wszystkich sygnałów są porównywalne, a co za tym idzie również ich odległości do grupy metylowej są zbliżone, to cząsteczki te powinny przyjmować podobne struktury.



Rys. 161. Nałożone przekroje widma 2D NOESY otrzymane dla grupy metylowej dla cząsteczek $G-C^{Me}GGCGG-C$ (kolor niebieski) oraz $G-C^{Me}GGCIG-C$ (kolor zielony), [H_2O , $10^\circ C$]; zaznaczono przekroje przez sygnały korelacyjne $G3:CH_3-X$ (X - opisane na widmie dla każdego sygnału)

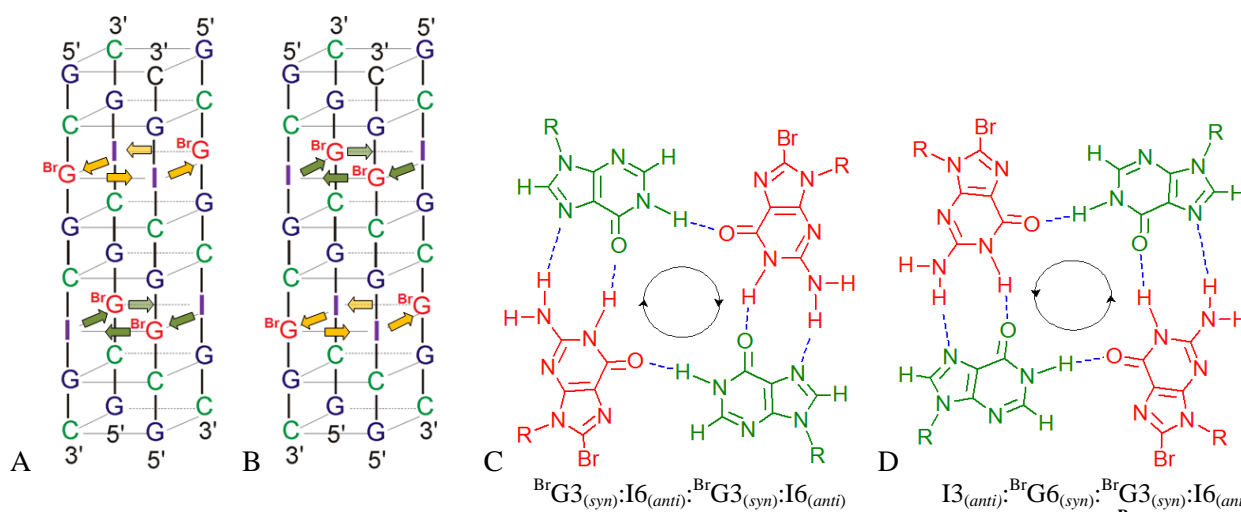
Na podstawie informacji uzyskanych z widm NMR uważam, iż cząsteczka $G-C^{Me}GGCIG-C$ zawierająca dwie modyfikowane reszty (^{Me}G , I), podobnie jak cząsteczka wzorcowa $G-C^{Me}GGCGG-C$, tworzy strukturę kwadrupleksu powstającego w wyniku asocjacji dupleksów zawierających pary typu $^{Me}G:I$. W efekcie zamiast tetrady typu $^{Me}G:G:^{Me}G:G$ powstaje mieszana tetradą $^{Me}G:I:^{Me}G:I$ (rys. 162). Należy podkreślić, że obserwowanie sygnału protonu iminowego reszty

$^{Me}G3$ w widmach zarejestrowanych w H_2O , w temperaturze $15^\circ C$, możliwe jest tylko w następstwie asocjacji dwóch dupleksów, prowadzącej do powstania dwóch tetrad typu $^{Me}G:I:^{Me}G:I$, przedzielonych $G:C:G:C$ tetradami. W powstających tetradach proton iminowy reszty $^{Me}G3$ jest zaangażowany w wiązanie wodorowe i dzięki temu jest chroniony przed szybką wymianą z H_2O . Wolna wymiana atomu wodoru $^{Me}G3-NH1$ wskazuje również na zawiązywanie się wiązania wodorowego pomiędzy grupą aminową reszty $^{Me}G3$ i atomem azotu N7 reszty inozyny. W przeciwnym przypadku, podobnie jak atom wodoru $I6-NH1$, również atom wodoru $^{Me}G3-NH1$ ulegałyby szybkiej wymianie z wodą. Na rys. 162 strzałkami zaznaczyłam te kontakty NOE, których obecność pozwoliła mi na zaproponowanie modeli tetrad $^{Me}G3:I6:^{Me}G3:I6$ oraz $I6:^{Me}G3:I6:^{Me}G3$. Tetrazy te różnią się kierunkowością wiązań wodorowych.



Rys. 162. Tetrada $^{Me}G3(syn):I6(anti):^{Me}G3(syn):I6(anti)$ (A), $I6(anti):^{Me}G3(syn):I6(anti):^{Me}G3(syn)$ (B). Czerwonym kółkiem zaznaczone są iminowe atomy wodoru zaangażowane w wiązania wodorowe, strzałki pokazują atomy wodoru pomiędzy którymi obserwowane są sygnały korelacyjne w widmie 2D NOESY; szarym kółkiem zaznaczone są iminowe atomy wodoru reszty I6, których sygnał nie jest widoczny w widmach NMR

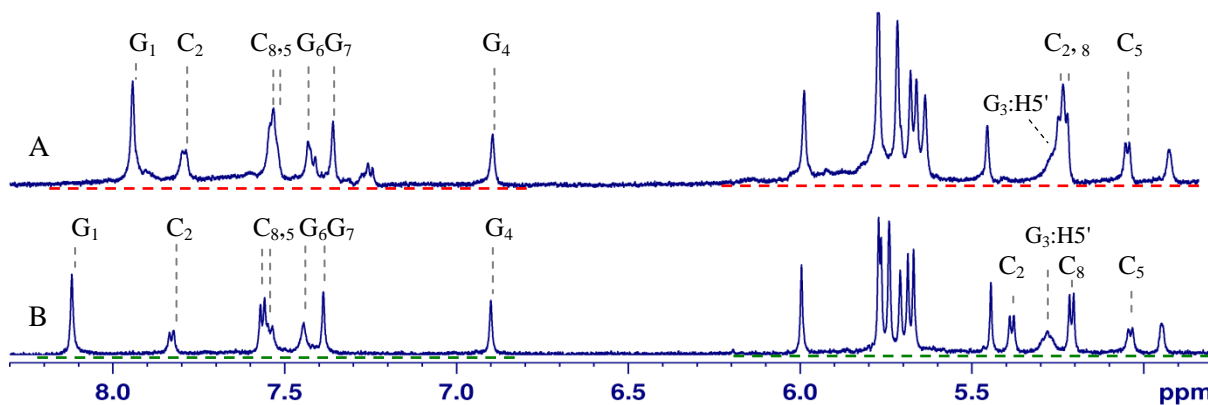
Również w przypadku cząsteczek $G-C^{Br}GGCIG-C$ i $G-CIGC^{Br}GG-C$ obecność sygnału od iminowych atomów wodoru $^{Br}G3-NH1$ oraz $^{Br}G6-NH1$ świadczy o utworzeniu formy czteroniciowej (rys. 163 A, B). W mieszanych tetradach (rys. 163 C, D) wiązanie wodorowe pomiędzy grupą aminową reszty $G3$ i atomem azotu N7 reszty inozyny, podobnie jak dla cząsteczki $G-C^{Me}GGCIG-C$, zapobiega szybkiej wymianie iminowego atomu wodoru reszty $^{Br}G3$ z wodą.



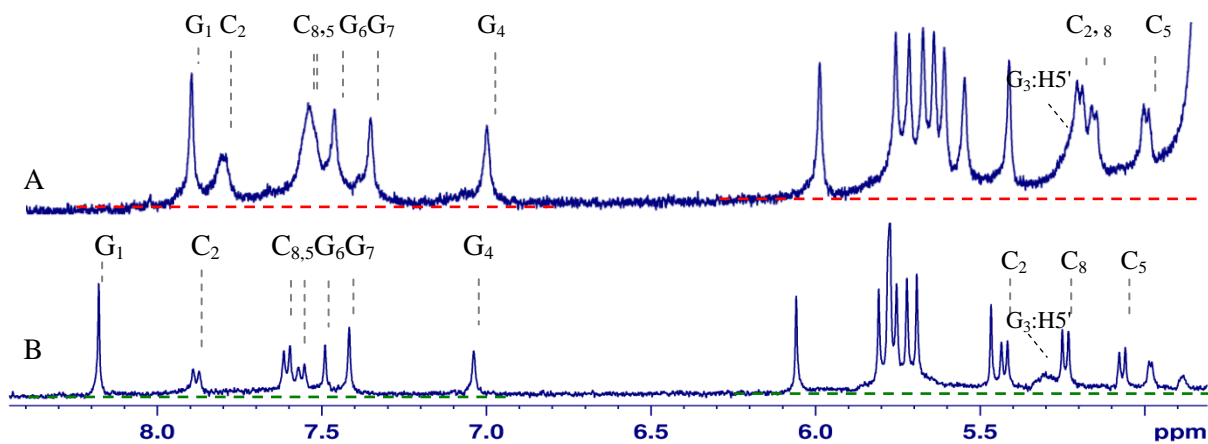
Rys. 163. Modele struktur kwadrupleksów dla cząsteczek o sekwencjach $G-C^{Br}GGCIG-C$ (A), $G-CIGC^{Br}GG-C$ (B); G-tetrazy o kierunkowości wiązań wodorowych: zgodnej z ruchem wskazówek zegara (C), przeciwnej z ruchem wskazówek zegara (D).

Struktury pokazane na rys. 163 A i B różnią się, gdyż kierunkowość wiązań w obrębie mieszanych G-tetrad dla tych cząsteczek jest przeciwna. Wolniejsza migracja cząsteczki G-CIGC^{Br}GG-C niż G-C^{Br}GGCIG-C, w żelu natywnym może być spowodowana różnicą w budowie tych kwadrupleksów. Jednak nie można wykluczyć, iż dla niskiego stężenia RNA oraz warunków stosowanych w tej metodzie, cząsteczka G-CIGC^{Br}GG-C tworzy dupleks.

W kwadrupleksach obecność reszt guanozyny na końcach 5' lub 3' często prowadzi do powstania złożonych struktur w wyniku oddziaływania warstwowego pomiędzy terminalnymi G-tetradami (31). Drugi mechanizm prowadzący do powstawania agregatów zakłada tworzenie się dodatkowych wiązań wodorowych pomiędzy niesparowanymi końcami w asocjujących podjednostkach kwadrupleksów (139). Charakterystyczne dla widm ¹H NMR agregatów są bardzo szerokie linie rezonansowe, których obecność sprawia wrażenie, że sygnały nie schodzą do linii bazowej. Badane przeze mnie cząsteczki o sekwencjach rozpoczynających się od guanozyny, niezależnie od typu i miejsca wprowadzonej modyfikacji wykazywały tendencję do tworzenia agregatów. Okazało się, że wprowadzenie grupy fosforanowej na końcu 5' do oligomerów pG-C^{Me}GGCGG-C (7) oraz pG-C^{Br}GGCGG-C (8) zapobiega agregacji cząsteczek. Linie rezonansowe w widmach NMR zarejestrowanych w D₂O stały się węższe, a poszczególne sygnały lepiej rozdzielone, co jest widoczne na rys. 164, 165. Dla uwidocznienia zmian w obu widmach zaznaczyłam dodatkowo linie bazowe.



Rys. 164. Porównanie widm ¹H NMR cząsteczek G-C^{Me}GGCGG-C (A) oraz pG-C^{Me}GGCGG-C (B). Widma wykonano w D₂O w temperaturze 25°C, przerywanymi liniami zaznaczono linię bazową



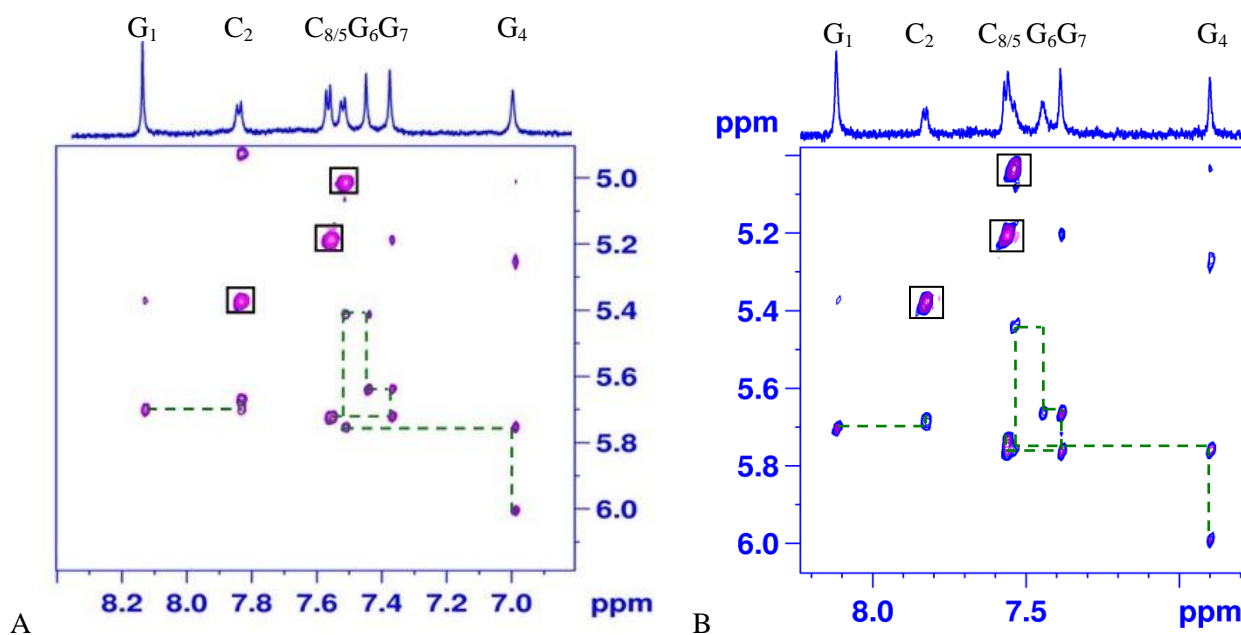
Rys. 165. Porównanie widm ^1H NMR cząsteczek $\text{G-C}^{\text{Br}}\text{GGCGG-C}$ (A) oraz $\text{pG-C}^{\text{Br}}\text{GGCGG-C}$ (B). Widma wykonano w D_2O w temperaturze 25°C , przerywanymi liniami zaznaczono linię bazową

Przypisania chemiczne sygnałów ^1H dla $\text{pG-C}^{\text{Me}}\text{GGCGG-C}$ zostały zebrane w tabeli 22. Obecność dodatkowej grupy fosforanowej na końcu 5' nie wpływa znacząco na przesunięcia chemiczne protonów, oprócz reszty **G1**.

Tabela 22. Wartości przesunięć chemicznych $\delta^1\text{H}$ (ppm) dla $\text{pG-C}^{\text{Me}}\text{GGCGG-C}$

reszta	H8/H6	H5	H1'	H2'	H3'	H4'	H5'	H5''	Me
G1	8.12	-	5.71	4.68	4.5	4.45	4.31	4.10	
C2	7.8	5.38	5.69	4.94	4.58	4.38	4.54	4.14	
G3	-	-	6.00	4.60	4.33	4.60	5.28	4.08	2.28
G4	6.89	-	5.76	4.60	4.44	4.44	4.40	4.06	
C5	7.54	5.04	5.44	4.67	4.49	4.42	4.42	4.06	
G6	7.44	-	5.66	4.39	4.54	4.41	4.50	4.06	
G7	7.38	-	5.77	4.39	4.75	4.43	4.51	4.03	
C8	7.56	5.20	5.74	3.95	4.13	4.14	4.48	3.98	

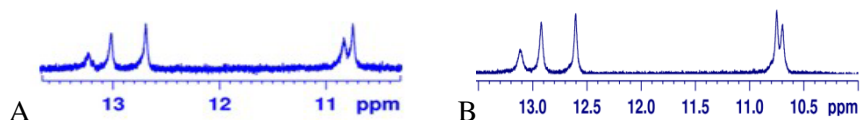
Na rys. 166 przedstawiłam ścieżki NOE dla cząsteczek $\text{pG-C}^{\text{Br}}\text{GGCGG-C}$ oraz $\text{pG-C}^{\text{Me}}\text{GGCGG-C}$.



Rys. 166. Rejon H8/H6-H1'/H5 widma 2D NOESY dla cząsteczek: $\text{pG-C}^{\text{Br}}\text{GGCGG-C}$ (A) oraz $\text{pG-C}^{\text{Me}}\text{GGCGG-C}$ (B). Na widmach zaznaczono ścieżkę NOE; pomiędzy resztą **C2** a **G3** ścieżka NOE jest przerywana. W prostokacie zaznaczono sygnały korelacyjne H6-H5 reszt cytydyn. [D_2O , 25°C]

Wszystkie charakterystyczne dla cząsteczek G-C^{Br}GGCGG-C i G-C^{Me}GGCGG-C sygnały korelacyjne w takich widmach jak 2D NOESY (D₂O, H₂O), 2D COSY oraz ¹H-³¹P HSQC obserwowałam także w widmach cząsteczek **7** i **8**.

Fragmety widm cząsteczek **7-8**, ukazujące sygnały iminowe, przedstawiłam na rysunku 167.



Rys. 167. Rejon iminowy widm ¹H NMR dla sekwencji zawierających podwójną modyfikację: pG-C^{Br}GGCGG-C (A), pG-C^{Me}GGCGG-C (B); [10°C, H₂O]

W widmach tych, podobnie jak dla związków **1** i **3** obserwowałam trzy sygnały pochodzące od par zasad G:C oraz dwa sygnały od niekanonicznych par zasad ^{Me}G:G oraz ^{Br}G:G, co potwierdziłam za pomocą widm korelacyjnych ¹H-¹⁵N HSQC. Podobnie jak w całej grupie cząsteczek zawierających modyfikację wymuszającą konformację *syn* reszty guanozyny, sygnał protonu NH1 reszty ^{Me}G3 zanikał szybciej wraz ze wzrostem temperatury.

Cząsteczki **7** i **8** tworzą struktury czteroniciowe. Oznacza to, że dołączenie grupy fosforanowej nie wpływa na zmianę struktury tych cząsteczek, natomiast zapobiega tworzeniu się agregatów.

III. 4. Analiza cząsteczki RNA zbudowanej z powtórzeń CGG, zawierającej modyfikację ^{Br}G oraz pętlę.

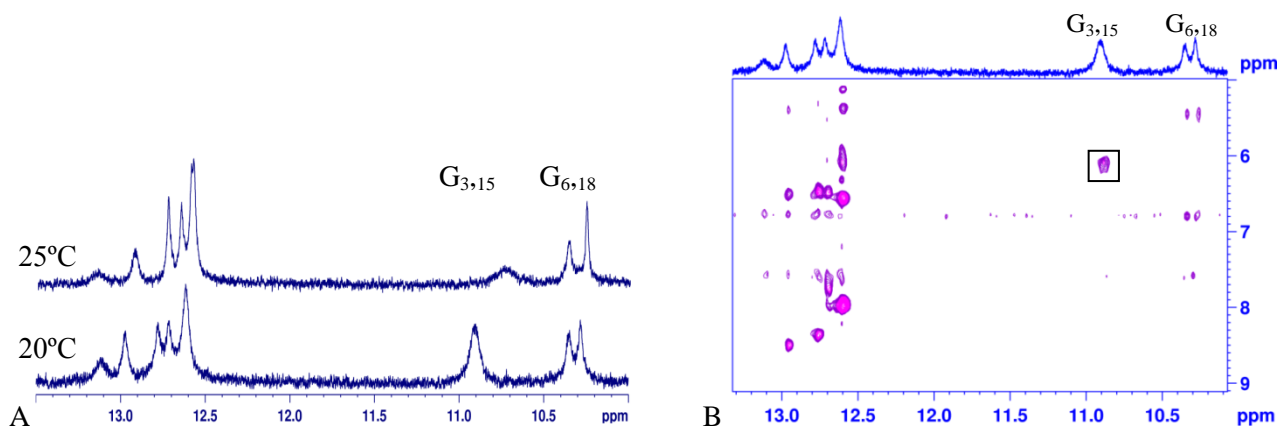
Planowałam również sprawdzić, czy cząsteczki o sekwencjach zawierających dłuższe ciągi powtórzeń G-C^XGGCGG-C, przedzielone łącznikami (X - dowolna modyfikacja wymuszająca konformację *syn* dla tej reszty), będą zdolne do tworzenia antyrównoległych kwadrupleksów. Miałam nadzieję, że poprzez asocjację dwóch spinek powstaną trwalsze termodynamicznie, a tym samym łatwiejsze do badania metodami NMR, kwadrupleksy dwuniciowe oraz jednoniciowe. Ponieważ, z dotychczas omówionych sekwencji, cząsteczka G-C^{Br}GGCGG-C wykazywała największą tendencję do asocjacji, zaprojektowałam pokazane na rysunku 168 cząsteczki 20-meru oraz 44-meru.



Rys. 168. Schematyczne przedstawienie struktur drugorzędowych dla: 8-meru (A), 20-meru (B), 44-meru (C); reszta guanozyny oznaczona kolorem czerwonym oznacza modyfikację ^{Br}G

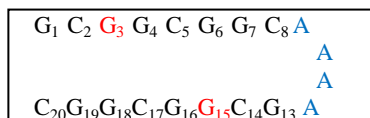
Obecność reszty ^{Br}G utrudnia powstawanie równoległych form kwadrupleksów, gdyż reszta ta preferuje konformację *syn*. Powinno to ograniczać możliwość występowania równowag konformacyjnych wyłącznie do form antyrównoległych z pętlami bocznymi lub przekątnymi, bądź form nieuporządkowanych.

Zakres sygnałów iminowych widma ^1H NMR cząsteczki $\text{G-C}^{\text{Br}}\text{GGCGG-C-AAAA-G-C}^{\text{Br}}\text{GG-CGG-C}$ przedstawiłam na rys. 169 A. Pojawiające się w widmie sygnały protonów iminowych są analogiczne do sygnałów obserwowanych dla sekwencji $\text{G-C}^{\text{Br}}\text{GGCGG-C}$ (rys. 126 D).



Rys. 169. Widma cząsteczki $\text{G-C}^{\text{Br}}\text{GGCGG-C-AAAA-G-C}^{\text{Br}}\text{GGCGG-C}$: ^1H NMR: zależność od temperatury (A), 2D NOESY wykonane w temperaturze 7°C , zaznaczone są nakładające się sygnały korelacyjne $\text{G3:NH1-G3:H2}_{1,2}$ oraz $\text{G15:NH1-G15H2}_{1,2}$ (B); [H_2O]

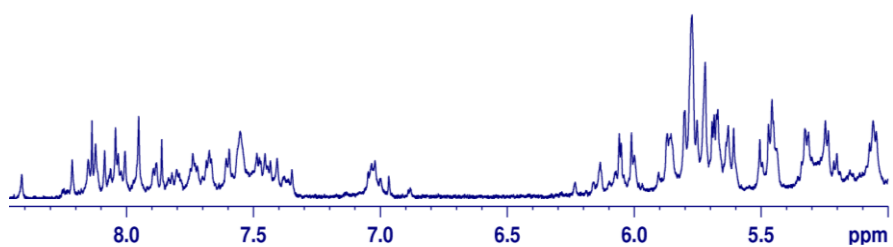
Na podstawie widm wykonanych w H_2O mogłam wnioskować, że w 20-merze zawiązuje się prawdopodobnie 8 par zasad, w tym sześć kanonicznych par G:C oraz dwie niekanoniczne pary zasad, najprawdopodobniej BrG3:G18 i G6:BrG15 , co wskazywało na tworzenie się struktury spinki (rys. 170).



Rys. 170. Hipotetyczna struktura spinki (20-mer), kolorem czerwonym oznaczone są reszty BrG

Wraz ze wzrostem temperatury obserwowałam spadek intensywności sygnałów iminowych reszt G3 i G15 oraz ich przesunięcie w kierunku mniejszych wartości ppm, czyli efekt analogiczny do tego obserwowanego dla cząsteczki $\text{G-C}^{\text{Br}}\text{GGCGG-C}$. W widmie 2D NOESY zarejestrowanym w H_2O również obserwowałam charakterystyczny kontakt NOE pomiędzy protonem iminowym reszt G3 oraz G15 a własną grupą aminową (rys. 169 B). Niestety, jak się okazało, cząsteczka ta nie tworzy jednej, dominującej konformacji i w widmie zarejestrowanym w D_2O widoczne są liczne dodatkowe sygnały o mniejszej intensywności, pochodzące od co najmniej dwóch innych form (rys. 171).

Temperatura topnienia oligomeru $\text{G-C}^{\text{Br}}\text{GGCGG-C-AAAA-G-C}^{\text{Br}}\text{GGCGG-C}$ była dużo wyższa niż cząsteczki $\text{G-C}^{\text{Br}}\text{GGCGG-C}$. Dla oktameru temperatura topnienia wynosi $\sim 48.5^\circ\text{C}$, z kolei dla 20-meru nawet w temperaturze 80°C nie obserwowałam jeszcze sygnałów pochodzących od formy jednoniciowej. Obecność licznych sygnałów od dodatkowych form uniemożliwiała analizę 20-meru metodami NMR.



Rys. 171. Widmo ^1H NMR dla $G\text{-C}^{\text{Br}}\text{GGCGG-C-AAAA-G-C}^{\text{Br}}\text{GGCGG-C}$ [1.3 mM RNA, D_2O , 25°C]

Poszukując warunków, w których powstałaby stabilna, pojedyncza forma zauważyłam, że w zależności od stężenia RNA oraz stężenia użytej soli widmo 20-meru ulegało znacznym zmianom. Po dwukrotnym rozcieńczeniu próbki (~ 0.65 mM RNA, 75 mM NaCl), dla której widmo pokazano na rys. 171, sygnały pochodzące od atomów wodoru uległy poszerzeniu oraz pojawiły się nowe, świadczące o powstawaniu jeszcze innej formy. Na podstawie otrzymanych przeze mnie danych eksperymentalnych nie mogłam jednoznacznie potwierdzić tworzenia się struktury spinki, ani tym bardziej ustalić, czy istnieje możliwość asocjacji dwóch spinek i utworzenia się struktury kwadrupleksu.

Niestety synteza oligomeru zbudowanego z 44 reszt nukleotydowych nie powiodła się. W przyszłości planuję powtórzyć tą syntezę stosując inne grupy ochronne.

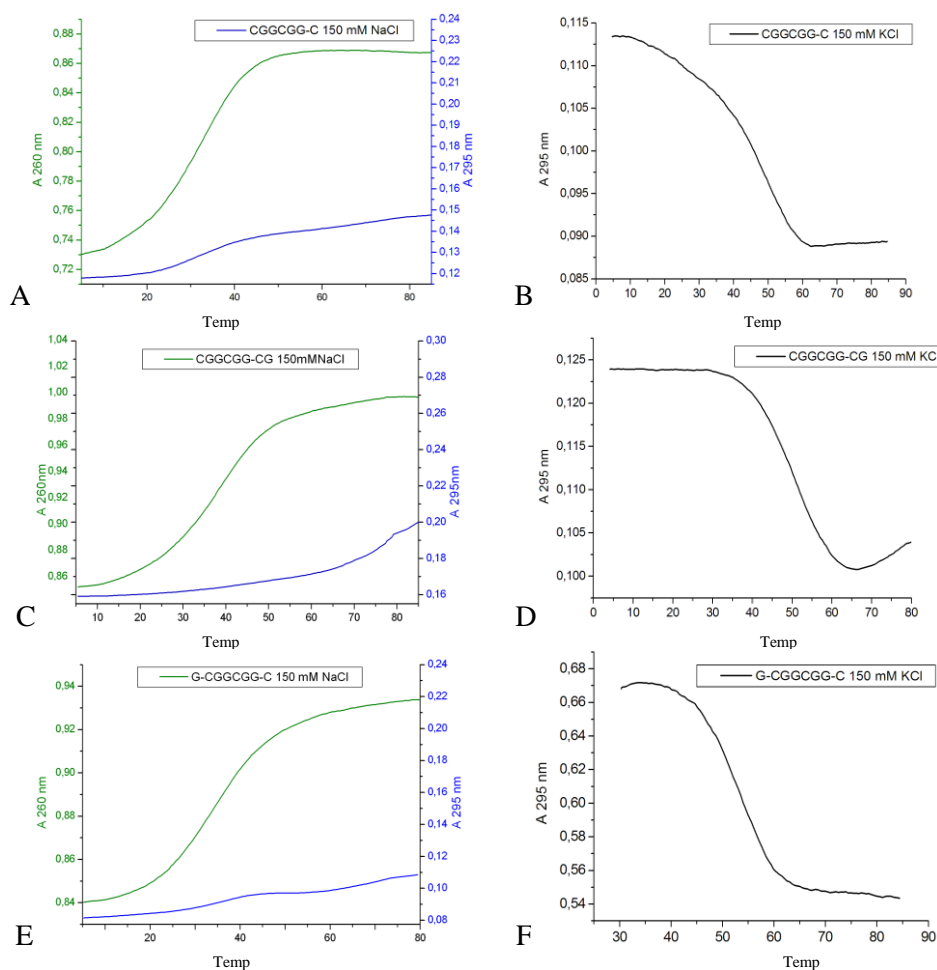
III. 5. Analiza cząsteczek zbudowanych z dwóch powtórzeń CGG, zawierających różne sekwencje flankujące

Cząsteczki o sekwencjach:

- CGGCGG-C (10)
 CGGCGG-CG (11)
 G-CGGCGG-C (12)

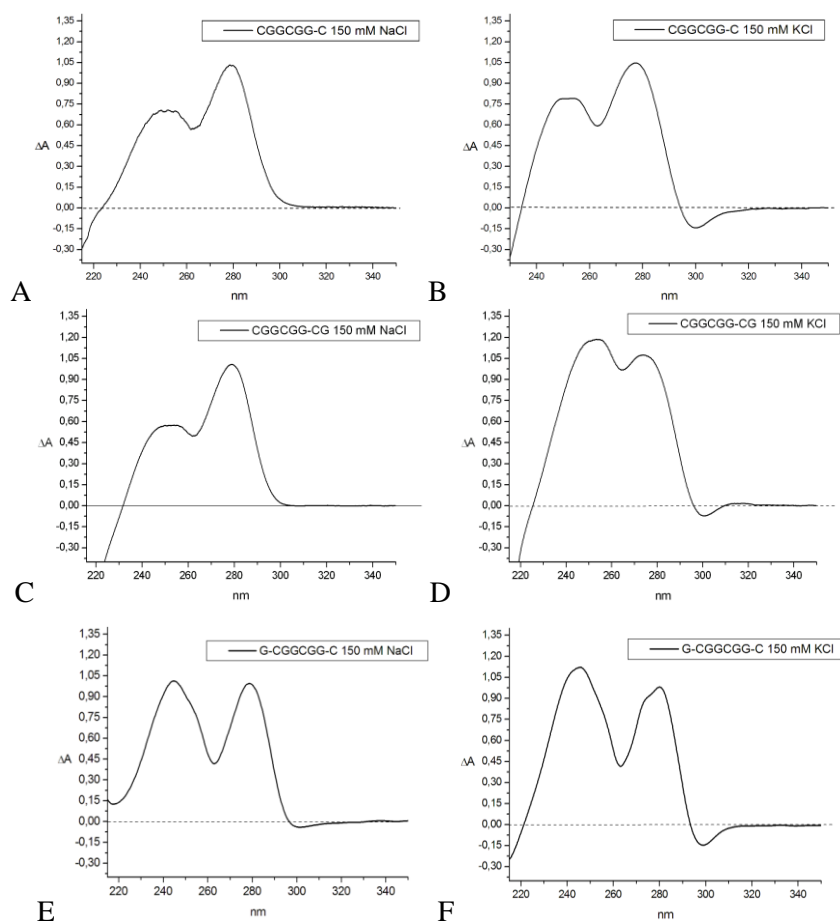
posiadają trzon złożony z dwóch powtórzeń CGG i różne reszty na końcach 3' i 5'. Istnieją doniesienia (rozdział II.5.), że cząsteczki zawierające trójnukleotydowe powtórzenia r(CGG) mogą przyjmować strukturę spinki, dupleksu lub kwadrupleksu. W strukturach spinki oraz dupleksu reszty guanozyn w niekanonicznych parach zasad G:G mogą występować w konformacji *syn* lub *anti*. Natomiast w strukturach kwadrupleksów istnieje zależność pomiędzy kierunkowością nici a konformacją G(*syn*)/G(*anti*) (rozdział II.2.1.).

Wyniki badań uzyskane metodami spektroskopii UV, takie jak profile topnienia przy 295 nm (rys. 172) oraz widma różnicowe TDS (rys. 173) wskazywały, iż wszystkie trzy cząsteczki (10, 11, 12) w środowisku zawierającym kationy potasu mają tendencję do tworzenia kwadrupleksów. Krzywe topnienia zarejestrowane przy długości fali 295 nm, w obecności kationów potasu, wykazują typowy dla kwadrupleksów, związany z zanikiem G-tetrad, spadek absorpcji wraz ze wzrostem temperatury.



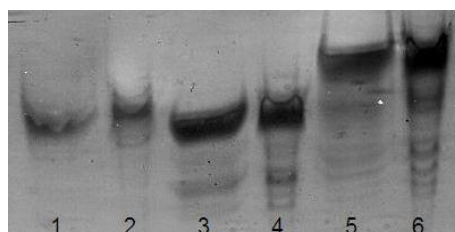
Rys. 172. Krzywe topnienia dla cząsteczek 10, 11 i 12 w obecności 150 mM NaCl i 10 mM fosforanu sodu (A, C i E). Kolorem zielonym oznaczone są pomiary przy 260 nm, niebieskim - 295 nm. B, D i F - krzywe topnienia w obecności 150 mM KCl i 10 mM fosforanu potasu przy długości fali 295 nm.

W widmach różnicowych także obserwowałam charakterystyczne dla kwadrupleksów ujemne pasmo przy ok. 295 nm (rys. 173 B, D, F). Natomiast, w obecności kationów sodu, dla niskich stężeń RNA stosowanych przy pomiarach UV (rzędu 10^{-4} - 10^{-5} mM) nie obserwowałam żadnych dowodów wskazujących na tworzenie się kwadrupleksów (rys. 173 A, C, E). Przedstawione na rys. 172- 73 A, C, E krzywe są typowe dla struktur dupleksów lub spinek.



Rys. 173. Różnicowe widma absorpcyjne (TDS) dla cząsteczek **10**, **11** i **12** w obecności 150 mM NaCl i 10 mM fosforanu sodu - A, C i E oraz w obecności 150 mM KCl i 10 mM fosforanu potasu - B, D i F

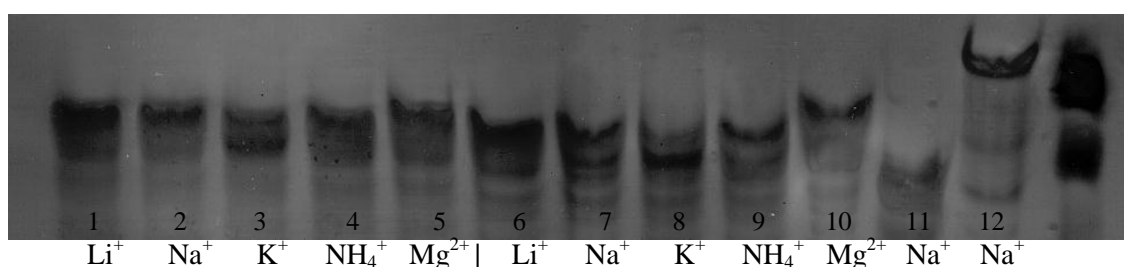
Na rysunku 174 pokazane są różnice szybkości migracji cząsteczek **10**, **11** i **12** w żelu natywnym. Jak widać cząsteczki CGGCGG-C oraz CGGCGG-CG migrują szybciej niż G-CGGCGG-C.



Rys. 174. Profil migracji w żelu natywnym 15% (277 K) cząsteczek RNA utworzonych z trójnukleotydowych powtórzeń CGG: pasmo 1-2: CGGCGG-C, 3-4: CGGCGG-CG, 5-6: G-CGGCGG-C (pasma nieparzyste: 10 mM Na⁺, pasma parzyste: 160 mM Na⁺)

Omówiona już wcześniej analiza profilu migracji cząsteczki G-CGGCGG-C w żelu poliakrylamidowym w warunkach niedenaturujących, względem innych cząsteczek sugerowała, iż

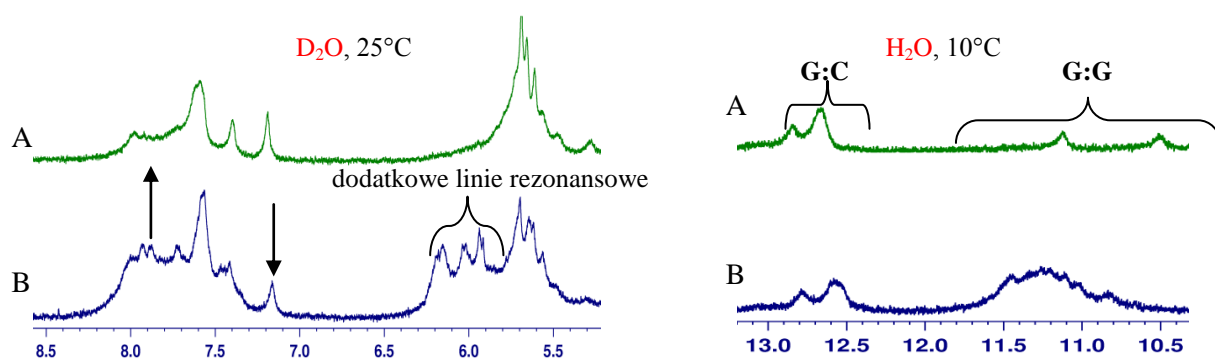
migruje ona jak dupleks. Jednak w żelu, w warunkach natywnych dla cząsteczki G-CGGCGG-C obserwowałam najczęściej dwa prążki o podobnej szybkości migracji (rys. 103, 104). Było to bardzo interesujące, szczególnie gdy okazało się, że intensywność tych prążków ulegała zmianie w zależności od typu i stężenia soli (rys. 175). Cząsteczka ta migrowała jako dwa oddzielne prążki o porównywalnej intensywności, jedynie w obecności 50 mM kationów K^+ . W pozostałych warunkach wolniej migrujące pasma były intensywniejsze. Zwiększenie stężenia soli do 300 mM zmieniło równowagę pomiędzy tymi formami w dwóch przypadkach. Dla dużego stężenia NaCl intensywność prążków pochodzących od dwóch form była zbliżona, podobnie jak uprzednio w 50 mM KCl. Natomiast, zwiększenie stężenia chlorku potasu do 300 mM silnie przesunęło równowagę w kierunku formy szybciej migrującej (rys. 175, pasmo 8).



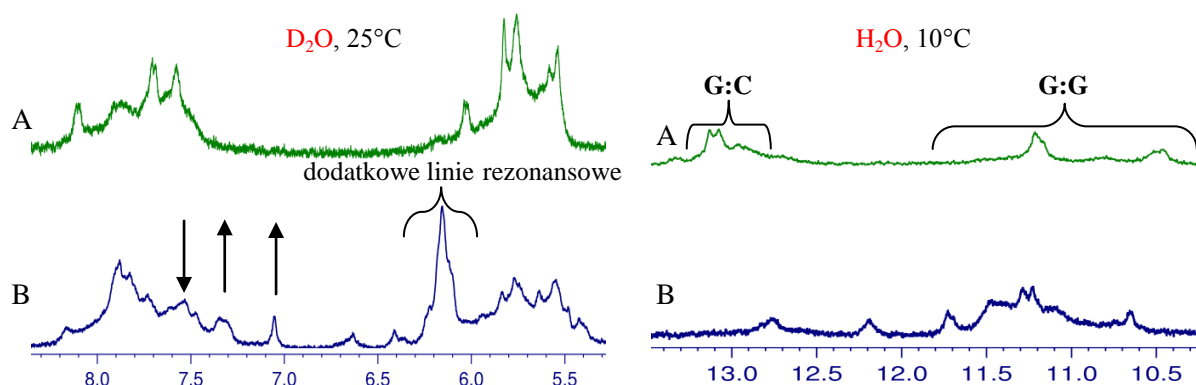
Rys. 175. Profil migracji w żelu natywnym 15% (277 K) cząsteczek: G-CGGCGG-C (pasma 1-10), G-CCGCCG-C (pasmo 11) oraz G-C^{Br}GGCGG-C (pasmo 12) w zależności od stężenia i rodzaju soli; stężenie soli: pasma 1-5 - 50 mM, pasma 5-10 - 300 mM, pasma 11-12 - 150 mM (bufor Tris-HCl)

Wyniki uzyskane z widma TDS (rys. 173 F) oraz przebiegu krzywej topnienia przy 295 nm (rys. 172 F) wskazywały, że w obecności kationów K^+ cząsteczka 12 tworzy kwadrupleks. Dlatego też wydaje się być prawdopodobne, iż z dwóch podobnie migrujących pasm, pasmo migrujące szybciej odpowiada właśnie formie kwadrupleksu. Cząsteczka G-CCGCCG-C tworząca spinę (pasmo 11) migruje znacznie szybciej od cząsteczki 12, więc obecność dwóch prążków w żelu natywnym najprawdopodobniej odzwierciedla równowagę pomiędzy formą dupleksu a kwadrupleksu.

Więcej informacji o strukturze badanych cząsteczek uzyskałam z analizy widm 1H NMR. Na rysunkach 176-177 pokazane są różnice obserwowane w widmach NMR w zależności od typu kationu, Na^+ lub K^+ , dla cząsteczek 10 oraz 11. Wszystkie sygnały w widmach są silnie poszerzone, zarówno w obecności kationów sodu jak i potasu. Poszerzenie sygnałów rezonansowych może być związane z uśrednieniem konformacji $G_{(syn)}/G_{(anti)}$, występowaniem mieszaniny konformerów lub powstawaniem struktur z lepkiymi końcami.



Rys. 176. Porównanie fragmentów widm ^1H NMR dla CGGCGG-C w 150 mM NaCl, 10 mM fosforanie sodu (A), 150 mM KCl, 10 mM fosforanie potasu (B). Po lewej stronie widma wykonane w D_2O , po prawej w H_2O .



Rys. 177. Porównanie fragmentów widm ^1H NMR dla CGGCGG-CG w 150 mM NaCl, 10 mM fosforanie sodu (A), 150 mM KCl, 10 mM fosforanie potasu (B). Po lewej stronie widma wykonane w D_2O , po prawej w H_2O .

W widmach cząsteczki CGGCGG-C zarejestrowanych w H_2O , w obecności kationów sodu, widoczne są dwa sygnały przy ~ 13 ppm (rys. 176), charakterystyczne dla kanonicznych par zasad G:C oraz dwa w rejonie 11.0-10.5 ppm wskazujące na zawiązywanie się par zasad typu G:G. Obecność tych sygnałów sugerowała, że w roztworze zawierającym 150 mM NaCl główną formą, jaką przyjmuje cząsteczka **10** jest dupleks z lepкими końcami pokazany na rys. 178 A.



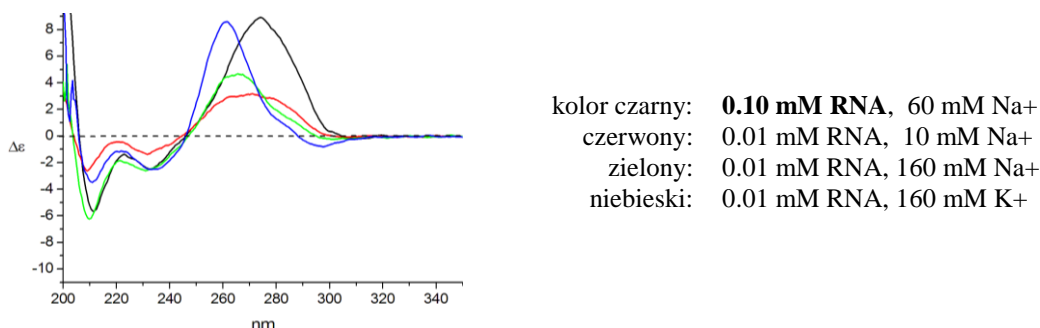
Rys. 178. Prawdopodobna struktura dupleksu: **10** (A) i **11** (B)

W tych warunkach dla cząsteczki **11**, w widmie ^1H NMR (rys. 177) występują trzy sygnały od iminowych atomów wodoru par zasad G:C oraz dwa od pary G:G, co jest zgodne z przedstawionym na rys. 178 B modelem dupleksu. Dla obu cząsteczek, **10** i **11**, sygnały pochodzące od protonów iminowych par G:G są nietrwałe i zanikają w temperaturze pokojowej. Sygnały od iminowych atomów wodoru w zakresie 11.5-10.0 ppm są analogiczne do tych obserwowanych dla cząsteczek np. $\text{G-C}^{\text{X}}\text{GGCGG-C}$ ($\text{X} = \text{Me}, \text{Br}$), jednak zdecydowanie mniej trwale. Nie ma więc przesłanek, które wskazywałyby na powstawanie kwadrupleksów. Wszystkie dane pokazują, że w obecności kationów Na^+ obydwie cząsteczki są stosunkowo nietrwałe i labilne konformacyjnie.

Natomiast profile topnienia przy 295 nm oraz widma TDS pokazały, że w obecności kationów K^+ cząsteczki **10** i **11** zawiązują struktury kwadrupleksów (rys. 172, 173).

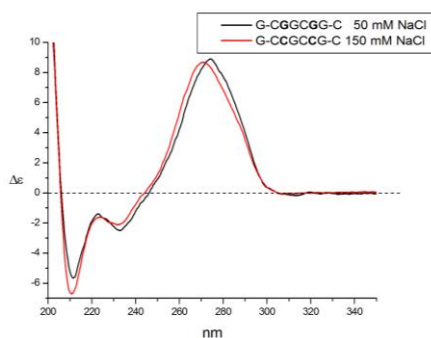
Z kolei wykonane w tych warunkach widma ^1H NMR ujawniły, że w roztworze współistnieje więcej form. Z porównania widm pokazanych na rys. 176 B i 177 B (zarejestrowanych w H_2O) wynikało, że cząsteczki **10** i **11** występują najprawdopodobniej w równowadze pomiędzy dupleksem i kwadrupleksem. Sygnały od dodatkowej formy, pojawiające się w widmach wykonanych w D_2O w obecności jonów K^+ , są szczególnie widoczne w rejonie anomerycznym (rys. 176 B, 177 B). W środowisku kationów Na^+ sygnały od protonów iminowych par zasad G:C oraz G:G zanikały prawie całkowicie już w temperaturze pokojowej. Natomiast, w obecności kationów K^+ sygnały od protonów iminowych (w zakresie $\sim 12 - 10.5$ ppm), widoczne były nawet w temperaturze 40°C , co potwierdzało tworzenie się struktury kwadrupleksu stabilizowanego kationami potasu. Niestety, silne poszerzenie linii rezonansowych widoczne w przedstawionych widmach ^1H NMR uniemożliwiło mi przeprowadzenie bardziej szczegółowej analizy cząsteczek CGGCGG-C i CGGCGG-CG.

Widmo TDS cząsteczki G-CGGCGG-C (**12**) pokazane na rys. 173 F oraz przebieg krzywej topnienia przy 295 nm (rys. 172 F) wskazywały, iż w obecności kationów potasu powstaje kwadrupleks. Na rysunku 179 zestawione są widma CD wykonane dla tej cząsteczki w różnych warunkach roztworu. Jak widać, w zależności od stężenia RNA oraz stężenia i typu soli zmieniały się zarówno położenia jak i intensywności pasm, szczególnie położenie maksimum. Sugerowało to, że konformacja tej cząsteczki, w zakresie stężeń RNA stosowanych w spektroskopii CD, silnie zależy od warunków roztworu (rys. 179).



Rys. 179. Porównanie widm CD cząsteczki G-CGGCGG-C, w zależności od stężenia RNA, typu i stężenia soli

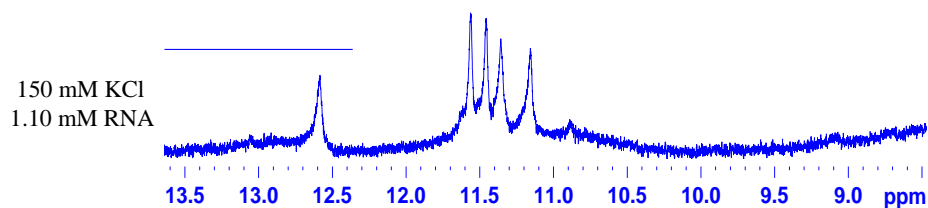
Wcześniej pokazałam (roz. III.2., str. 97), że preferowaną formą cząsteczki G-(CCG)₂-C jest spinka. Dodatkowo, widmo CD tej cząsteczki jest analogiczne z widmami cząsteczek G-(CCG)₃-C oraz G-(CCG)₄-C (rys. 210 B), które prawdopodobnie także przyjmują strukturę spinki. Porównując widmo CD wykonane dla cząsteczki G-(CCG)₂-C w 150 mM NaCl oraz widmo CD dla G-CGGCGG-C (**12**) wykonane dla 0.1 mM stężenia RNA i 50 mM NaCl zauważyłam, że są one bardzo podobne (rys. 180). Wyniki te sugerowały, że w takich warunkach cząsteczka **12** przyjmuje prawdopodobnie formę spinki. Widma ^1H NMR cząsteczki G-CGGCGG-C w 50 mM NaCl oraz cząsteczki G-CCGCCG-C są także bardzo podobne, jednak podobieństwo widm CD tych cząsteczek jest dla mnie bardziej wiarygodnym argumentem przemawiającym za powstawaniem struktury spinki w obu przypadkach.



Rys. 180. Porównanie widm CD cząsteczek G-CCGCCG-C (150 mM NaCl) oraz G-CGGCGG-C (50 mM NaCl), ~ 0.1 mM RNA

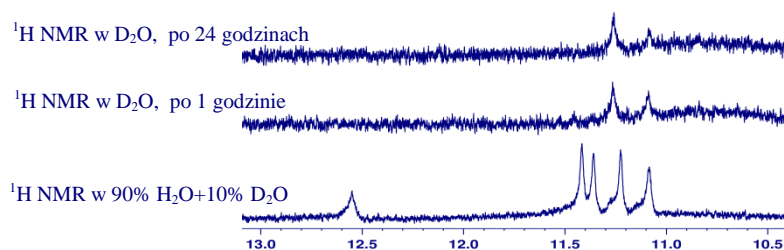
W buforze zawierającym kationy K^+ zarówno widma UV jak i profil krzywej topnienia przy 295 nm jednoznacznie wskazywały na zawiązywanie się struktury kwadrupleksu przez cząsteczkę G-CGGCGG-C. Aby potwierdzić, czy w tych warunkach powstaje tylko jedna forma kwadrupleksu oraz aby poznać jego budowę przeanalizowałam serię widm NMR.

W obecności kationów potasu, w widmie 1H wykonanym w H_2O , w rejonie charakterystycznym dla G-tetrad obserwowałam pojawienie się czterech ostrych sygnałów oraz dodatkowo jednego sygnału przy 12.6 ppm (rys. 181).



Rys. 181. Rejon iminowy widma 1H NMR dla G-CGGCGG-C, [H_2O , 10°C, bufor potasowy: 150 mM KCl, 10 mM fosforan potasu, 0.1 mM EDTA]

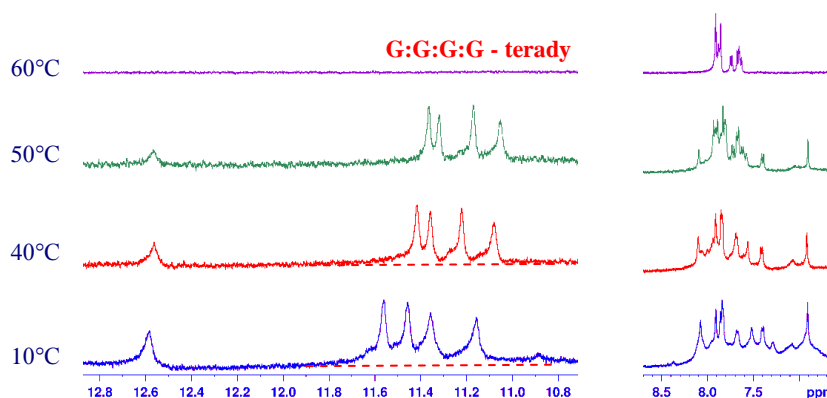
W ciężkiej wodzie obserwowałam bardzo wolny zanik sygnałów od iminowych atomów wodoru, co jest charakterystyczne dla trwałych G-tetrad. Sygnały dwóch protonów iminowych obserwowałam nawet po 24 godzinach od rozpuszczenia próbki w D_2O (rys. 182), co jednoznacznie potwierdzało powstawanie typowego kwadrupleksu zawierającego co najmniej dwie sąsiadujące ze sobą G-tetrazy.



Rys. 182. Fragmenty widm 1H NMR obejmujące zakres protonów iminowych dla cząsteczki G-CGGCGG-C, [1.1 mM RNA, D_2O , 25°C, bufor potasowy: 150 mM KCl, 10 mM fosforan potasu, 0.1 mM EDTA]

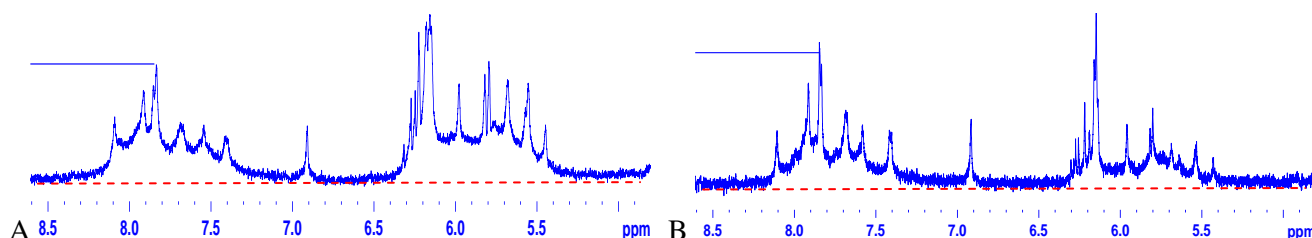
Na rysunku 183 przedstawiłam zależność temperaturową widm 1H NMR dla iminowych atomów wodoru. Ich stosunkowo duża trwałość to kolejny argument przemawiający za powstawaniem formy typowego kwadrupleksu. Natomiast sygnał przy 12.6 ppm zanika nieco szybciej (rys. 183), co może

być spowodowane zaangażowaniem tego atomu w tworzenie terminalnej G-tetrazy lub tetrazy innego typu.



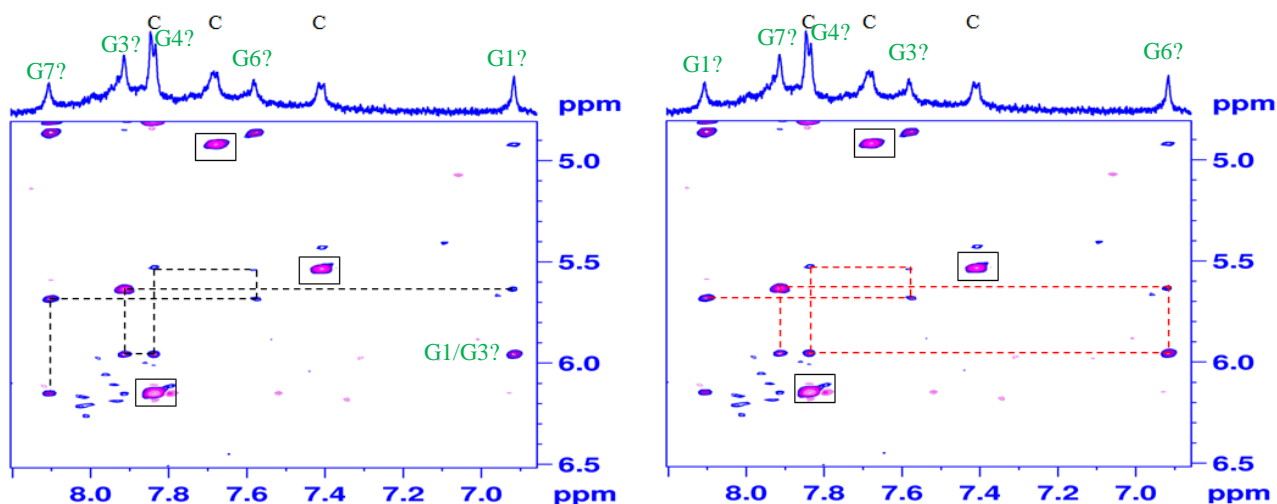
Rys. 183. Zależność temperaturowa widm ^1H NMR dla G-CGGCGG-C, przerywanymi liniami zaznaczono linię bazową, [bufor potasowy: 150 mM KCl, 10 mM fosforan potasu, 0.1 mM EDTA]

Obecność kationów K^+ promowała również powstawanie struktur wyższych rzędów. Wskazywało na to silne poszerzenie sygnałów nie tylko w rejonie iminowym (rys. 183), ale w całym zakresie, co było szczególnie widoczne w widmach wykonanych w D_2O (rys. 184). Obecność takich szerokich sygnałów znacznie utrudniała interpretację widm. W wyższej temperaturze, $\sim 40^\circ\text{C}$, sygnały iminowych atomów wodoru stawały się węższe oraz bardziej schodziły do linii podstawowej (rys. 183). Również w widmach zarejestrowanych w D_2O wraz ze wzrostem temperatury szerokie sygnały pochodzące od struktury wyższych rzędów częściowo zanikały (rys. 184 B), a efekt ten był bardziej zauważalny niż w widmach wykonanych w H_2O .



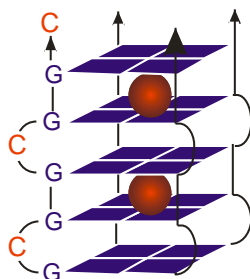
Rys. 184. Widmo ^1H NMR dla G-CGGCGG-C w rejonie aromatyczno-anomerycznym [25°C] (A), [40°C] (B); przerywanymi liniami zaznaczono linię bazową, [D_2O , bufor potasowy: 150 mM KCl, 10 mM fosforan potasu, 0.1 mM EDTA]

Ponieważ w temperaturze 40°C cząsteczka **12** występowała nadal w formie kwadrupleksu, co potwierdzała obecność sygnałów charakterystycznych dla G-tetrad, to próbowałam przeprowadzić analizę widm w tej temperaturze równoległą z analizą widm zarejestrowanych w temperaturze pokojowej. W wyższej temperaturze spodziewałam się zaobserwować więcej sygnałów korelacyjnych, z uwagi na częściowy zanik struktur wyższego rzędu. Okazało się jednak, że chociaż sygnały w widmie ^1H NMR wykonanym w 40°C były stosunkowo intensywne to w widmach 2D NOESY zarejestrowanych w tych warunkach obserwowałam tylko nieliczne kontakty NOE (rys. 185) o słabej intensywności.



Rys. 185. Alternatywne sekwencyjne ścieżki NOE w widmie 2D NOESY dla G-CGGCGG-C [40°C, D₂O, bufor potasowy: 150 mM KCl, 10 mM fosforan potasu, 0.1 mM EDTA], sygnały korelacyjne H6-H5 reszt cytydyn zaznaczono prostokątem

Próba wyznaczenia sekwencyjnej ścieżki NOE (H8/H6_n-H1'_n-H8/H6_{n+1}-H1'_{n+1}) prowadziła do dwóch alternatywnych rozwiązań pokazanych na rys. 185. Obie ścieżki łączyły ze sobą sygnały pochodzące jedynie od reszt guanozyny, co wskazywało na zawiązywanie się struktury pokazanej na rysunku 186. Ponieważ w widmie tym nie obserwowałam, typowych dla struktur helikalnych, sygnałów korelacyjnych pomiędzy resztami cytydyny i guanozyny założyłam, że tworzy się struktura równoległego kwadrupleksu, w którym reszty cytydyny C2 i C5 są wybrzuszone.

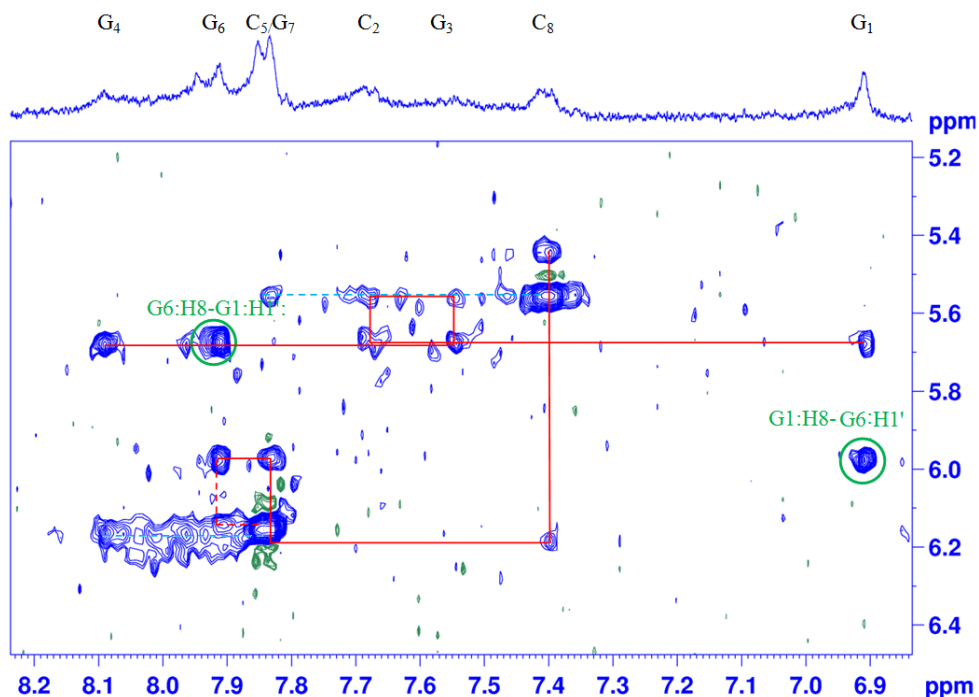


Rys. 186. Model kwadrupleksu zaproponowany na podstawie analizy widma 2D NOESY w 40°C

Aby sprawdzić, czy zaproponowany model kwadrupleksu był poprawny wykonałam dodatkowe eksperymenty. Sądziłam, że protonowanie cytydyny, które łatwo zachodzi w pH poniżej 5 sprawi, iż usytuowane dotychczas na zewnątrz helisy cytydyny utworzą tetrady C:C⁺:C:C⁺. Z danych literaturowych wynikało, że w przypadku cząsteczki DNA zbudowanej z powtórzeń CGG obniżenie pH roztworu prowadziło do utworzenia protonowanych tetrad C:C⁺:C:C⁺ (rys. 89). Niestety, w moim przypadku obniżenie pH nie miało wpływu na konformację cząsteczki G-CGGCGG-C. W widmie ¹H NMR, oprócz pojawienia się trzech dodatkowych sygnałów pochodzących prawdopodobnie od protonowanych reszt cytydyny, nie zaobserwowałam znaczącej zmiany przesunięć chemicznych, która świadczyłaby o zmianie dotychczasowej struktury.

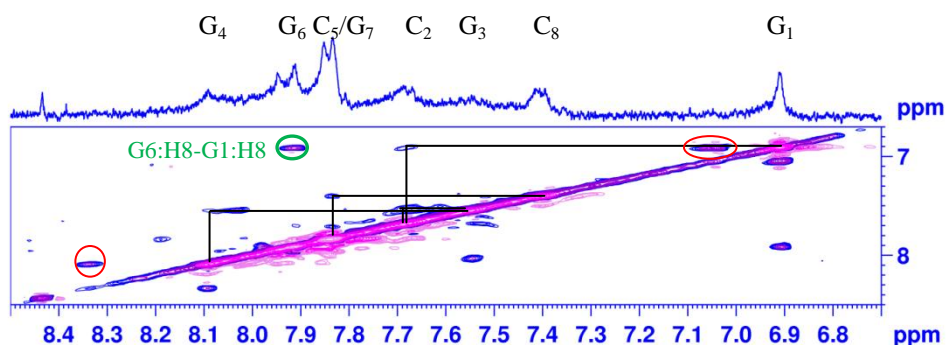
Jak wcześniej wspomniałam, w temperaturze 25°C sygnały w widmie ¹H NMR były szerokie i mało intensywne. Jednak w widmie 2D NOESY w tych warunkach obserwowałam więcej sygnałów

korelacyjnych niż w temperaturze 40°C (rys. 187).



Rys. 187. Rejon H8/H6-H1'/H5 widma 2D NOESY dla G-CGGCGG-C [D₂O, 25°C]. W kółku zaznaczono sygnał korelacyjny pomiędzy resztami G1 a G6.

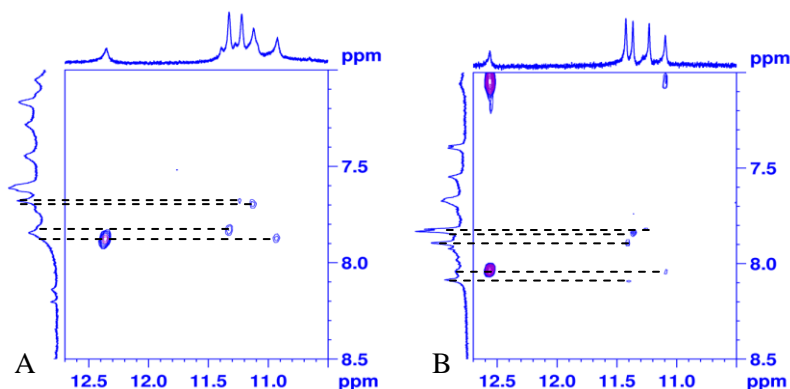
Niestety, również i w tym przypadku nie udało mi się wyznaczyć sekwencyjnej ścieżki NOE, która umożliwiłaby mi przypisanie sygnałów rezonansowych. Jednym z powodów, dla których trudno było dokonać jednoznacznych przypisań w widmie, było niewielkie zróżnicowanie przesunięć chemicznych aż pięciu sygnałów występujących przy ~ 5.67 ppm (rys. 187). Na podstawie tego widma mogłam jedynie zaproponować fragmenty ścieżek pomiędzy resztami **G1** i **G4** oraz pomiędzy **G6** a **C8** (rys. 187). Ich poprawność potwierdziłam analizą innych regionów widma (rys. 187 - kolor niebieski, rys. 188 - region aromatyczno-aromatyczny). Brak sekwencyjnej ścieżki NOE pomiędzy resztami **G4** i **G6** mógł wynikać ze znacznego poszerzenia sygnałów. Ze względu na niedoskonałość metody rejestracji widm sygnały korelacyjne pochodzące od szerokich sygnałów są trudne do zaobserwowania. W widmie 2D NOESY pojawiły się dodatkowe sygnały pochodzące od wymiany chemicznej z inną formą współistniejącą w roztworze (rys. 188, kolor czerwony).



Rys. 188. Fragment widma 2D NOESY, przedstawiono sygnały pochodzące od oddziaływań warstwowych pomiędzy aromatycznymi atomami wodoru dla G-CGGCGG-C [D₂O, 25 °C]; w czerwonym kółku zaznaczono sygnały od wymiany chemicznej; [bufor potasowy: 150 mM KCl, 10 mM fosforan potasu, 0.1 mM EDTA]

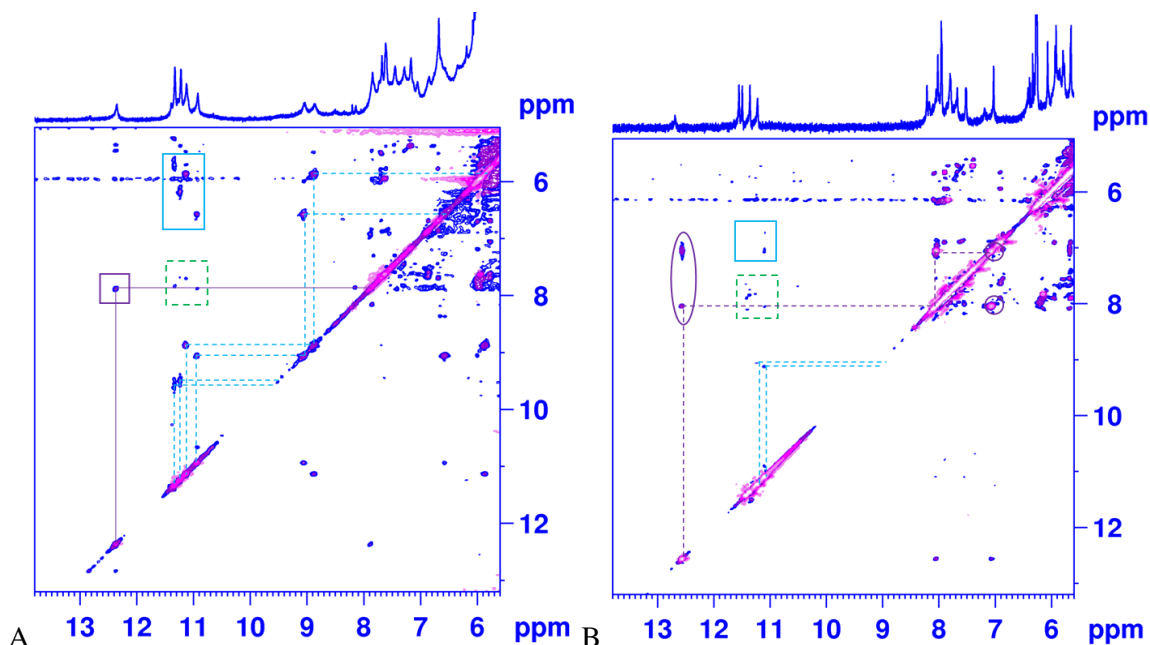
Na tym etapie nie potrafiłam wyjaśnić obecności sygnałów korelacyjnych **G6:H8-G1:H1'** i **G1:H8-G6:H1'** (rys. 187) oraz oddziaływania pomiędzy protonami G1-H8 i G6-H8, świadczącego o istnieniu oddziaływania warstwowego pomiędzy resztami **G1** i **G6** (rys. 188).

Ustalenie kontaktów NOE pomiędzy atomami wodoru NH1 a H8 w obrębie G-tetrad jest kluczowe dla wyznaczenia topologii kwadrupleksu. Niestety, zarówno w temperaturze 10°C, jak i 40°C widoczne były tylko niektóre z tych sygnałów (rys. 189).



Rys. 189. Fragment widma 2D NOESY obejmujący sygnały korelacyjne pomiędzy protonami iminowymi a aromatycznymi dla G-CGGCGG-C, 10°C (A), 40°C (B), [bufor potasowy: 150 mM KCl, 10 mM fosforan potasu, 0.1 mM EDTA, H₂O, 1.1 mM RNA]

Z tej przyczyny nie było również możliwe przypisanie iminowych atomów wodoru oraz określenie, które reszty guanozyny są zaangażowane w tworzenie poszczególnych G-tetrad (rys. 189, 190).

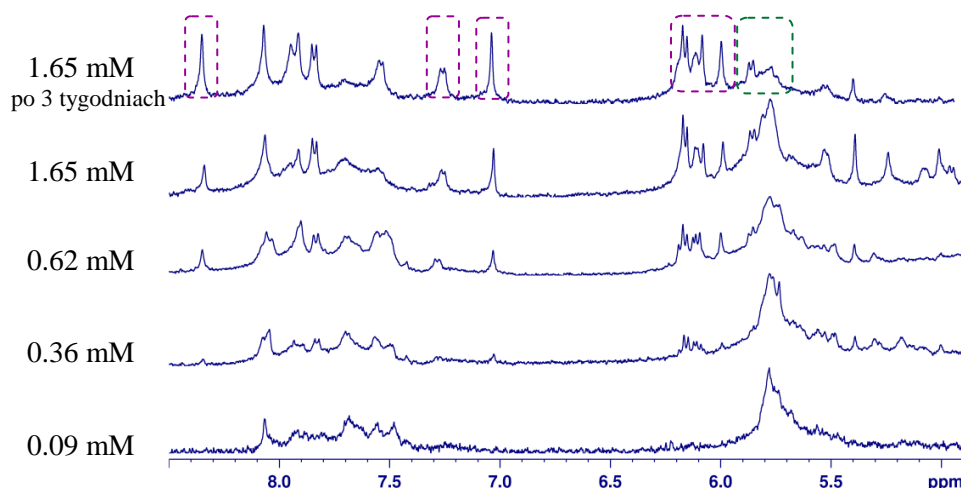


Rys. 190. Fragment widma 2D NOESY dla G-CGGCGG-C, na którym zaznaczono charakterystyczne kontakty od iminowych oraz aminowych atomów wodoru; kolory użyte w widmie 2D NOESY odpowiadają kolorom linii łączących odpowiednie atomy wodoru, pomiędzy którymi obserwujemy te kontakty, zaznaczone w tetradach na rys. 59 B oraz 60 B; [H₂O, 10°C - po lewej, 40°C - po prawej]

W widmie 2D NOESY wykonanym w temperaturze 10°C, pokazanym na rys. 190 A, obserwowałam więcej sygnałów korelacyjnych w stosunku do widma zarejestrowanego w temperaturze 40°C,

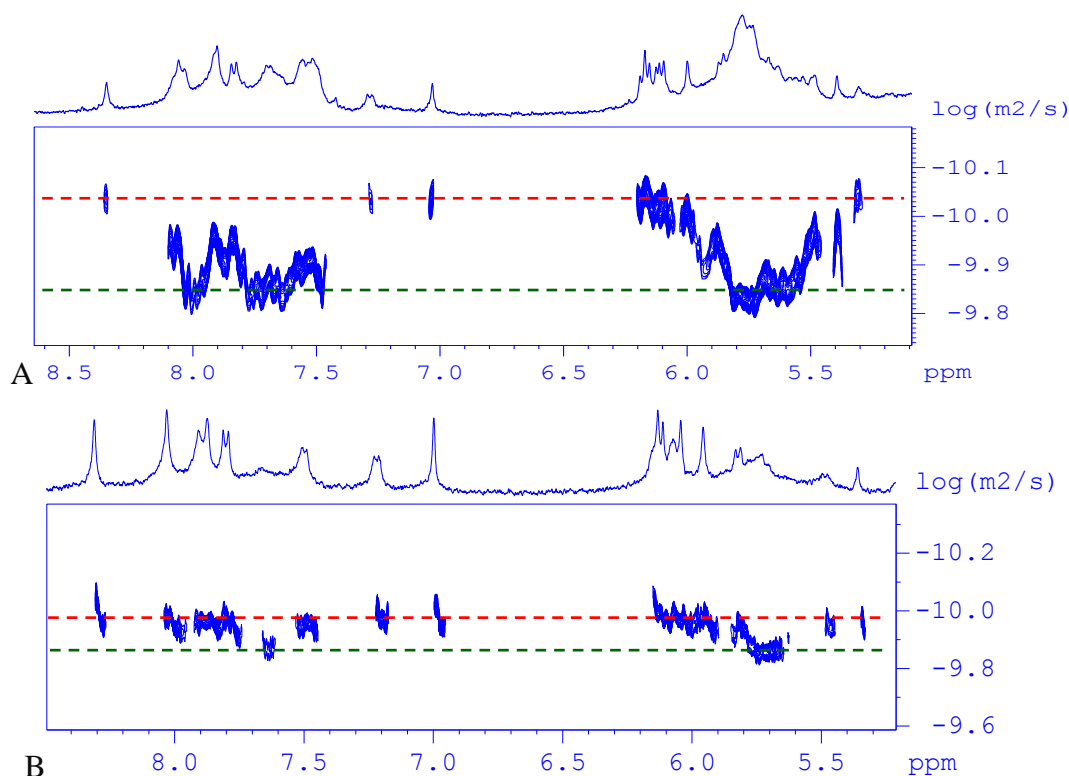
zwłaszcza w rejonie typowym dla oddziaływań pomiędzy iminowymi a aminowymi atomami wodoru (rys. 190, kolor niebieski i fioletowy). Sygnały te są charakterystyczne dla G-tetrad. Ustaliłam więc, że w obecności kationów potasu, z całą pewnością powstaje kwadrupleks, jednak nie mogłam przypisać kluczowych sygnałów, a tym samym nie mogłam określić jego topologii.

Na rys. 191 przedstawione są widma ^1H NMR wykonane w D_2O , w obecności kationów Na^+ dla różnych stężeń RNA, w zakresie od 0.09 mM do 1.65 mM. Wraz ze wzrostem stężenia RNA zaobserwować można pojawianie się dodatkowych sygnałów i zanik tych obecnych dla niższych stężeń RNA.



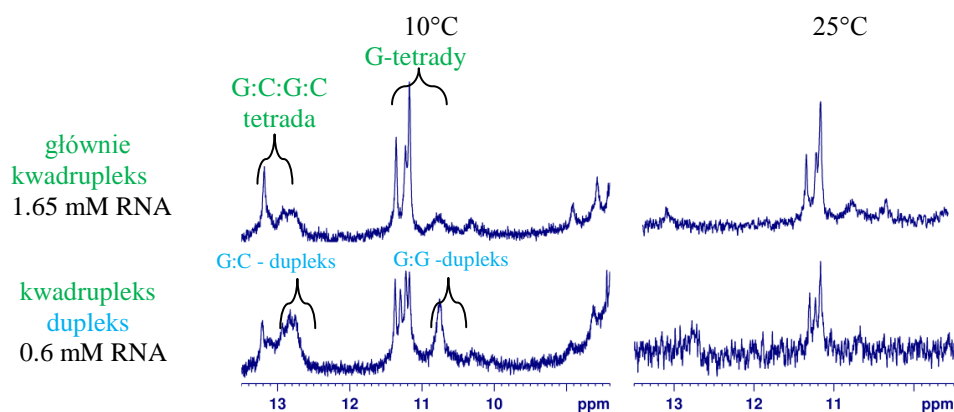
Rys. 191. Zależność widm ^1H NMR dla G-CGGCGG-C od stężenia RNA; fioletowymi prostokątami zaznaczono sygnały pojawiające się ze wzrostem stężenia RNA, zielonym – charakterystyczne dla niskich stężeń RNA; [bufor sodowy: 150 mM NaCl, 10 mM fosforan sodu, 0.1 mM EDTA, D_2O]

Widma typu DOSY, oprócz wyznaczenia współczynnika dyfuzji translacyjnej, w przypadku mieszaniny związków lub konformerów, umożliwiają rozseparowanie sygnałów w zależności od wielkości współczynnika dyfuzji poszczególnych składowych. Ponieważ współczynnik dyfuzji zależy między innymi od promienia hydrodynamicznego cząsteczki, otrzymuje się więc rozseparowanie sygnałów zależne od wielkości cząsteczek. Widma 2D DOSY pokazały, iż cząsteczka G-CGGCGG-C przyjmuje inną formę dla niskich i wysokich stężeń RNA. Dla 0.6 mM stężenia RNA dominującą była forma o mniejszym współczynniku dyfuzji (rys. 192 A), natomiast w wyższym stężeniu RNA (~ 1.65 mM) zaczynała dominować konformacja, której współczynnik dyfuzji odpowiadał cząsteczce o wyższej masie cząsteczkowej (rys. 192 B). Pośrednia wielkość współczynnika dyfuzji obserwowana w widmach 2D DOSY wynikała z uśrednienia współczynników dyfuzji nakładających się sygnałów.



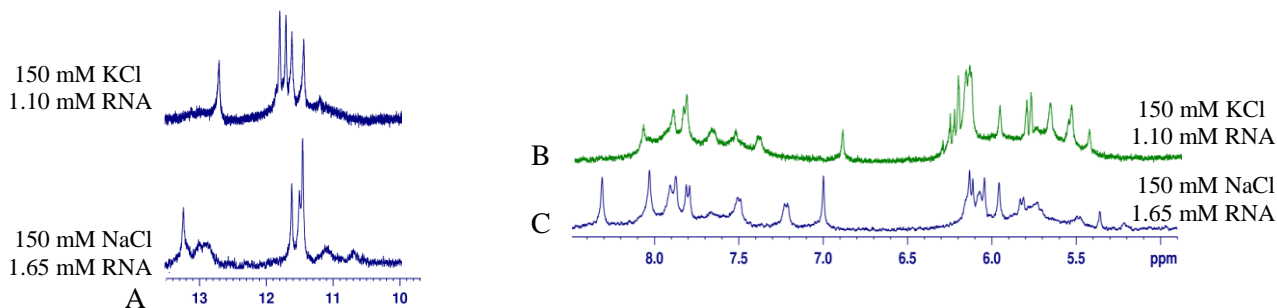
Rys. 192. Widmo 2D DOSY dla G-CGGCGG-C: 0.6 mM RNA (A), 1.65 mM RNA (B); [D_2O , bufor sodowy: 150 mM NaCl, 10 mM fosforan sodu, 0.1 mM EDTA]. Na osi odciętych (F2) - wartość przesunięć chemicznych [$\delta(^1H)$], a w kierunku osi rzędnych (F1) - logarytm wartości współczynnika dyfuzji [$\log(m^2/s)$]

Także w widmach wykonanych w H_2O , wraz ze wzrostem stężenia RNA obserwowałam duże zmiany. Zanikały sygnały pochodzące od iminowych atomów wodoru par zasad G:C (zakres 13-12.5 ppm), wzrastała natomiast intensywność sygnałów w zakresie 11.5-11.0 ppm (rys. 193, po lewej). Sygnały iminowe od par zasad G:C zanikały już w temperaturze pokojowej, natomiast te przy 11.5-11.0 ppm pozostawały nadal intensywne (rys. 193, po prawej). Dane te, wraz z informacjami uzyskanymi z widm 2D DOSY, wskazywały, że dla wyższych stężeń RNA, w obecności jonów Na^+ , dominującą formą jest kwadrupleks. Obserwacja ta była o tyle zaskakująca, gdyż jak już wcześniej pokazałam, ani widma UV ani CD nie wskazywały na możliwość tworzenia się kwadrupleksów w tych warunkach.



Rys. 193. Zależność widm 1H NMR dla G-CGGCGG-C od stężenia RNA [$10^\circ C$] (po lewej) oraz temperatury [$25^\circ C$] (po prawej), [bufor sodowy: 150 mM NaCl, 10 mM fosforan sodu, 0.1 mM EDTA, H_2O]. Rejon protonów iminowych.

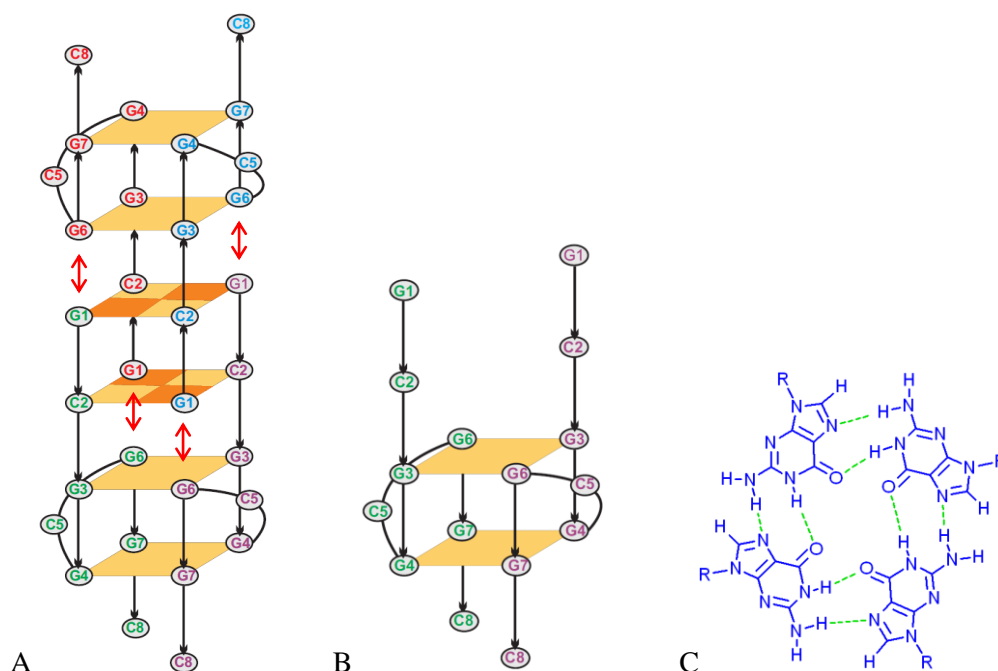
Aby upewnić się, że rzeczywiście mam do czynienia ze strukturą kwadrupleksu, porównałam widma ^1H NMR wykonane dla cząsteczki G-CGGCGG-C w roztworach różniących się typem kationów, Na^+ lub K^+ . Jak widać na rysunku 194, widma te są bardzo podobne, co potwierdza, że dla wysokich stężeń RNA, nawet w obecności kationów Na^+ , preferowaną strukturą tej cząsteczki jest kwadrupleks.



Rys. 194. Porównanie widm ^1H NMR dla G-CGGCGG-C w zależności od typu soli w rejonie: iminowym, $[\text{H}_2\text{O}, 10^\circ\text{C}]$ (A), aromatyczno-anomerycznym, $[\text{D}_2\text{O}, 25^\circ\text{C}]$, (B), (C)

Aby ustalić optymalne warunki dla dalszych pomiarów zarejestrowałam szereg widm ^1H NMR w różnych warunkach roztworu. Oprócz stężenia RNA, czasu koniecznego do ustalenia się równowagi pomiędzy dwiema formami, istotnym czynnikiem okazała się także temperatura pomiaru. Najwyższe linie rezonansowe uzyskałam w temperaturze 15°C i w tej temperaturze zarejestrowałam wszystkie widma dwuwymiarowe.

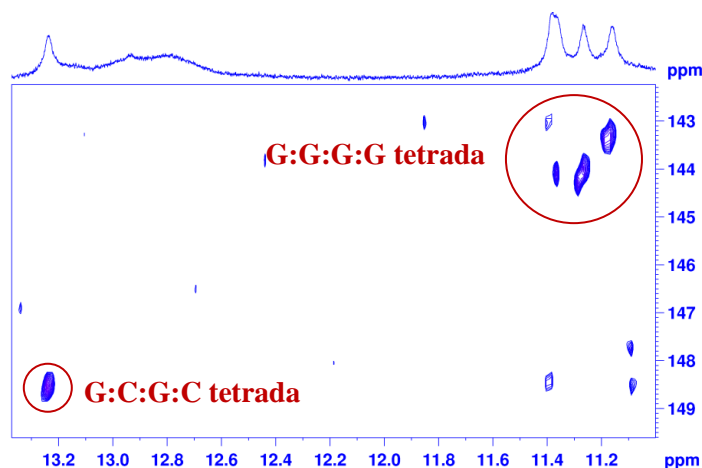
Szczegółowa analiza widm NMR (2D: ^1H - ^1H NOESY, ^1H - ^1H -COSY, ^1H - ^{31}P HSQC, ^1H - ^{13}C HSQC) wykonanych dla cząsteczki G-CGGCGG-C w D_2O , w obecności kationów Na^+ pozwoliła mi zaproponować pokazany schematycznie na rysunku 195 model tworzącej się struktury. Ta czteroniciowa struktura tworzy się z dwóch identycznych podjednostek, zbudowanych z dwóch równoległych G-tetrad posiadających niesparowane reszty **G1** i **C2** na końcu 5' oraz niesparowaną resztę **C8** na końcu 3' (rys. 195 B, C). Dwie takie podjednostki asocjują i powstają dodatkowo dwie mieszane tetrazy G:C:G:C o antyrównoległym ułożeniu nici typu góra-dół-góra-dół. W efekcie powstaje kwadrupleks zbudowany z czterech nici, w którym G-tetrazy są przedzielone mieszanymi tetradami G:C:G:C. W obrębie G-tetrad nici są ułożone równolegle, a wszystkie reszty guanozyny są w konformacji *anti*.



Rys. 195. Model struktury ząbionego kwadrupleksu utworzonego z czterech nici G-CGGCGG-C w obecności kationów sodu. Strzałką zaznaczyłam oddziaływanie kluczowe dla ustalenia poprawnego modelu (A), jednostka dimeru, którego asocjacja prowadzi do utworzenia czteroniciowego kwadrupleksu (B), $G_{(anti)}:G_{(anti)}:G_{(anti)}:G_{(anti)}$ tetrada (C)

Model ten zaproponowałam na podstawie następujących dowodów otrzymanych z widm NMR:

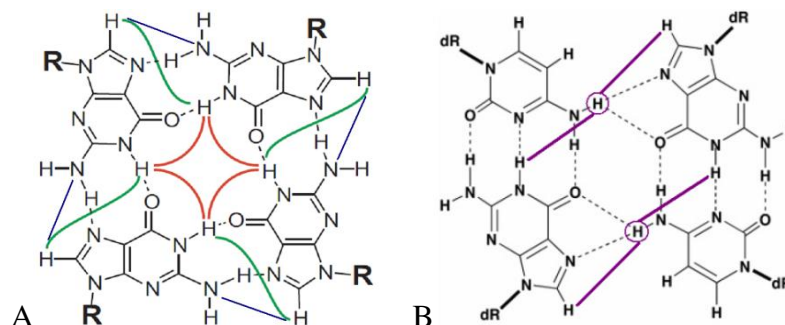
- Na podstawie analizy widma $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ HSQC ustaliłam, iż sygnał iminowy przy 13.25 ppm jest zaangażowany w tworzenie tetrady G:C:G:C, pozostałe sygnały w tworzenie tetrad G:G:G:G (rys. 196).



Rys. 196. Fragment widma $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ HSQC cząsteczki G-CGGCGG-C [H_2O , bufor sodowy: 150 mM NaCl, 10 mM fosforan sodu, 0.1 mM EDTA]

- W widmie 2D NOESY zarejestrowanym w H_2O obserwowałam wszystkie kontakty NOE charakterystyczne dla G-tetrad oraz mieszanych G:C:G:C tetrad. Unikalne dla G-tetrad (rys. 197 A) oraz G:C:G:C tetrad (rys. 197 B) sygnały korelacyjne zaznaczyłam na widmie pokazanym na rysunku 197 C. Na podstawie tych kontaktów potwierdziłam, iż każda podjednostka zbudowana jest z dwóch

G-tetrad utworzonych z reszt G4:G7:G4:G7 oraz G3:G6:G3:G6, a asocjujące podjednostki tworzą dwie równocenne, mieszane tetrazy G1:C2:G1:C2.



Kluczowe sygnały korelacyjne obserwowane w widmach 2D NOESY dla G-tetrad (A) i mieszanych tetrad G:C:G:C (B):

tetradą G:G:G:G - kolor czerwony: G:NH1 - G:NH1

kolor zielony: G:NH1 - G:H8

kolor niebieski: G:NH₂ - G:H8

tetradą G:C:G:C - kolor fioletowy: C:NH₂ - G:H8

a. G1:NH1-C2:NH2

b. G1:NH1-C2:H1'

c. G7:NH1-G4:H8

d. G7:NH1-G3:H8

e. G4:NH1-G7:H8

f. G4:NH1-G6:H8

g. G3:NH1-G6:H8

h. G6:NH1-C2:NH2

i. G6:NH1-G3:H8

j. G6:NH1-G7:H8

k. G6:NH1-C2:H6

l. G6:NH1-G1:H8

ł. G7:NH2₁-G4:H8

m. G7:NH2₁-G3:H8

n. G3:NH2₁-G6:H8

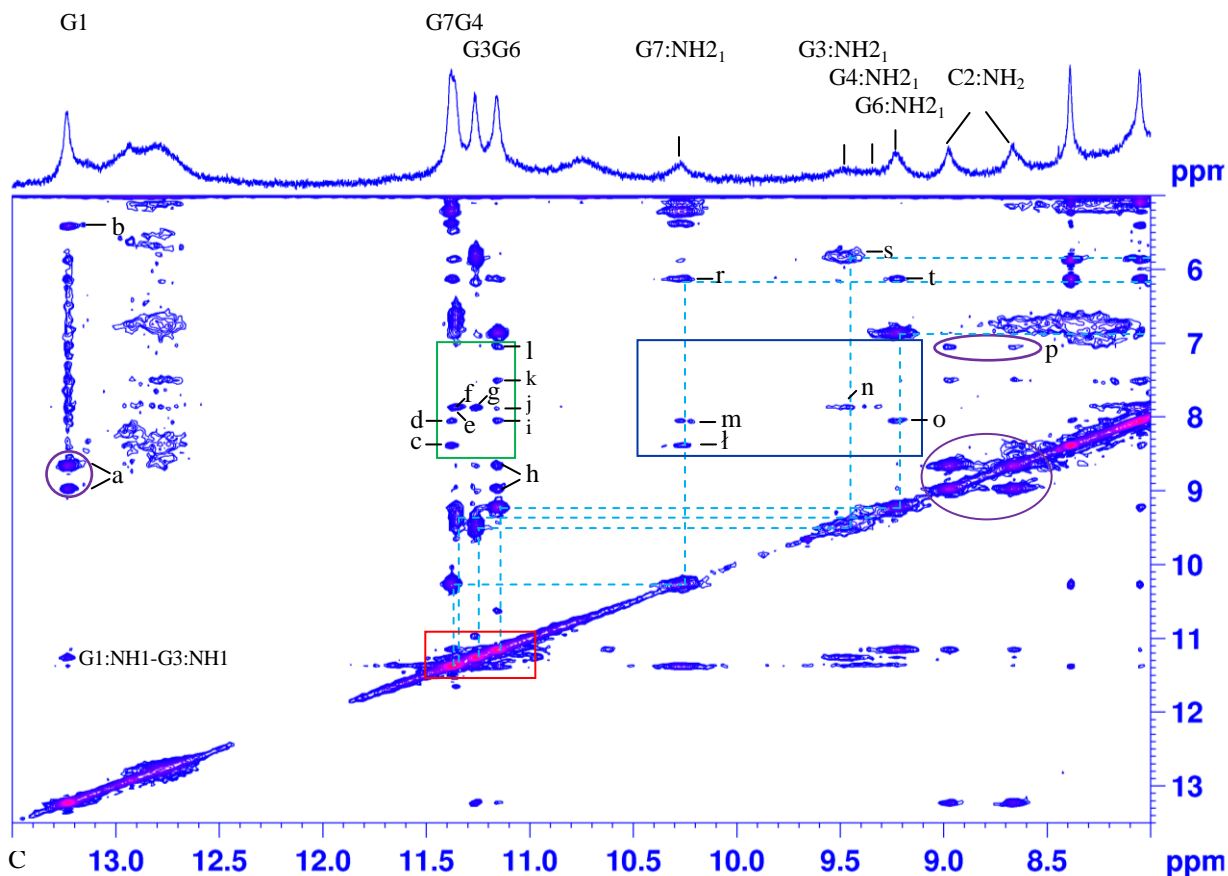
o. G6:NH2₁-G3:H8

p. C2:NH2- G1:H8

r. G7:NH2₁- G7:NH2₂

s. G3:NH2₁- G7:NH2₂

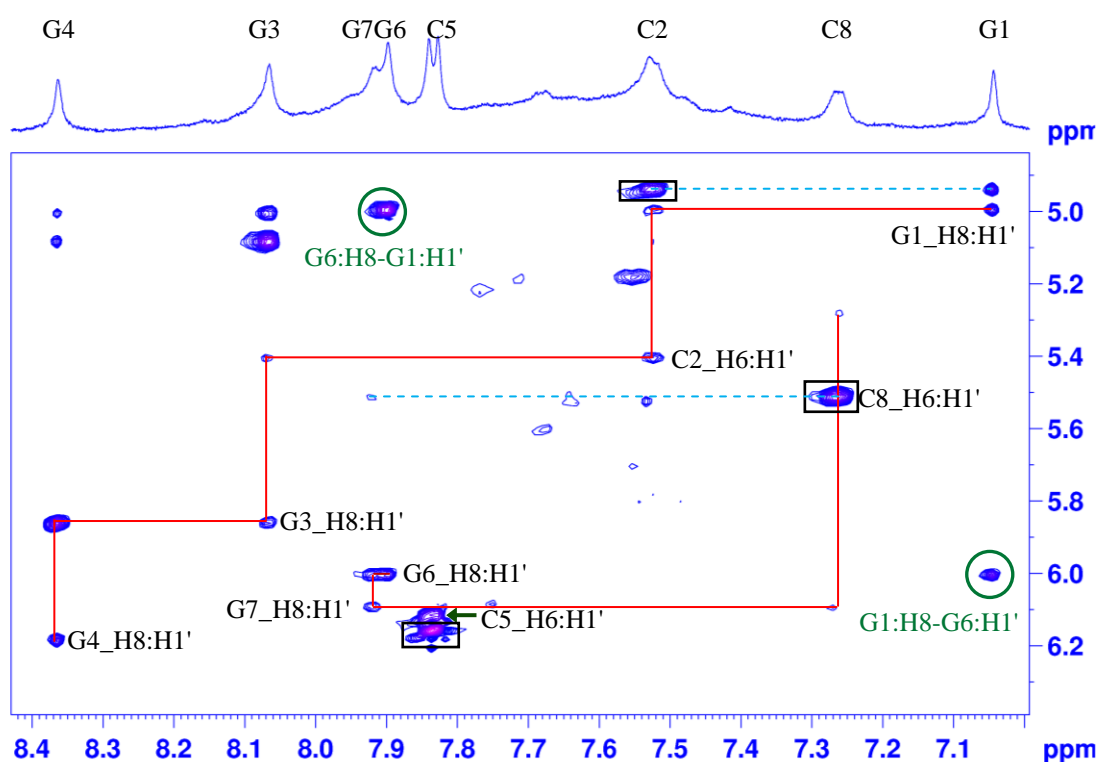
t. G6:NH2₁- G7:NH2₂



Rys. 197. Fragment widma 2D NOESY dla G-CGGCGG-C. Zaznaczone są charakterystyczne dla G-tetrad kontakty od protonów iminowych oraz aminowych (C); użyte kolory odpowiadają kolorom linii łączących odpowiednie atomy wodoru, pomiędzy którymi obserwujemy te kontakty, zaznaczone w tetradach powyżej, [H₂O, 15°C]

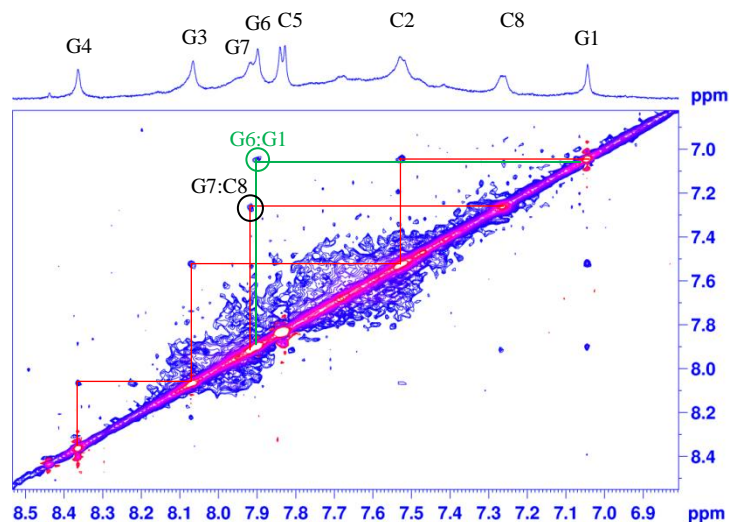
- Obecność silnego sygnału korelacyjnego **G1:H8-G6:H1'** (rys. 198) oraz sygnału **G1:H8-G6:H8** (rys. 199) potwierdzającego występowanie oddziaływania warstwowego pomiędzy resztami **G1** a **G6** wskazywała na dimeryzację dwóch podjednostek kwadrupleksów (rys. 195, zaznaczono strzałkami).

- W widmie 2D NOESY pokazanym na rysunku 198 brak jest sekwencyjnych połączeń **G4:H1'-C5:H6** oraz **C5:H6-G6:H1'**. Dla reszty **C5** nie obserwowałam także charakterystycznego dla helisy A-RNA kontaktu typu $C_n:H5-G_{(n-1)}:H8$ (rys. 198, kolor niebieski dla reszt C2 i C8). Dane te wskazywały, że reszta **C5** może tworzyć pętlę, za czym przemawiało również nietypowe przesunięcie protonu C5-H5. Analiza objętości sygnałów korelacyjnych w widmie 2D NOESY pokazała ponadto, że reszta **C5** przyjmuje konformację *syn* (rys. 198).



Rys. 198. Rejon H8/H6-H1'/H5 widma 2D NOESY dla G-CGGCGG-C [D₂O, 15°C]. W ścieżce NOE zaznaczone są wewnątrzcząsteczkowe sygnały korelacyjne H8/H6-H1'. Zielonym kółkiem zaznaczone są sygnały korelacyjne pomiędzy resztami G6 a G1, sygnały korelacyjne H6:H5 reszt cytydyny zostały oznaczone prostokątem

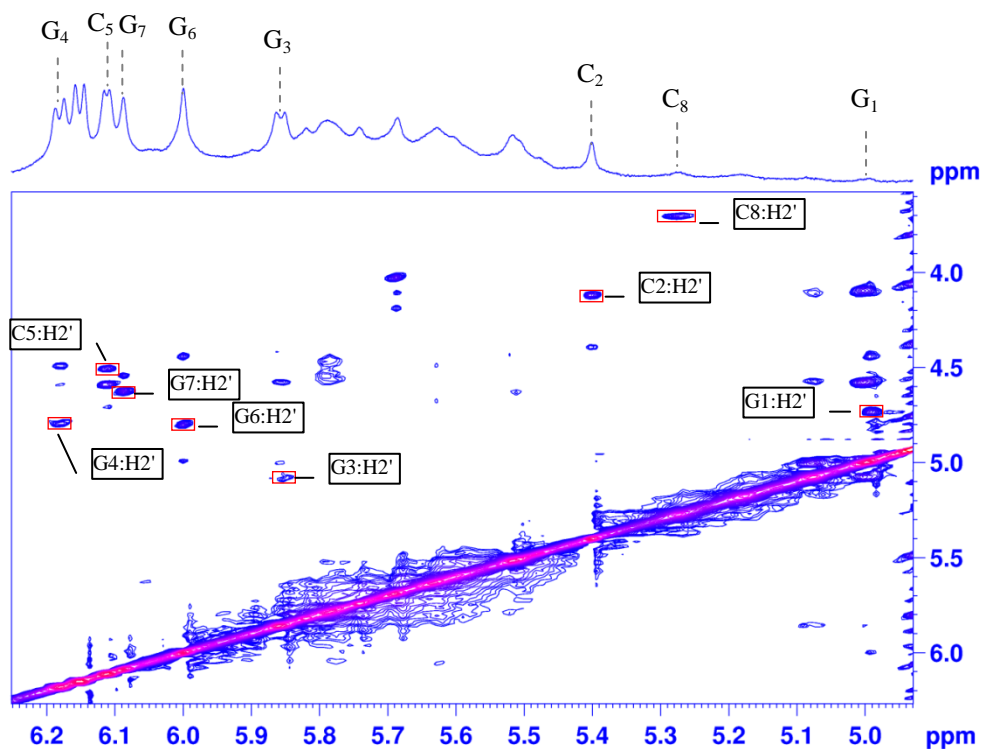
Na rysunku 199 przedstawiłam fragment widma 2D NOESY pokazujący oddziaływania warstwowe pomiędzy aromatycznymi atomami wodoru.



Rys. 199. Widmo 2D NOESY dla G-CGGCGG-C, zakres aromatyczno-aromatyczny

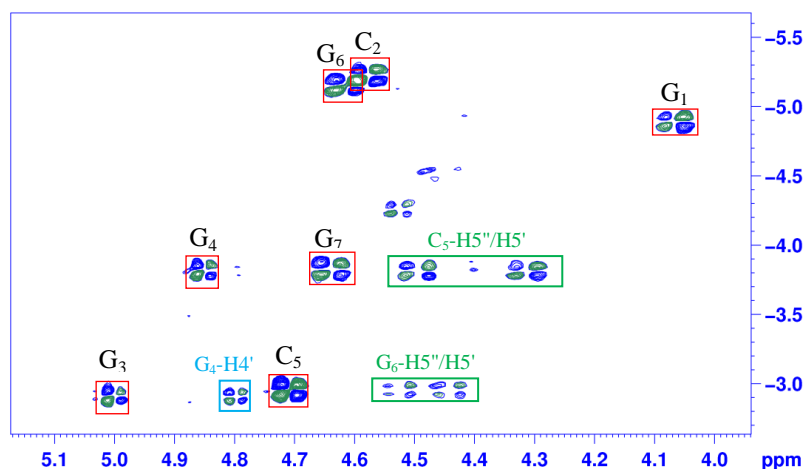
- Obecność sygnału korelacyjnego **G7:H8-C8:H6** wskazywała na istnienie oddziaływań warstwowych pomiędzy resztami **G7** i **C8**, co jest możliwe tylko wtedy jeśli zasada heterocykliczna reszty **C8** umiejscowiona jest pod resztą **G7** (rys. 199).

Sygnały pochodzące od protonów H1' reszt **C2**, **C8** i **G1** oraz protonów H2' reszt **C2** oraz **C8** są silnie przesunięte w stronę niższych wartości ppm w stosunku do pozostałych reszt nukleotydowych (rys. 200). Takie przesunięcia mogą być wynikiem zaangażowania reszt **G1** oraz **C2** w tworzenie mieszanych tetrad G:C:G:C. Natomiast reszta **C8** jest niesparowana i dlatego przesunięcia chemiczne dla tej reszty mogą przyjmować nietypowe wartości.



Rys. 200. Fragment widma 2D NOESY dla G-CGGCGG-C, [D₂O, d₈ = 80 ms], zaznaczone są sygnały korelacyjne H1'-H2'

W typowej helisie A-RNA przesunięcia chemiczne atomu ^{31}P występują w wąskim zakresie 1 ppm (-4.6 do -3.6 ppm). Dla cząsteczki G-CGGCGG-C zakres ten wynosi ~ 2.5 ppm (rys. 201).



Rys. 201. Widmo ^1H - ^{31}P HSQC dla G-CGGCGG-C, z zaznaczonymi przypisaniami $\text{H}3'(n-1)\text{-P}(n)\text{-H}4'/\text{H}5'/\text{H}5''(n)$.

Szeroki zakres przesunięć chemicznych $\delta(^{31}\text{P})$ mógł być spowodowany bliskością atomów fosforu w pętli zewnętrznej lub nietypową konformacją łańcucha fosfodiesterowego.

Przypisania sygnałów ^1H NMR dla cząsteczki G-CGGCGG-C zebrałam w tabeli 23.

Tabela 23. Przypisania atomów wodoru dla cząsteczki G-CGGCGG-C [150 mM NaCl, 10 mM fosforan sodu, 0.1 mM EDTA]

G(CGG) ₂ C	H8/H6	H5	H1'	H2'	H3'	H4'	H5'/H5''
G ₁	7.04		4.99	4.72	4.05	4.44	4.02, 3.68
C ₂	7.52	4.94	5.40	4.12	4.57	-	4.39, 4.04
G ₃	8.07		5.86	5.10	5.01	-	4.58, 4.12
G ₄	8.36		6.18	4.78	4.84	4.80	4.41, 4.28
C ₅	7.83	6.15	6.11	4.50	4.70	-	4.50, 4.29
G ₆	7.89		6.00	4.80	4.61	-	4.52, 4.44
G ₇	7.91		6.09	4.62	4.64	-	4.56, 4.15
C ₈	7.25	5.51	5.28	3.71	4.38	4.08	3.88, 3.71

Zaproponowana przeze mnie struktura nie jest nowym motywem wśród znanych struktur kwadrupleksów (143). Kwadrupleks o takiej topologii tworzy również cząsteczka DNA o sekwencji GCGGTGGAT w obecności kationów sodu [rozdział II.8.]. Wszystkie kluczowe sygnały, które były niezbędne dla ustalenia jej pofałdowania są analogiczne do tych omówionych powyżej dla cząsteczki G-CGGCGG-C.

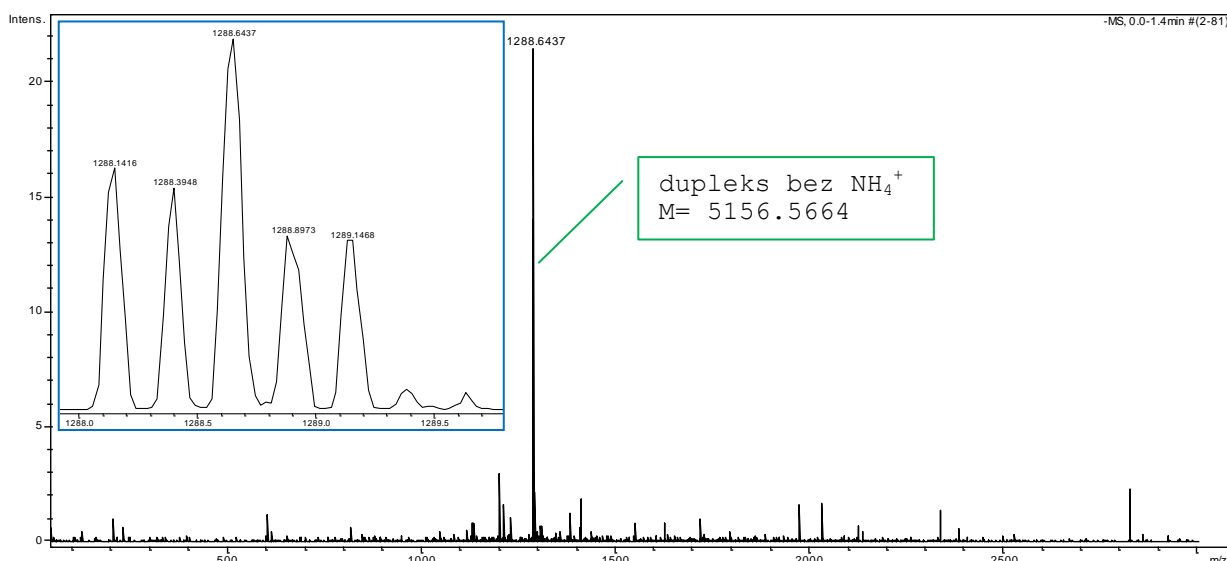
Próbowałam także potwierdzić tworzenie się kwadrupleksu przy pomocy spektrometrii mas. Jak już wcześniej wspomniałam, dla zwiększenia czułości metody eksperyment ten wykonuje się w obecności kationów amonu. Jednak, jak wynikało z porównania profili migracji cząsteczki G-CGGCGG-C w żelach natywnych, obecność kationów amonowych nie sprzyjała powstawaniu struktury kwadrupleksu (rys. 175). Obecność kationów K^+ ani NH_4^+ nie sprzyjała również powstawaniu analogicznego kwadrupleksu DNA (143). Prawdopodobnie dlatego w widmie masowym

dla stężenia $\sim 5 \mu\text{M}$ RNA obserwowałam tylko pik od formy dupleksu (rys. 202). W wyższym stężeniu RNA ($\sim 70 \mu\text{M}$) pojawił się mało intensywny pik odpowiadający formie czteroniciowego kwadrupleksu, który związał dwa kationy NH_4^+ (rys. 203, 204).

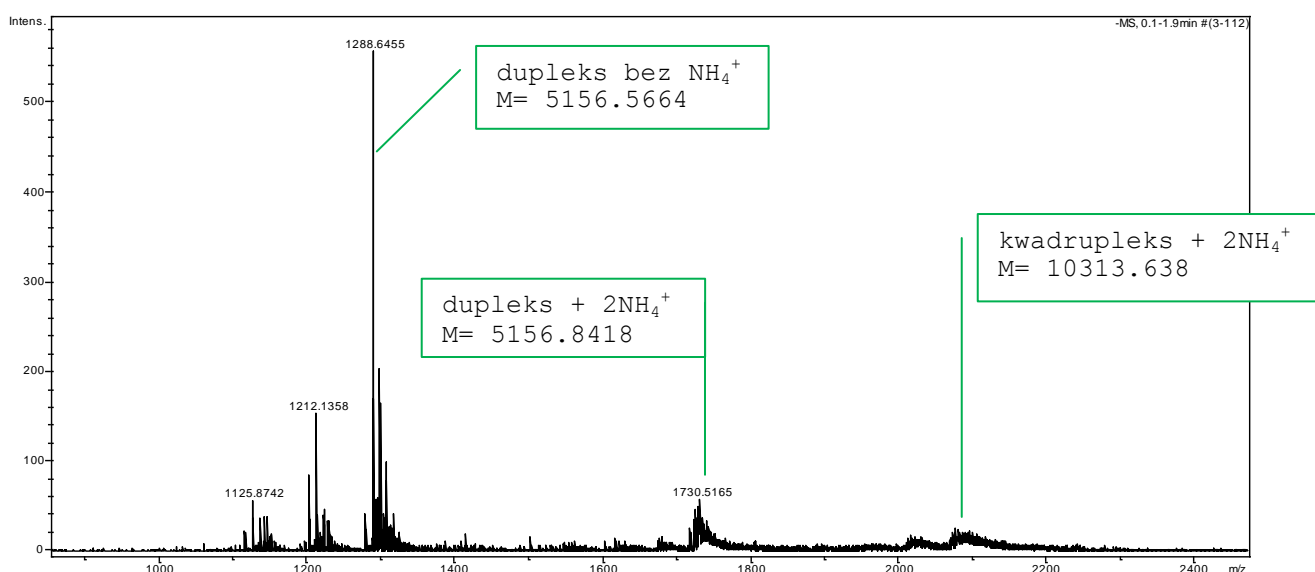
Masy cząsteczkowe RNA zostały wyliczone według wzoru: $m/z = [M_{\text{RNA}} + n \times 17 - z]/z$ (n - liczba NH_4^+ , z - ładunek). Zespoły pików molekularnych zgadzają się z tymi obliczonymi teoretycznie (rys. 205).

Monoizotopowe masy cząsteczkowe dla poszczególnych form G-CGGCGG-C wynoszą:

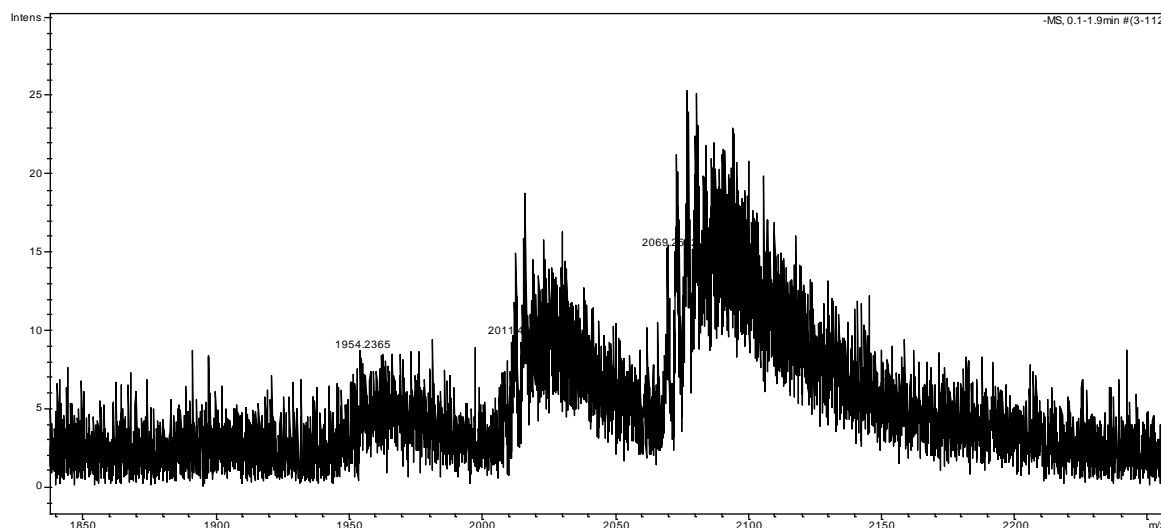
- pojedyncza nić, $[M_{\text{C77H97N34O54P7}}] = 2578.40520$
- dupleks, $[M_{\text{C154H194N68O108P14}}] = 5156.8104$
- kwadrupleks, $[M_{\text{C308H388N136O216P28}}] = 10313.6208$



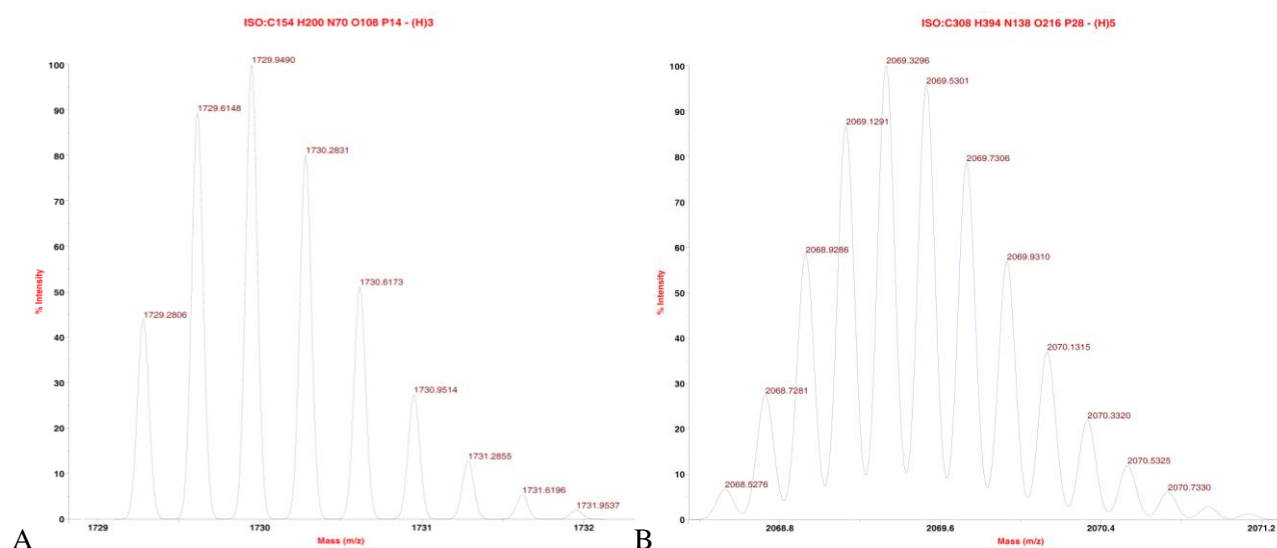
Rys. 202. Widmo masowe cząsteczki G-CGGCGG-C ($\sim 5 \mu\text{M}$), $[150 \text{ mM } \text{NH}_4\text{Cl}]$; jonizacja poprzez elektrorozpraszanie



Rys. 203. Widmo masowe cząsteczki G-CGGCGG-C ($\sim 70 \mu\text{M}$), $[150 \text{ mM } \text{NH}_4\text{Cl}]$; jonizacja poprzez elektrorozpraszanie



Rys. 204. Rozciągnięcie piku od kwadrupleksu w widmie masowym dla G-CGGCGG-C (~ 70 mM)



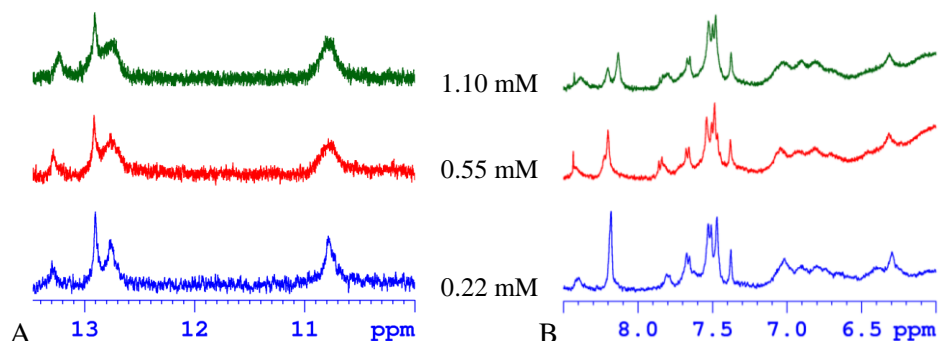
A Rys. 205. Zespół piku molekularnego wyliczony teoretycznie dla: $(G-CGGCGG-C)_2+2NH_4^+$, $z=4$ (A), $(G-CGGCGG-C)_4+2NH_4^+$, $z=5$ (B)

W przypadku cząsteczki G-CGGCGG-C zmiana warunków środowiska wpływa na przesunięcie równowagi pomiędzy strukturą dupleksu i kwadrupleksu. Jak ustaliłam na podstawie analizy widm NMR, jedynie w obecności kationów Na^+ i dla niskich stężeń RNA (~ 0.1 mM) dupleks stanowił główną formę w roztworze. Dla wyższych stężeń G-CGGCGG-C niezależnie od typu kationu, K^+ lub Na^+ , dominującą formą jest kwadrupleks. Niestety, ze względu na obecność struktur wyższego rzędu w roztworze zawierającym kationy K^+ , nie udało mi się ustalić topologii zawiązującego się w tych warunkach kwadrupleksu. Jednakże analiza widm NMR kwadrupleksów dostarczyła argumentów przemawiających za tym, że struktury powstające w obecności jonów K^+ i Na^+ są takie same. Przede wszystkim, w obu przypadkach, w widmach wykonanych w H_2O pojawiają się cztery sygnały iminowe w regionie 12.0-11.0 ppm, charakterystycznym dla G-tetrad i jeden sygnał odsunięty w kierunku większych wartości ppm (~ 13.5-12.5 ppm), wskazujący na zawiązywanie się tetrady

G:C:G:C. Ponadto, obecność sygnałów korelacyjnych pomiędzy resztami **G1** i **G6** w widmach NOESY, kluczowych dla potwierdzenia dimeryzacji dwóch podjednostek kwadrupleksów, przemawia za tworzeniem się takich samych struktur. Z kolei, stosunkowo duże różnice przesunięć chemicznych, obserwowane dla poszczególnych atomów wodoru, mogą być spowodowane innym otoczeniem wokół protonów w G-tetradach generowanym przez inną wielkość promienia jonowego kationów potasu i sodu oraz innym ich usytuowaniem względem tetrad.

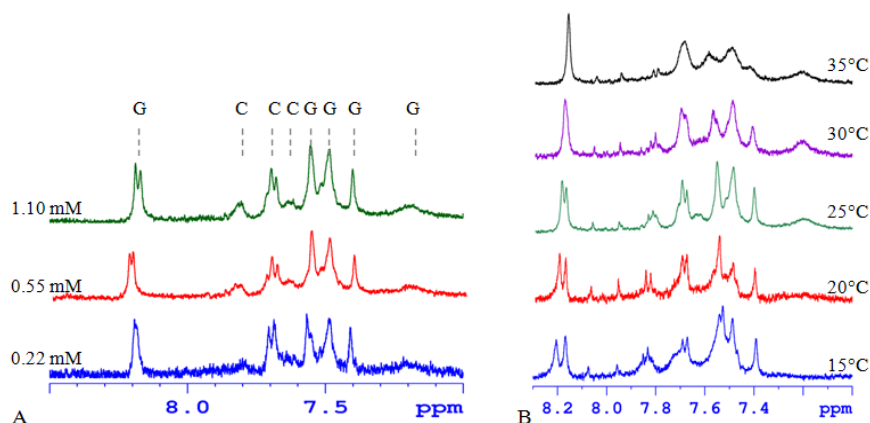
III.6. Analiza cząsteczki RNA zawierającej dodatkową grupę fosforanową na końcu 5'

Dla cząsteczki G-CGGCGG-C (**12**), w obecności kationów potasu, obserwowałam narastające w czasie poszerzenie sygnałów w widmie ^1H NMR związane z powstawaniem agregatów. Ponieważ proces silnej agregacji związany był głównie z obecnością kationów potasu, a kwadrupleks o strukturze pokazanej na rysunku 195 nie może agregować, to jest wysoce prawdopodobne, że kationy potasu promują powstawanie również innej struktury kwadrupleksu, na przykład takiej jak na rysunku 186. Dla cząsteczek G-C^{Br}GGCGG-C oraz G-C^{Me}GGCGG-C, wprowadzenie dodatkowej grupy fosforanowej z końca 5' zapobiegało agregacji typu głowa do głowy, postanowiłam więc sprawdzić, czy podobny efekt uzyskam dla sekwencji G-CGGCGG-C. Okazało się jednak, że cząsteczka pG-CGGCGG-C (**13**) tworzy głównie dupleks, o czym świadczyła obecność uśrednionego sygnału od par zasad G:G (rys. 206 A) przy 10.75 ppm oraz trzech sygnałów iminowych od par G:C. Podczas, gdy w obecności kationów sodu dla cząsteczki G-CGGCGG-C wraz ze wzrostem stężenia RNA obserwowałam narastanie sygnałów od kwadrupleksu, to dla cząsteczki z dodatkową grupą fosforanową na końcu 5' widmo praktycznie nie ulegało zmianie, niezależnie od stężenia RNA (rys. 206). Również w obecności kationów K⁺ widma ^1H NMR nie zmieniały się i nie wskazywały na powstawanie kwadrupleksu.



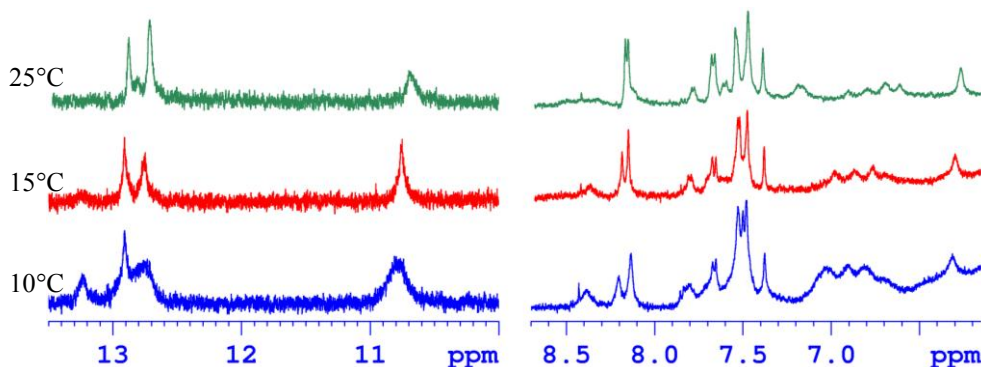
Rys. 206. Zależność widm ^1H NMR dla pG-CGGCGG-C od stężenia RNA: rejon iminowy (A), rejon aromatyczny (B), [H_2O , 10°C , bufor sodowy: 150 mM NaCl, 10 mM fosforan sodu, 0.1 mM EDTA]

Na rysunku 207 pokazana jest zależność widm ^1H NMR od stężenia RNA i temperatury, w obecności 150 mM NaCl w D_2O . Zwiększenie stężenia pG-CGGCGG-C oraz obniżenie temperatury powodowało podwojenie liczby sygnałów, co było szczególnie widoczne dla sygnału przy ok. 8.2 ppm (rys. 207).



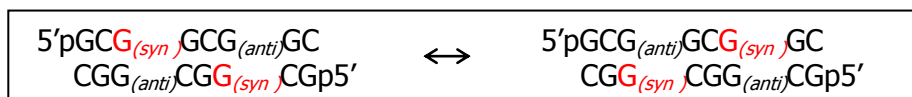
Rys. 207. Zależność widm ^1H NMR dla pG-CGGCGG-C od: stężenia RNA (A), temperatury, 1.1 mM RNA (B)

Konformacyjna labilność tej cząsteczki jest spowodowana możliwością przyjmowania konformacji *syn* lub *anti* przez poszczególne reszty guanozyny w parach zasad G:G. Dla cząsteczki pG-CGGCGG-C, w temperaturze pokojowej pary zasad G(*syn*):G(*anti*) oraz G(*anti*):G(*syn*) występują z taką samą częstością i sygnały przy ~ 8 ppm są porównywalnej intensywności, natomiast w niskich temperaturach (10 °C) zaczyna dominować jedna forma więc intensywność jednego z sygnałów wyraźnie maleje (rys. 208).



Rys. 208. Zależność widm ^1H NMR dla pG-CGGCGG-C od temperatury [H_2O , 1.1 mM RNA, bufor sodowy: 150 mM NaCl, 10 mM fosforan sodu, 0.1 mM EDTA]

Ponizej przedstawiłam schematycznie równowagę pomiędzy dupleksami:



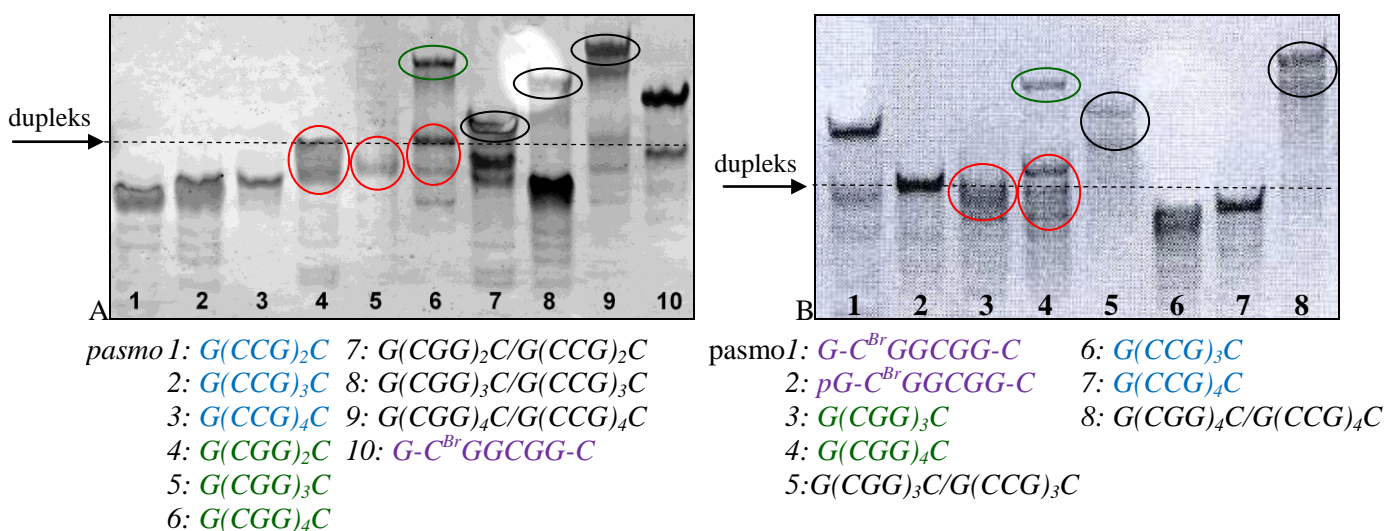
III.7. Analiza równowag konformacyjnych cząsteczek $G(\text{CCG})_n\text{C}$, $G(\text{CGG})_n\text{C}$ oraz $G(\text{CGG})_n\text{C}/G(\text{CCG})_n\text{C}$ ($n = 2-4$)

Oczekiwałam, że cząsteczka utworzona z połączenia komplementarnych nici G-CGGCGG-C (12) i G-CCGCCG-C (16) będzie tworzyć dupleks zbudowany jedynie z kanonicznych par G:C.



Jednak, jak już wcześniej wspomniałam, szybkość migracji tej cząsteczki w żelu, w warunkach natywnych, była porównywalna z szybkością migracji cząsteczki $\text{G-C}^{\text{Me}}\text{GCCG-C}$ tworzącej strukturę czteroniciową (rys. 104).

Postanowiłam sprawdzić co się stanie, gdy połączę ze sobą komplementarne nici zbudowane z większej liczby powtórzeń. Okazało się, że w warunkach natywnych cząsteczki $G(\text{CGG})_3\text{C}/G(\text{CCG})_3\text{C}$ i $G(\text{CGG})_4\text{C}/G(\text{CCG})_4\text{C}$ migrowały wolniej nie tylko od cząsteczki $G(\text{CGG})_2\text{C}/G(\text{CCG})_2\text{C}$ (rys. 209 A, kolor czarny, pasmo 7), ale również od kwadrupleksu $(\text{G-C}^{\text{Br}}\text{GGCGG-C})_4$ (rys. 209 A, pasmo 10, rys. 209 B, pasmo 1), co sugerowało, że połączenie komplementarnych nici prowadzi do utworzenia struktur zbudowanych z więcej niż dwóch łańcuchów oligonukleotydowych. Ze względu na częściową degradację cząsteczki $G(\text{CGG})_3\text{C}$ (14), cząsteczka $G(\text{CGG})_3\text{C}/G(\text{CCG})_3\text{C}$ (rys. 209 A, pasmo 8) została utworzona z połączenia dwóch nici w nierównomolowym stosunku i w konsekwencji główny prążek odpowiadał cząsteczce $G(\text{CCG})_3\text{C}$ (17). W powtórzonym eksperymencie cząsteczka $G(\text{CGG})_3\text{C}/G(\text{CCG})_3\text{C}$ migrowała wolniej niż cząsteczka $G(\text{CCG})_3\text{C}$ oraz $G(\text{CGG})_3\text{C}$ (rys. 209 B, pasmo 5).



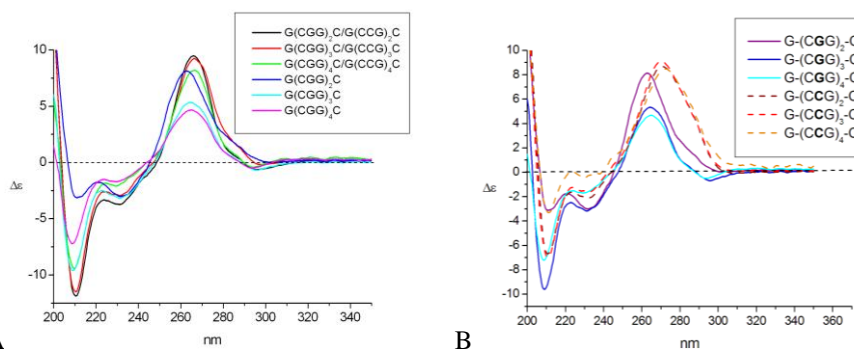
Rys. 209. Profil migracji w żelu natywnym 15% (277 K) cząsteczek RNA utworzonych z trójnukleotydowych powtórzeń CCG i CCG [150 mM NaCl, 10 mM fosforan sodu, 0.1 mM EDTA];

Z kolei cząsteczki zawierające powtórzenia CCG, niezależnie od liczby tych powtórzeń ($n=2,3,4$), migrowały bardzo podobnie, szybciej od dupleksu G-CGGCGG-C (rys. 209 A, pasmo 1-3; rys. 209 B,

pasmo 6-7). Ponieważ cząsteczka G-CCGCCG-C (**16**) przyjmuje w roztworze strukturę spinki, co już uprzednio pokazałam w rozdziale III.2, porównywalna szybkość migracji pozostałych cząsteczek wskazywała, że cząsteczki G(CCG)₃C (**17**) i G(CCG)₄C (**18**) tworzą również spinki.

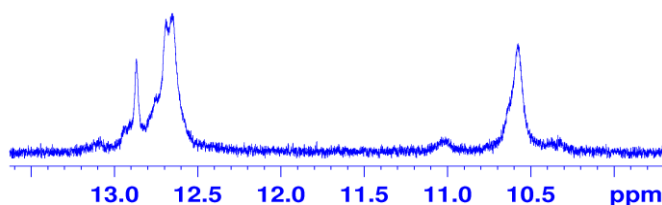
W odpowiednich warunkach cząsteczki zbudowane z powtórzeń CGG wykazują tendencję do tworzenia kwadrupleksów. Jak pokazałam na rysunku 209 dla cząsteczki G(CGG)₄C (**15**) obserwowałam dwa pasma znacznie różniące się migracją (kolor zielony: rys. 209 A, pasmo 6; rys. 209 B, pasmo 4). Jedno odpowiadało najprawdopodobniej formie czteroniciowej, drugie migrowało porównywalnie do dupleksu (kolor czerwony: rys. 209 A, pasmo 6; rys. 209 B, pasmo 4). Cząsteczka G(CGG)₃C (**14**) migruje podobnie jak dupleks (kolor czerwony: rys. 209 B, pasmo 3).

Powstawanie struktur kwadrupleksów dla cząsteczek G(CGG)₂C/G(CCG)₂C, G(CGG)₃C/G(CCG)₃C, G(CGG)₄C/G(CCG)₄C oraz G(CGG)₄C próbowałam potwierdzić przy pomocy technik takich jak CD, czy spektroskopia NMR. Widmo CD cząsteczki G(CGG)₄C, w buforze zawierającym kationy Na⁺ nie wskazywało na istnienie kwadrupleksu (rys. 210). W widmach CD cząsteczek utworzonych przez asocjację komplementarnych nici G(CGG)_nC/G(CCG)_nC (n=2-4) również obserwowałam jedynie pasma charakterystyczne dla dupleksu (rys. 210 A). W przypadku cząsteczek tworzących spinkę, liczba powtórzeń CCG nie miała praktycznie wpływu na widmo CD (rys. 210 B).



Rys. 210. Widma CD cząsteczek G(CGG)_nC, G(CCG)_nC oraz G(CGG)_nC/G(CCG)_nC, (n=2,3,4); bufor: 150 mM NaCl, 10 mM fosforan sodu, 0.1 mM EDTA

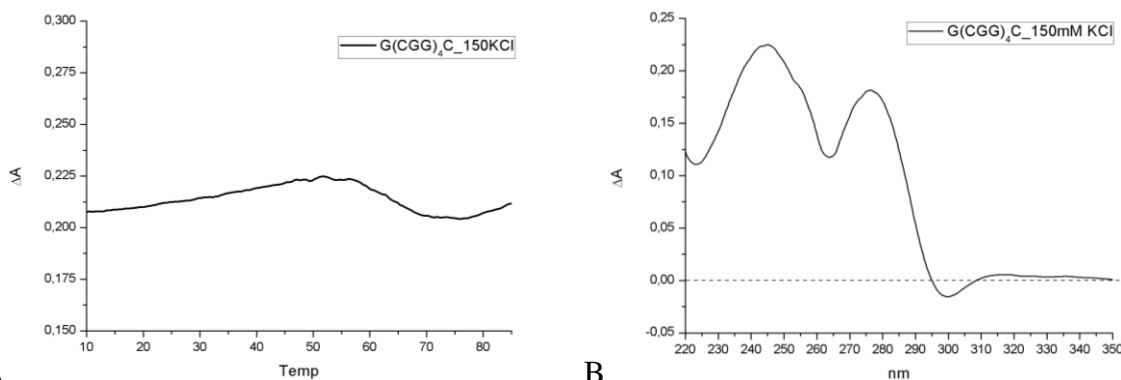
Na rysunku 211 pokazane jest widmo ¹H NMR zarejestrowane dla cząsteczki G(CGG)₄C (~ 0.45 mM) w obecności kationów Na⁺.



Rys. 211. Rejon iminowy widma ¹H NMR dla G(CGG)₄C (**15**) [H₂O, bufor: 150 mM NaCl, 10mM fosforan sodu, 0.1 mM EDTA]

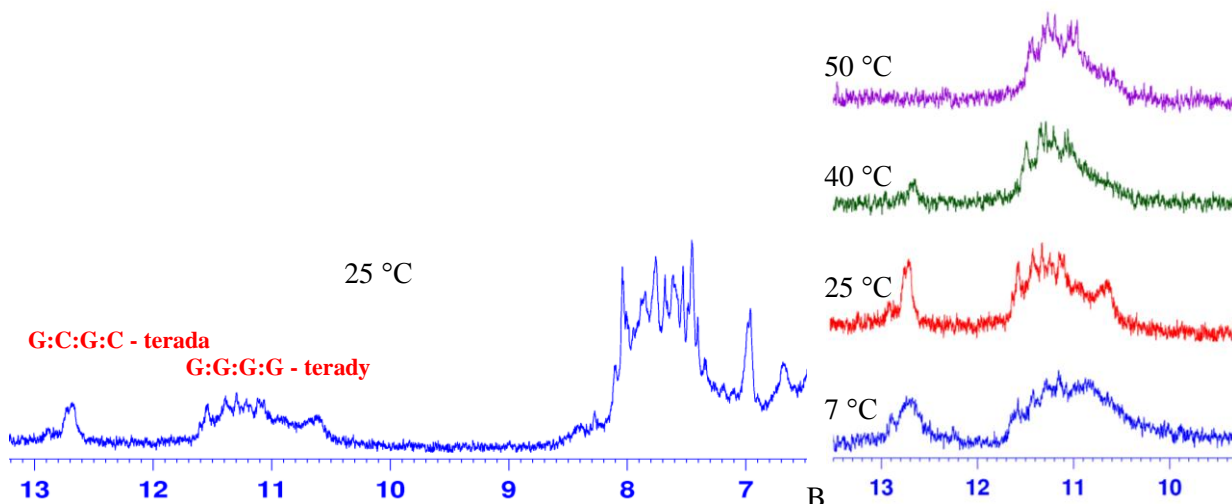
Widma ¹H NMR cząsteczki **12** oraz **15**, w obecności kationów Na⁺ oraz dla niskiego stężenia RNA, dla obu tych cząsteczek są bardzo podobne. Obecność sygnałów od par zasad G:C (13.2 - 12.5 ppm) oraz G:G (10.8 - 10.4 ppm) świadczy, iż dominującą formą cząsteczki **15** jest spinka lub dupleks.

Postanowiłam sprawdzić, jak obecność kationów K^+ wpływa na strukturę przyjmowaną przez cząsteczkę G-CGGCGGCGGCGG-C. Okazało się, że cząsteczka ta w obecności kationów K^+ , jak wskazywały widma TDS oraz profil krzywej topnienia przy 295 nm, tworzy kwadrupleks (rys. 212).



Rys. 212. Dla cząsteczki $G(CGCG)_4C$ w obecności 150 mM KCl i 10 mM fosforanu potasu: krzywa topnienia przy długości fali 295 nm (A), różnicowe widmo absorpcyjne TDS, [25°C, 90°C] (B)

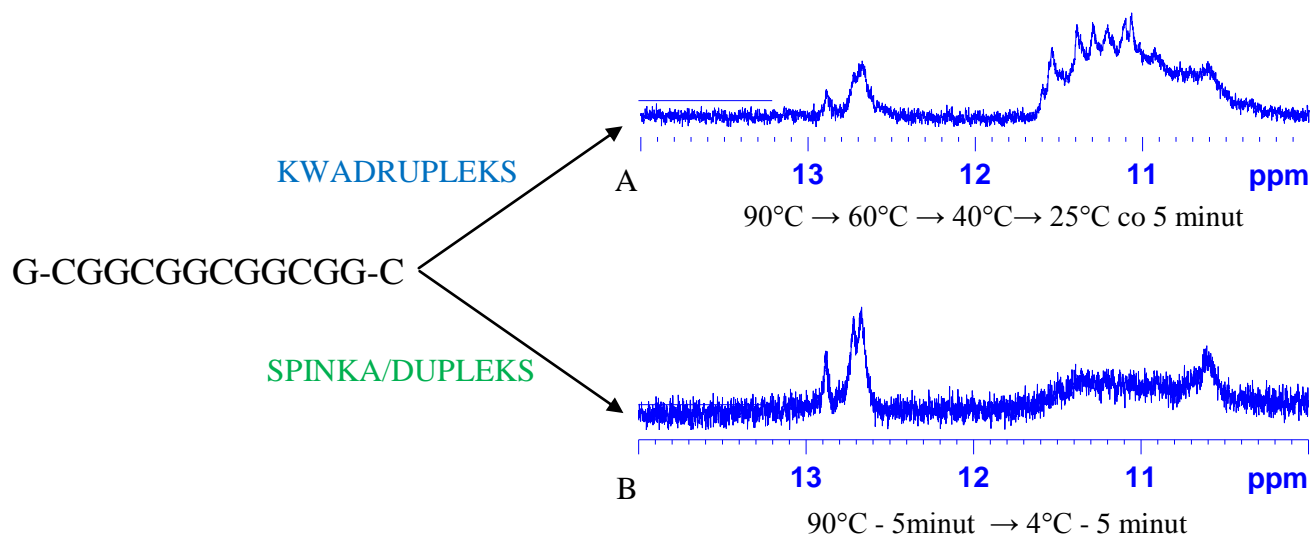
Zastąpienie kationów Na^+ kationami K^+ powodowało zmianę preferowanej struktury cząsteczki G-CGGCGGCGGCGG-C. W widmie 1H NMR, zarejestrowanym w obecności kationów K^+ , obserwowałam głównie sygnały od protonów iminowych, w rejonie 12.0-10.7 ppm, co wskazywało na powstawanie typowego kwadrupleksu (rys. 213). Oprócz sygnałów typowych dla G-tetrad obserwowałam również sygnał przy ~ 12.7 ppm, który był trwały nawet w temperaturze 40°C i sugerował możliwość tworzenia się mieszanej tetrady G:C:G:C.



Rys. 213. Fragment widma 1H NMR dla $G(CGCG)_4C$ (A). Zależność szybkości wymiany protonów iminowych od temperatury (B); [H_2O , bufor: 75 mM KCl, 10mM fosforan potasu, 0.1 mM EDTA]

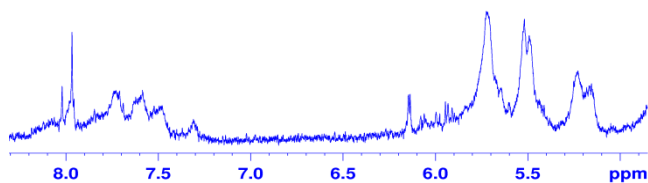
Niestety, liczba sygnałów pojawiających się w widmie 1H NMR oraz ich silne poszerzenie dowodziło o współistnieniu różnych struktur, w tym struktury wyższych rzędów jak i w niewielkim stopniu formy spinki/dupleksu. Próbując znaleźć warunki, w których linie rezonansowe byłyby wąskie i dobrze rozdzielone zauważyłam, iż w zależności od sposobu topnienia próbki zmienia się równowaga

konformacyjna pomiędzy formą spinki/dupleksu a kwadrupleksu (rys. 214 A, B). Natychmiastowe umieszczenie próbki, po jej stopieniu, w temperaturze 4°C prowadziło do powstania głównie formy spinki/dupleksu (rys. 214 B), natomiast jej powolne chłodzenie prowadziło do powstania w przewadze formy kwadrupleksu (rys. 214 A).



Rys. 214. Zależność widm ^1H NMR od sposobu topnienia próbki G-CGGCGGGCGGGCGG-C (~ 0.45 mM) w obecności buforu potasowego: 75 mM KCl, 10mM fosforan potasu, 0.1 mM EDTA

Cząsteczka G(CGG)₄C/G(CCG)₄C migrowała w żelu bardzo wolno, głównie w postaci jednego pasma. Jednak widmo ^1H NMR wykonane dla tej cząsteczki również pokazało współistnienie różnych form w roztworze, co uniemożliwiło dalszą analizę metodami NMR (rys. 215). Równowaga pomiędzy tymi formami nie zmieniała się w czasie.



Rys. 215. Widmo ^1H NMR dla cząsteczki G(CGG)₄C/G(CCG)₄C [150 mM NaCl, 10 mM fosforan sodu, 0.1 mM EDTA]

IV. Podsumowanie

G-C^{Br}GGCGG-C (1), G-CGGC^{Br}GG-C (2), G-C^{Me}GGCGG-C (3)

Z uwagi na niedopasowanie G:G występujące w cząsteczkach zbudowanych z powtórzeń CGG, takie cząsteczki są bardzo trudne do analizy metodami spektroskopii NMR. Dla uzyskania stabilnych par zasad G:G jedną z reszt guanozyny zastąpiłam jej analogiem posiadającym objętościowy podstawnik w pozycji C8. Otrzymałam cząsteczki RNA, które zawierały modyfikacje 8-bromoguanozynę oraz 8-metyloguanozynę. W przeciwieństwie do typowej dla formy A-RNA konformacji *anti*, reszty ^{Br}G i ^{Me}G przyjmują konformację *syn*. W widmach ¹H NMR zarejestrowanych w H₂O obserwowałam dwa sygnały od iminowych atomów wodoru, które wskazywały na tworzenie się par zasad ^{Br}G:G, G:^{Br}G lub ^{Me}G:G. Ponieważ na podstawie widm 2D NOESY wykluczyłam możliwość powstawania pary zasad typu *N1-karbonylo* (rys. 122 A), w której zaangażowane byłyby dwa iminowe atomy wodoru, najbardziej prawdopodobne było powstawanie pary zasad typu *N1-karbonylo, N7-amino* przedstawionej na rys. 122 B. Dla cząsteczki G-C^{Me}GGCGG-C sygnały korelacyjne w widmie 2D NOESY pomiędzy protonem iminowym reszty **G6**, a protonami grupy metylowej reszty **G3**, jednoznacznie potwierdziły powstawanie tej pary zasad. Ponieważ nawet w temperaturze pokojowej i wyższej obserwowałam w widmie NMR sygnał iminowego atomu wodoru **G3-NH1** (zaznaczony w kółku, rys. 129 B), to musiał on być zaangażowany w wiązanie wodorowe oraz niedostępny dla cząsteczek wody. Jedynym wytłumaczeniem tego zjawiska była możliwość asocjacji dwóch dupleksów, co prowadziłoby do powstania struktury czteroniciowej z pojedynczymi G-tetradami oraz mieszanymi tetradami G:C:G:C. Taki kwadrupleks byłby nietypowy, stosowałam więc różne metody takie jak spektroskopię CD, TDS, analizowałam krzywe topnienia przy różnych długościach fali, wykorzystywałam migrację w żelu poliakrylamidowym oraz spektrometrię mas aby potwierdzić jego powstawanie. Pomimo, iż w przypadku cząsteczki **1** i **3**, na podstawie widm 2D NOESY potwierdziłam tworzenie się mieszanych G1:C8:G1:C8 tetrad, to jednak nie obserwowałam większości sygnałów korelacyjnych charakterystycznych dla typowych kwadrupleksów. Ze względu na brak w strukturze powstających kwadrupleksów, co najmniej dwóch sąsiadujących G-tetrad cząsteczki te dawały widma UV typowe dla dupleksów. Niezależny w stosunku do spektroskopii NMR dowód, iż cząsteczki **1** i **3** tworzą struktury czteroniciowe otrzymałam na podstawie widm masowych, stosując jonizację poprzez elektrorozpraszanie. Dodatkowo okazało się, że równowaga między formą dupleksu a kwadrupleksu zależała od wielu czynników takich jak: stężenie RNA, typ modyfikacji (^{Br}G, ^{Me}G), rodzaj kationu i jego stężenie czy też temperatura pomiaru. Finalnie, w oparciu o informacje uzyskane z analizy widm NMR zarejestrowanych dla cząsteczki G-C^{Me}GGCGG-C, zbudowałam model antyrównoległego kwadrupleksu pokazany na rysunku 146. Kwadrupleks ten zbudowany jest z ^{Me}G:G:^{Me}G:G tetrad przedzielonych dwiema mieszanymi G:C:G:C tetradami (rys. 129 B, C, 146).

Także cząsteczki RNA o sekwencjach G-C^{Br}GGCGG-C oraz G-CGGC^{Br}GG-C tworzą w roztworze antyrównoległe kwadrupleksy o takiej samej topologii jak cząsteczka G-C^{Me}GGCGG-C. W tetradach (^{Br/Me}G):G:(^{Br/Me}G):G obie modyfikowane reszty ^{Br}G lub ^{Me}G przyjmują konformację *syn*, a guanozyny występują w formie *anti*. Wszystkie te reszty tworzą wiązania wodorowe na sposób Hoogsteena. Mieszane tetrazy G:C:G:C utworzone z dwóch par Watsona-Cricka stabilizowane są siecią wiązań wodorowych, w które zaangażowana jest krawędź Hoogsteena reszt guanozyny oraz grupa aminowa reszt cytydyn.

G-C^{Me}GGCIG-C (4), G-C^{Br}GGCIG-C (5), G-CIGC^{Br}GG-C (6), pG-C^{Me}GGCGG-C (7), pG-C^{Br}GGCGG-C (8)

Zastąpienie w cząsteczkach **1-3** jednej reszty guanozyny inozyną wpływało na równowagę konformacyjną dupleks-kwadrupleks. Dla cząsteczek RNA zawierających resztę inozyny (**4-6**) w zależności od stężenia NaCl, na podstawie analizy szybkości migracji w żelu w warunkach niedenaturujących, stwierdziłam, iż cząsteczka GC^{Br}GGCIGC najłatwiej tworzyła kwadrupleks, niezależnie od warunków solnych, cząsteczka GC^{Me}GGCIGC formowała kwadrupleks tylko w obecności 150 mM NaCl, natomiast cząsteczka GCIGC^{Br}GGC migrowała wyłącznie jako dupleks. Natomiast dla stężeń RNA stosowanych do pomiarów NMR (~ 10⁻³ M) wszystkie te cząsteczki asocjowały do form czteroniciowych. Pomimo braku grupy aminowej w reszcie inozyny, obserwowałam tworzenie się stabilnych tetrad ^XG_{(syn):I:^XG_{(syn):I oraz I:^XG_{(syn):I:^XG_{(syn) (X = Br, Me) stabilizowanych sześcioma wiązaniami wodorowymi. Brak objętościowej grupy aminowej, osłaniającej iminowy atom wodoru reszty **I3** lub **I6**, prowadził do jego hydratacji oraz szybkiej wymiany z wodą. Analiza widm dwuwymiarowych wskazała na duże podobieństwo struktur kwadrupleksów tworzonych przez cząsteczkę G-C^{Me}GGCGG-C oraz G-C^{Me}GGCIG-C.}}}}

W przypadku cząsteczek pG-C^{Me}GGCGG-C oraz pG-C^{Br}GGCGG-C, wprowadzenie dodatkowej grupy fosforanowej wpływało na ich szybszą migracji w żelu, co jest związane najprawdopodobniej z obecnością dodatkowego ładunku. Grupa fosforanowa na końcu 5' zapobiega wtórnej asocjacji kwadrupleksów, natomiast nie wpływa na powstawanie struktury antyrównoległego kwadrupleksu. Dodatkowo widma NMR były łatwiejsze do analizy, gdyż sygnały były lepiej rozseparowane.

CGGCGG-C (10), CGGCGG-CG (11), G-CGGCGG-C (12)

Cząsteczki CGGCGG-C, CGGCGG-CG oraz G-CGGCGG-C nie zawierają modyfikowanych reszt oraz różnią się między sobą położeniem (koniec 5' i/lub 3'), liczbą jak i typem reszt nukleotydowych otaczających dwa powtórzenia CGG. Wykorzystując profile topnienia przy 295 nm oraz widma różnicowe TDS ustaliłam, iż wszystkie te cząsteczki w środowisku zawierającym kationy potasu wykazują tendencję do tworzenia kwadrupleksów. Na podstawie analizy widm ¹H NMR

w rejonie iminowym wykazałam, iż tylko cząsteczka G-CGGCGG-C, której sekwencja od strony 5' rozpoczyna się od reszty guanozyny, tworzy dominującą formę kwadrupleksu w obecności kationów K^+ . Jednak jak się okazało, cząsteczka ta tworzy również struktury wyższych rzędów. Wskazywało na to silne poszerzenie sygnałów w widmach 1H NMR, zarejestrowanych w D_2O . Właśnie ze względu na obserwowane w tych warunkach szerokie i mało intensywne sygnały nie udało mi się przypisać kluczowych sygnałów, a tym samym nie mogłam określić topologii tworzącego się kwadrupleksu. Próbowałam znaleźć inne warunki, w których cząsteczka ta tworzyłaby kwadrupleks a jednocześnie nie obserwowałabym np. struktur wyższego rzędu. W widmach CD cząsteczki G-CGGCGG-C, zarówno położenia jak i intensywność pasm, silnie zależały od stężenia i typu soli. Widmo CD, które było najbardziej zbliżone do widma zarejestrowanego w obecności kationów potasu obserwowałam dla 150 mM NaCl. Także w żelu w warunkach niedenaturujących, przy ~ 300 mM stężeniu kationów sodu, obserwowałam pojawienie się prążka, odpowiadającego formie kwadrupleksu (obserwowanego w obecności kationów potasu). Jak pokazała analiza widm 1H NMR w obecności 150 mM NaCl, ustalała się równowaga pomiędzy strukturą dupleksu i kwadrupleksu. Wraz ze wzrostem stężenia RNA, obserwowałam pojawianie się sygnałów od formy kwadrupleksu i zanik tych charakterystycznych dla dupleksu. Niezależnie od rodzaju kationu jednowartościowego, Na^+ czy K^+ , w rejonie iminowym widma 1H NMR obserwowałam pięć sygnałów od formy kwadrupleksu. Na podstawie szczegółowej analizy sygnałów korelacyjnych, w widmie 2D NOESY zarejestrowanym w H_2O , zwłaszcza w rejonie występowania sygnałów od iminowych i aminowych atomów wodoru ustaliłam, iż w obecności kationów Na^+ powstaje kwadrupleks $(G-CGGCGG-C)_4$ zbudowany z dwóch G-tetrad, G3:G6:G3:G6 i G4:G7:G4:G7, oraz mieszanych tetrad G:C:G:C (rys. 195). Dodatkowo obecność silnych sygnałów korelacyjnych, **G1:H8-G6:H1'** i **G1:H8-G6:H8**, w widmach 2D NOESY jednoznacznie potwierdziła dimeryzację dwóch podjednostek kwadrupleksów. Na podstawie uzyskanych przeze mnie danych eksperymentalnych uważam, że w środowisku kationów K^+ powstaje kwadrupleks o takiej samej topologii.

Cząsteczkowość kwadrupleksu $(G-CGGCGG-C)_4$ potwierdziłam także niezależnie na podstawie widma masowego, stosując ~ 70 μM stężenie próbki. W warunkach pomiaru (jonizacja poprzez elektrorozpraszanie) czteroniciowy kwadrupleks wiązał dwa kationy NH_4^+ . Jednak, jak wynikało z porównania profili migracji cząsteczki G-CGGCGG-C w żelach natywnych, obecność kationów amonowych nie sprzyjała powstawaniu struktury kwadrupleksu.

pG-CGGCGG-C (13)

Podczas gdy dodatkowa reszta fosforanowa na końcu 5' zapobiegała powstawaniu struktur wyższego rzędu w przypadku cząsteczki zawierającej resztę 8-metyloguanozyny, to dodanie grupy fosforanowej do cząsteczki G-CGGCGG-C (**pG-CGGCGG-C**) uniemożliwiało tworzenie kwadrupleksu. Niezależnie od typu użytego kationu obserwowałam powstawanie dupleksu.

W zależności od stężenia RNA i temperatury obserwowałam różną równowagę pomiędzy parami zasad $G_{(syn)}:G_{(anti)}$ a $G_{(anti)}:G_{(syn)}$.

G-CGGCGGCGGCGG-C (15)

W obecności kationów Na^+ cząsteczka $G(CGG)_4C$, nie tworzyła jednej konformacji i migrowała w żelu natywnym w postaci dwóch pasm. Szybkość migracji jednego z nich była porównywalna do dupleksu, natomiast drugie pasmo migrowało znacznie wolniej i odpowiadało najprawdopodobniej formie czteroniciowej. Jednak jak pokazały widma 1H NMR, w obecności kationu Na^+ cząsteczka **15** zbudowana z 4 powtórzeń CGG, tworzyła głównie dupleks lub spinkę. Natomiast w buforze zawierającym kationy K^+ powstaje kwadrupleks, co potwierdziłam na podstawie analizy widm UV i 1H NMR. Zależnie od sposobu topnienia próbki zmieniała się równowaga pomiędzy formą kwadrupleksu a dupleksu/spinki. Umieszczenie próbki po grzaniu przez 5 minut w $90^\circ C$ bezpośrednio w lodzie prowadziło do powstania w przewodzie spinki/dupleksu, natomiast jej wolniejsze schładzanie sprzyjało tworzeniu kwadrupleksu.

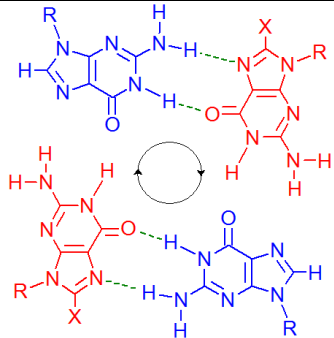
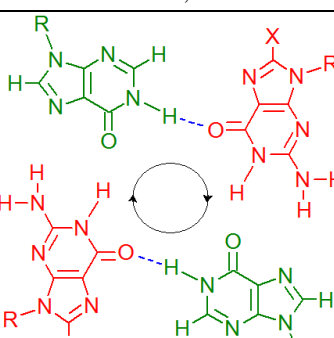
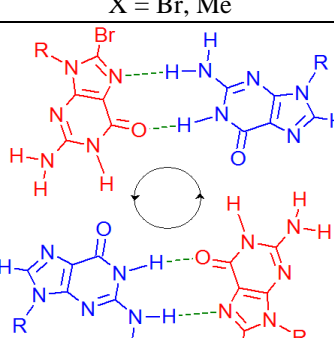
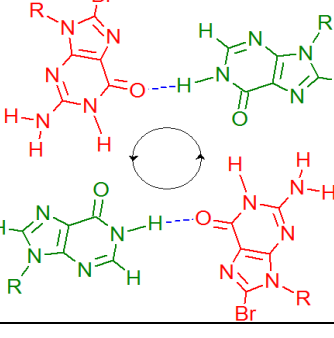
$G(CGG)_n C / G(CCG)_n C$ (n=2,3,4)

Wraz ze wzrostem ilości powtórzeń cząsteczki otrzymane przez równomolowe zmieszanie dwóch komplementarnych nici $G(CGG)_n C$ i $G(CCG)_n C$ (n=2,3,4), migrowały w żelach natywnych coraz wolniej. Jest to najprawdopodobniej spowodowane zwiększoną tendencją dłuższych cząsteczek do tworzenia struktur czteroniciowych zbudowanych wyłącznie z tetrad G:C:G:C. Nie udało mi się jednak tego jednoznacznie potwierdzić przy pomocy metod stosowanych w pracy.

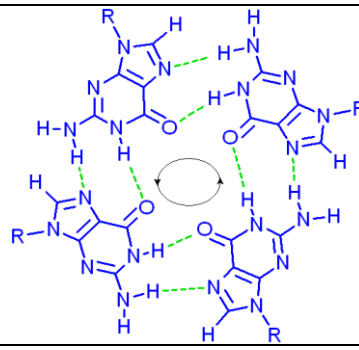
Budowa G-tetrad w kwadrupleksach

Wszystkie cząsteczki (**1-8**) zawierające modyfikowane reszty: ^{Br}G , ^{Me}G , I oraz pG tworzą dupleksy, które mogą asocjować tworząc struktury czteroniciowych kwadrupleksów. Kluczowa dla asocjacji takich dupleksów do antyrównoległych kwadrupleksów jest preorganizacja niekanonicznej pary zasad G:G. Dupleksy, w których jedna z reszt guanozyny w parze G:G występuje w konformacji *syn*, mogą asocjować do nietypowych kwadrupleksów zawierających pojedyncze G-tetrazy, bez konieczności reorganizacji związanych już wiązań wodorowych. Każdy taki antyrównoległy kwadrupleks zawiera dwie G-tetrazy różniące się kierunkowością wiązań wodorowych (tab. 24). Z kolei kwadrupleks $(G-CGGCGG-C)_4$, który nie zawiera modyfikowanych reszt nukleotydowych, tworzy się z jednakowo zbudowanych G-tetrad, w których wszystkie reszty guanozyny występują w konformacji *anti* (tab. 24). Wszystkie przedstawione w tabeli 24 cząsteczki oprócz G-tetrad zawierają jeden typ mieszanych tetrad G:C:G:C.

Tabela. 24. Budowa tetrad występujących w badanych przeze mnie kwadruplexach

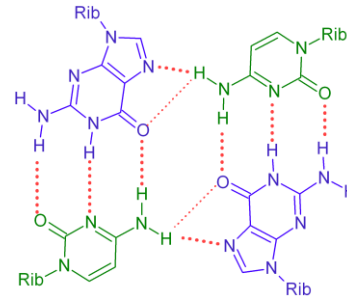
sekwencja	para zasad (3:6) w duplekcie	typ tetrady (3:6:3:6)	tetrada (3:6:3:6)	kierunkowość
G-C ^{Me} GGCGG-C pG-C ^{Me} GGCGG-C G-C ^{Br} GGCGG-C pG-C ^{Br} GGCGG-C	^{Me} G3:G6 ^{Br} G3:G6	G3(<i>syn</i>):G6(<i>anti</i>):G3(<i>syn</i>):G6(<i>anti</i>)		kierunkowość zgodna z ruchem wskazówek zegara
X = Br, Me				
G-C ^{Me} GGCIG-C G-C ^{Br} GGCIG-C	^{Me} G3:I6 ^{Br} G3:I6	G3(<i>syn</i>):I6(<i>anti</i>):G3(<i>syn</i>):I6(<i>anti</i>)		kierunkowość zgodna z ruchem wskazówek zegara
X = Br, Me				
G-CGGC ^{Br} GG-C	G3: ^{Br} G6	G3(<i>anti</i>):G6(<i>syn</i>):G3(<i>anti</i>):G6(<i>syn</i>)		kierunkowość przeciwna do ruchu wskazówek zegara
G-CIGC ^{Br} GG-C	I3: ^{Br} G6	I3(<i>anti</i>):G6(<i>syn</i>):I3(<i>anti</i>):G6(<i>syn</i>)		kierunkowość przeciwna do ruchu wskazówek zegara

G-CGGCGG-C G3:G6 G3(*anti*):G6(*anti*):G3(*anti*):G6(*anti*)
G4(*anti*):G7(*anti*):G4(*anti*):G7(*anti*)



kierunkowość
przeciwna do
ruchu wskazówek
zegara

cząsteczki **1-8** G:C G:C:G:C
cząsteczka **12**

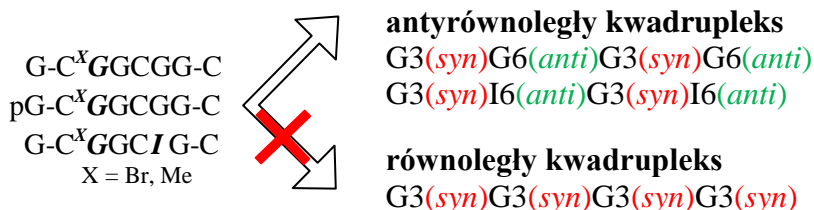


V. DYSKUSJA

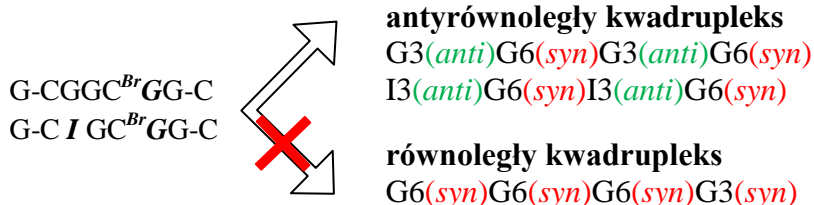
Na podstawie danych eksperymentalnych otrzymanych ze spektroskopii NMR, popartych wynikami z innych metod, zaproponowałam powstawanie pięciu typów struktur w zależności od sekwencji:

Grupa 1. antyrównoległe kwadrupleksy

(G-C^{Me}GGCGG-C, G-C^{Br}GGCGG-C, G-C^{Me}GGCIG-C, G-C^{Br}GGCIG-C, pG-C^{Me}GGCGG-C, pG-C^{Br}GGCGG-C)



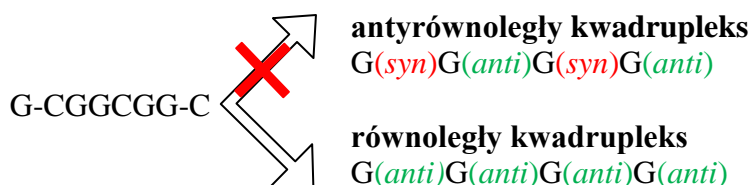
(G-CGGC^{Br}GG-C, G-CIGC^{Br}GG-C)



Antyrównoległe kwadrupleksy zawierają G-tetrazy o naprzemiennej konformacji *syn/anti*. Konformacja *syn* jest wymuszona poprzez wprowadzenie objętościowego podstawnika lub grupy w pozycję C8 guanozyny. W tej grupie modyfikowanych chemicznie cząsteczek nie obserwowałam powstania równoległych kwadrupleksów (czerwony krzyżyk), ponieważ musiałyby się to wiązać z powstaniem mniej trwałych G-tetrad, w których cztery reszty 8-bromo-, lub 8-metyloguanozyny występowałyby w konformacji *syn*.

Grupa 2. równoległe kwadrupleksy

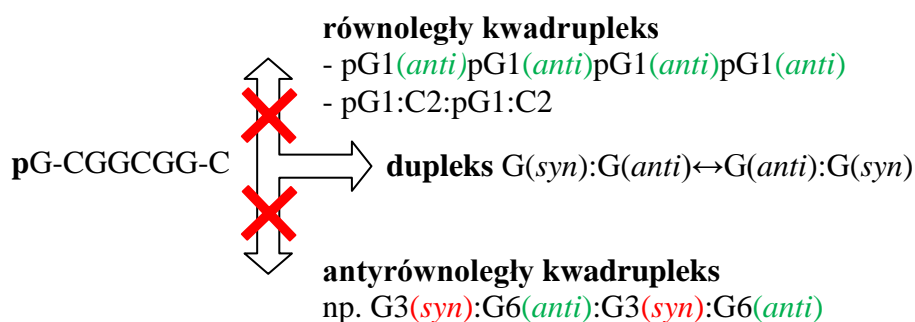
(CGGCGG-C, CGGCGG-CG, G-CGGCGG-C, G-CGGCGGCGGCGG-C)



Nimodyfikowane reszty guanozyny wykazują silną tendencję do przyjmowania konformacji *anti*. Cząsteczki należące do tej grupy nie tworzą antyrównoległych kwadrupleksów ponieważ niektóre z reszt guanozyny musiałyby przyjąć konformację *syn*.

Grupa 3. dupleks

(pG-CGGCGG-C)



Preferowaną konformacją cząsteczki pG-CGGCGG-C jest dupleks z dwiema niekanonicznymi parami zasad G:G. Powstawanie równoległego kwadrupleksu wiązałoby się ze zbliżeniem ujemnych ładunków zgromadzonych na dodatkowych grupach fosforanowych. Obecność tej grupy uniemożliwia także powstawanie kwadrupleksu (o strukturze jak dla cząsteczki G-CGGCGG-C). Cząsteczka pG-CGGCGG-C nie wykazuje tendencji do tworzenia antyrównoległego kwadrupleksu, ponieważ wiązałoby się to z powstaniem mieszanych tetrad G3(*syn*):G6(*anti*):G3(*syn*):G6(*anti*), w których dwie reszty guanozyny musiałyby przyjąć niekorzystną termodynamicznie konformację *syn*.

Grupa 4. nieznane struktury

Do grupy tej należą cząsteczki o sekwencjach G-C^LGGCGG-C, G-CGGCGGCGG-C, G(CGG)₂C/G(CCG)₂C, G(CGG)₃C/G(CCG)₃C oraz G(CGG)₄C/G(CCG)₄C.

Grupa 5. spinki

Wszystkie badane przeze mnie cząsteczki, zbudowane z powtórzeń CCG, tworzą struktury typu spinek (G-CCGCCG-C, G-CCGCCGCCG-C, G-CCGCCGCCGCCG-C).

W trakcie realizacji doktoratu otrzymałam wiele nieoczekiwanych rezultatów, dla wyjaśnienia których zastosowałam szeroki wachlarz metod badawczych takie jak spektroskopię UV, spektroskopię 1D i 2D NMR, metody elektroforetyczne czy spektrometrię mas.

Spektroskopia UV

Metody UV jak profil topnienia przy długości fali 295 nm czy widma TDS są szeroko wykorzystywane w badaniach kwadrupleksów, ponieważ przy ich pomocy w bardzo krótkim czasie można potwierdzić tworzenie się G-tetrad. Do uzyskania takich widm wystarczają niewielkie ilości materiału, a interpretacja wyników jest stosunkowo nieskomplikowana i szybka. Metody te nie są uniwersalne, gdyż przy ich użyciu można potwierdzić powstawanie tylko kwadrupleksów zbudowanych z co najmniej dwóch sąsiadujących G-tetrad. Dlatego też w przypadku badanych przeze

mnie cząsteczek z grupy 1 nie obserwowałam żadnego efektu przy długości fali 295 nm. Jednak rejestrując dużo takich widm, w różnych warunkach i dla szeregu związków z grupy 1, zaobserwowałam pewne zależności, które można skorelować ze zdolnością tych cząsteczek do tworzenia antyrównoległych kwadrupleksów. Na przykład w widmach TDS dla kwadrupleksów należących do grupy 1, intensywność pasma przy ~ 245 nm była najniższa dla cząsteczek, które najłatwiej tworzyły kwadrupleksy. Otrzymana na podstawie widm TDS zdolność asocjacji dupleksów do kwadrupleksów wygląda następująco: $\text{pG-C}^{Me}\text{GGCGG-C} > \text{G-C}^{Br}\text{GGCGG-C} > \text{G-C}^{Me}\text{GGCGG-C} > (\text{G-C}^{Br}\text{GGCIG-C}, \text{G-CIGC}^{Br}\text{GG-C}, \text{G-C}^{Me}\text{GGCIG-C})$. Przedstawiony szereg jest zgodny z wnioskami uzyskanymi z pozostałych metod. Widma TDS wraz z analizą krzywych topnienia przy 295 nm doskonale sprawdzają się na wstępnym etapie badań zdolności cząsteczek pozbawionych modyfikacji (grupa 2), do tworzenia kwadrupleksów. Przy pomocy widm UV szybko mogłam sprawdzić, jak typ kationu wpływał na powstawanie struktur kwadrupleksów.

Główną zaletą widm CD, oprócz uzyskania szybkiego rezultatu, jest możliwość rozróżnienia kwadrupleksu antyrównoległego od równoległego, jak także możliwość śledzenia przejść pomiędzy tymi topologiami, w zależności od takich czynników zewnętrznych jak temperatura czy dodatek związków niskocząsteczkowych. Metoda ta, podobnie jak poprzednio nie mogła być wykorzystana do potwierdzenia powstawania kwadrupleksów z grupy 1, gdyż widma tych nietypowych struktur nie różniły się od widm dupleksów. Widmo CD cząsteczki G-CGGCGG-C, w obecności kationów K^+ , również nie potwierdzało jednoznacznie tworzenia się kwadrupleksu, pomimo obecności dwóch sąsiadujących G-tetrad. Tym co odróżniało je od typowego widma dupleksu oraz od pozostałych widm tej cząsteczki, zarejestrowanych w obecności innych kationów, było ujemne pasmo o niewielkiej intensywności przy ~ 210 nm. Istnieją prawdopodobnie dwa powody, dla których na podstawie widm CD nie udało mi się potwierdzić, iż cząsteczka G-CGGCGG-C tworzy kwadrupleks w obecności kationów K^+ . Po pierwsze, struktura kwadrupleksu pokazana na rys. 195 A jest nietypowa, gdyż oprócz G-tetrad o równoległym ułożeniu nici zawiera także mieszane tetrazy G:C:G:C, o antyrównoległym ułożeniu nici typu góra-dół-góra-dół. Obecność w kwadrupleksie fragmentu zbudowanego z dwóch antyrównoległych tetrad G:C:G:C może generować w widmie CD ujemne pasmo przy ok. 210 nm, które jest typowe dla dupleksu. Niewykluczone także, iż w warunkach pomiaru widm CD (0.1 mM RNA) ustala się równowaga pomiędzy dupleksem i kwadrupleksem. Widma CD tych form różnią się tylko pasmem przy ~ 210 nm - dla kwadrupleksu jest ono dodatnie, a dla dupleksu ujemne. W przypadku mieszaniny dwóch form, z przewagą dupleksu, w widmie CD pasmo to będzie nadal ujemne, ale o mniejszej intensywności.

Przy pomocy widm CD nie potrafiłam rozstrzygnąć, czy dupleksy utworzone z komplementarnych nici $\text{G}(\text{CGG})_n\text{C}$ i $\text{G}(\text{CCG})_n\text{C}$ ($n=2,3,4$) asocjują do kwadrupleksów zbudowanych

jedynie z tetrad G:C:G:C. Widmo CD takiego kwadrupleksu wyglądałoby prawdopodobnie jak widmo dupleksu.

Pomimo trudności w wykorzystaniu widm CD do potwierdzenia tworzenia się kwadrupleksów, stanowiły one doskonałe narzędzie do monitorowania zmian konformacji, w zależności od stężenia RNA i soli, zarówno dla cząsteczek zawierających modyfikowane chemicznie reszty jak i dla cząsteczek niemodyfikowanych.

Termodynamika

Dupleksy, które najłatwiej asocjowały do antyrównoległych kwadrupleksów okazały się być także najtrwalsze. Największy wpływ stabilizacyjny jest obserwowany w przypadku, gdy modyfikowanym nukleotydem jest reszta ^{Br}G, następnie ^{Me}G. Wprowadzenie reszty inozyny, jako drugiej modyfikacji, do cząsteczek oktamerów, wpływa destabilizująco na ich trwałość. Z kolei wzrost stężenia soli zwiększa trwałość kwadrupleksów niezależnie od sekwencji zasad.

Profil migracji cząsteczek RNA w żelu poliakrylamidowym, w warunkach niedenaturujących

Dla cząsteczek G-C^{Br}GGCGG-C oraz G-C^{Me}GGCGG-C oprócz głównego prążka, w żelu w warunkach niedenaturujących obserwowałam także mniej intensywny, szybciej migrujący prążek, który mógł odpowiadać formie dupleksu. Była to jedyna metoda, która pokazała niejednorodność tworzonych przez te cząsteczki struktur. Z kolei cząsteczki, które zawierały modyfikowane reszty ^{Br}G w pozycji 6 oligomeru (**2**, **6**), migrowały z szybkością typową dla dupleksu, co mogło oznaczać, iż dla stężenia RNA stosowanego w tej metodzie, cząsteczki te tworzyły po prostu dupleks. W zakresie stężeń RNA stosowanych w tej metodzie, obecność reszty inozyny utrudniała tworzenie kwadrupleksu w przypadku cząsteczki G-C^{Me}GGCIG-C. Z kolei badania wpływu stężenia RNA na równowagi konformacyjne cząsteczek G-C^{Br}GGCGG-C i G-C^{Me}GGCGG-C z zastosowaniem znakowania radioaktywnym izotopem ³²P dały niejednoznaczne wyniki. Jak okazało się, obecność dodatkowej, obdarzonej ładunkiem ujemnym grupy fosforanowej wpływała na szybkość migracji oligomerów oraz na istniejące równowagi konformacyjne.

Pomimo, iż cząsteczki G(CGG)_nC (n=2,3,4) wykazują podobną stabilność termodynamiczną, to w zależności od liczby powtórzeń, ich profil migracji w żelu różni się znacznie. Cząsteczka G-CGGCGG-C, w obecności kationów Na⁺, migruje w postaci dwóch prążków o zbliżonej intensywności i szybkości migracji. Szybciej migrujące pasmo odpowiadało najprawdopodobniej formie czteroniciowej, a migrujące nieco wolniej formie dupleksu. Było dość zaskakujące, iż cząsteczka (G-CGGCGG-C)₄ migrowała szybciej niż dupleks (G-CGGCGG-C)₂ oraz znacznie szybciej niż kwadrupleksy (G-C^{Br}GGCGG-C)₄ i (G-C^{Me}GGCGG-C)₄. Kwadrupleks mógł migrować szybciej od dupleksu z uwagi na bardziej globularny kształt oraz większy ładunek ujemny wynikający

z obecności czterech nici. Z kolei kwadrupleksy $(G-C^{Br}GGCGG-C)_4$ i $(G-C^{Me}GGCGG-C)_4$ mają bardziej wydłużony kształt niż $(G-CGGCGG-C)_4$ oraz różnią się powierzchnią, co może wpływać na ich odmienną szybkość migracji. Profil migracji w żelu dostarczył także ważnych informacji o budowie cząsteczek utworzonych z większej liczby powtórzeń CGG. W warunkach elektroforezy cząsteczka $G(CGG)_4C$, podobnie jak $G(CGG)_2C$, tworzyła dwie formy. Prążek odpowiadający jednej z nich migrował bardzo wolno, co sugerowało, tworzenie się międzycząsteczkowego kwadrupleksu lub struktury wyższego rzędu. Z kolei cząsteczki otrzymane przez równomolowe połączenie nici $G(CCG)_nC$ i $G(CGG)_nC$ ($n=2,3,4$) były trudne do analizy. Jedynym dowodem świadczącym o tworzeniu przez te cząsteczki struktur czteroniciowych była ich bardzo wolna migracja w żelu.

Ze względu na różnorodność topologii kwadrupleksów oraz możliwość powstawania alternatywnych konformacji takich, jak forma spinki czy dupleksu, bardzo trudno jest wnioskować o strukturze tych cząsteczek jedynie na podstawie analizy profilu szybkości migracji w żelu, w warunkach niedenaturujących.

Spektroskopia NMR

- *Liczba powtórzeń CGG a widma NMR*

Ponieważ cząsteczki zbudowane z trójnukleotydowych powtórzeń $r(CGG)$ wykazują silną tendencję do tworzenia różnorodnych struktur (spinka dupleks, dupleks z wystającymi jednoniciowymi końcami, kwadrupleks, struktury wyższych rzędów) metodami spektroskopii NMR nie można badać większych takich cząsteczek, z powodu poszerzenia sygnałów rezonansowych obserwowanych wraz ze wzrostem liczby powtórzeń. Widmo NMR zawiera sygnały, będące uśrednieniem konformacyjnym tych struktur. Dlatego pomimo szybkiego rozwoju metod spektroskopii NMR, struktury cząsteczek RNA zawierających kilka powtórzeń CGG są trudne do analizy.

- *Stężenie RNA*

Stężenia RNA stosowane do pomiaru metodami UV, rzędu 50 nM - 100 μM, są znacznie niższe niż stosowane w badaniach NMR (~1 mM lub wyższe). W warunkach rejestracji widm UV oraz NMR mogą powstawać odmienne formy, ponieważ stężenie RNA jest czynnikiem, który wpływa na typ powstającej struktury (spinka/dupleks/kwadrupleks), a także może decydować o topologii powstającego kwadrupleksu. W przypadku badanych przez mnie cząsteczek **1-8** oraz **12**, wzrost stężenia RNA faworyzował asocjację dupleksów do form czteroniciowych.

- *Potwierdzenie powstawania kwadrupleksu*

Sygnały pochodzące od iminowych atomów wodoru zaangażowanych w tworzenie G-tetrad występują przy charakterystycznej wartości przesunięć chemicznych i na ich podstawie w prosty i szybki sposób można potwierdzić powstawanie kwadrupleksu. Widma 1H NMR okazały się doskonałym narzędziem

do monitorowania wpływu zmian warunków środowiska oraz zmian w sekwencji na konformację cząsteczek zbudowanych z powtórzeń r(CG₂G).

- ***Ustalenie budowy kwadrupleksów***

Główną zaletą badań kwadrupleksów za pomocą spektroskopii NMR jest możliwość uzyskania szczegółowych informacji o ich budowie. Metoda ta pozwala nie tylko odróżnić kwadrupleks równoległy od antyrównoległego, ale także umożliwia ustalenie orientacji poszczególnych nici. Dostarcza też informacji, które reszty guanozyny są zaangażowane w tworzenie G-tetrad, a które tworzą łączące je pętle. Jednakże koniecznym wymogiem takich badań jest utworzenie tylko jednej, stabilnej formy, co dla sekwencji bogatych w reszty guanozyny zdarza się rzadko. Obecność licznych konformerów mocno ogranicza ilość dostępnych informacji strukturalnych. Często jedynym skutecznym rozwiązaniem jest stosowanie dodatkowych sekwencji flankujących lub wprowadzenia modyfikowanych chemicznie reszt nukleotydowych. Powszechną praktyką jest także sprawdzanie wielu dziesiątek różnych sekwencji różniących się niewiele w stosunku do sekwencji typu dzikiego tak długo, aż uzyska się w roztworze pojedynczą formę. Jednakże podejście takie nie jest pozbawione wad np. obecność modyfikowanych lub dodatkowych reszt może wpływać na strukturę powstającego kwadrupleksu. W widmach NMR przypisanie sygnałów pochodzących od kwadrupleksu jest trudniejsze niż dla innych motywów strukturalnych, jak np. dupleksu. Ze względu na różnorodność topologii oraz niezwykle skomplikowane, rzadkie motywy strukturalne często unikalne dla danej sekwencji, ustalenie budowy kwadrupleksów jest dużym wyzwaniem i wymaga dużej wiedzy eksperymentatora. Metody UV w bardzo krótkim czasie pozwalają potwierdzić powstawanie kwadrupleksu, jednak poznanie jego budowy przy pomocy krystalografii lub NMR wymaga sporego nakładu czasu.

Do tej pory metody NMR były sporadycznie stosowane do badania struktur utworzonych z powtórzeń r(CG₂G) (194). Jedno z głównych osiągnięć mojej pracy polega na wykorzystaniu tej techniki do potwierdzenia, iż cząsteczki zbudowane z powtórzeń r(CG₂G) mogą tworzyć kwadrupleksy oraz ukazania ich budowy. Najtrudniejsze do analizy okazały się kwadrupleksy sklasyfikowane w grupie 1, ponieważ w roztworze obserwuje się szybką w skali czasu NMR wymianę pomiędzy formą dupleksu i kwadrupleksu. Prawdopodobnie dlatego też nie obserwowałam w widmach NMR wszystkich sygnałów korelacyjnych, typowych dla G-tetrad i mieszanych tetrad G:C:G:C. Dla kwadrupleksów z grupy 1, zauważyłam, że diamagnetyczne przesunięcie sygnałów aromatycznych atomów wodoru odzwierciedlało przesunięcie równowagi dupleks-kwadrupleks w kierunku formy czteroniciowej.

Na podstawie widm ¹H NMR ustaliłam, że cechą charakterystyczną kwadrupleksów z grupy 2 jest ścisła zależność ich struktury od stężenia RNA oraz od typu i stężenia jednowartościowego kationu. Dla mniejszych stężeń RNA dla cząsteczek z grupy 2, w obecności kationów Na⁺ dominowała

forma dupleksu, natomiast kationy K^+ silnie promowały powstawanie kwadrupleksów. Jednak wraz ze wzrostem stężenia RNA zanikała forma dupleksu i zaczynał dominować kwadrupleks. Pomimo występowania typowych dla G-tetrad sygnałów korelacyjnych, ustalenie budowy kwadrupleksu $(G-CGGCGG-C)_4$ było trudne, gdyż jego topologia jest bardzo nietypowa. Na podstawie analizy widm 2D NOESY zidentyfikowałam, reszty guanozyny zaangażowane w tworzenie G-tetrad, mieszanych tetrad G:C:G:C oraz zbudowałam model tego kwadrupleksu. Cząsteczki CGGCGG-C, CGGCGG-CG oraz $G(CGG)_4C$, w obecności kationów K^+ , tworzą mieszaninę różnych form, a widma tych cząsteczek nie pozwalały na wyznaczenie ich struktury. Tylko dla kwadrupleksu utworzonego z cząsteczki $G(CGG)_4C$ udało się zaproponować pewne elementy jego budowy. Podobieństwo widm 1H NMR cząsteczek $G(CGG)_4C$ i $G(CGG)_2C$ sugerowało, iż cząsteczka zbudowana z czterech powtórzeń CGG, w obecności kationów K^+ również ulegała dimeryzacji tworząc zazębiający się kwadrupleks.

Cząsteczki $G(CCG)_nC/G(CGG)_nC$ ($n=2,3,4$), otrzymane przez równomolowe połączenie dwóch nici o komplementarnych sekwencjach, wykazują tendencję do tworzenia kwadrupleksów zbudowanych jedynie z mieszanych tetrad G:C:G:C, jednak nie udało mi się tego potwierdzić metodami spektroskopii NMR.

Spektrometria mas

Widma masowe potwierdzają niezależne od innych metod, iż cząsteczki **1** i **3** asocjują do form czteroniciowych. Oprócz danych z analizy widm NMR, jest to najważniejszy dowód na czteroniciową budowę cząsteczek $(G-C^{Me}GGCGG-C)_4$ i $(G-C^{Br}GGCGG-C)_4$. Spektrometria mas jest najprostszą metodą, która pozwala ustalić stechiometrię kwadrupleksów. Ma to szczególne znaczenie w przypadku dłuższych cząsteczek, które mogą tworzyć zarówno wewnątrzcząsteczkowe jak i międzycząsteczkowe kwadrupleksy.

W tabeli 25 przedstawiłam krótkie podsumowanie, na temat informacji o kwadrupleksach, które mogą być otrzymane z poszczególnych metod eksperymentalnych.

Tabela. 25. Informacje o kwadrupleksach, które mogą być otrzymane z poszczególnych metod

metoda badań	utworzenie kwadrupleksu	topologia kwadrupleksu	cząsteczkowość kwadrupleksu	równowaga konformacyjna	struktura kwadrupleksu
profil topnienia przy 295 nm	+				
widma TDS	+				
widma CD	+	+		+	
profil migracji w żelu	+		+	+	
widma NMR	+	+	+	+	+
widma MS	+		+	+	

Nietypowe sygnały i przesunięcia chemiczne dla kwadrupleksów z grupy 1

W widmach NMR cząsteczek **1-3** charakterystyczne jest silne przesunięcie w kierunku niższych wartości ppm sygnałów reszt guanozyny, sąsiadujących z resztą w konformacji *syn* od strony 3'. Charakterystyczne jest także przesunięcie chemiczne sygnału protonu H5' reszt ^{Br}G**3** oraz ^{Me}G**3** o ~ 0.75 ppm w stosunku do pozostałych sygnałów H5' (rys. 114, 115 - rejon C5', sygnał w kółku).

W widmach 2D NOESY cząsteczki G-C^{Me}GGCGG-C, zarejestrowanych w D₂O, zidentyfikowałam kilka sygnałów niemożliwych dla struktury dupleksu. Odległości pomiędzy atomami wodoru przedstawionymi w tabeli 26, w stosunku do znanej struktury krystalograficznej dupleksu (G-C^{Br}GGCGG-C)₂ (1), są zdecydowanie zbyt duże, aby można było zaobserwować efekt NOE.

Tabela 26. Zestawienie nietypowych dla dupleksu sygnałów korelacyjnych obserwowanych w widmach cząsteczki G-C^{Me}GGCGG-C oraz odpowiadających tym kontaktom odległości w znanej strukturze dupleksu (G-C^{Br}GGCGG-C)₂ w kryształach

(G-C ^{Me} GGCGG-C) ₄ w roztworze obserwowane sygnały	(G-C ^{Br} GGCGG-C) ₂ w kryształach analogiczne sygnały, (PDB ID: 3R1E)
C8:H6-G1:H5''	C8:H6-G1:H5'' ~ 15.5 Å
C8:H6-G1:H4'	C8:H6-G1:H4' ~ 14.6 Å
G7:H1'- G3:CH ₃	G7:H1'- G3:Br ~ 4.1 Å
G3:H1'-G7:H4'	G3:H1'-G7:H4' ~ 9.7 Å
G7:H1'-C2:H2'	G7:H1'-C2:H2' ~ 9.6 Å
G7:H1'-G3:H5''	G7:H1'-G3:H5'' ~ 10.0 Å
G7:H1'-G3:H3'	G7:H1'-G3:H3' ~ 8.7 Å
G7:H2'- G3:CH ₃	G7:H2'- G3:Br ~ 5.6 Å
G6:H2'- G3:CH ₃	G6:H2'- G3:Br ~ 7.6 Å

Ustalenie atomów zaangażowanych w wiązania wodorowe w parze zasad G:G

Sygnały korelacyjne pomiędzy protonem iminowym reszty **G6**, a protonami grupy metylowej reszty **G3**, były kluczowe dla ustalenia zawiązującej się pary zasad ^{Me}G:G, dla cząsteczki o sekwencji G-C^{Me}GGCGG-C (rys. 128, po lewej). Dla wyznaczenia typu parowania w cząsteczce G-C^{Me}GGCIG-C kluczowe okazały się kontakty NOE od protonu H2 reszty inozyny do atomów wodoru grupy metylowej reszty **G3** (rys. 159 B). Obecność sygnału korelacyjnego pomiędzy protonem H2 reszty **I6** a grupą metylową reszty **G3** potwierdziła, iż para zasad ^{Me}G:I jest typu *N1-karbonylo*, *N7-amino*. W przypadku pary ^{Me}G3:G6 nie udało się zaobserwować sygnałów korelacyjnych pomiędzy atomami wodoru grupy aminowej reszty **G6** a atomami wodoru grupy metylowej.

Ze względu na brak sygnałów korelacyjnych dla pary ^{Br}G:G nie mogłam jednoznacznie ustalić czy również w tym przypadku zawiązuje się para zasad typu *N1-karbonylo*, *N7-amino*. Jednak widma jedno- i dwuwymiarowe potwierdziły, iż cząsteczki G-C^{Br}GGCGG-C oraz G-C^{Me}GGCGG-C tworzą bardzo zbliżone struktury. Na tej podstawie założyłam, iż w przypadku obu par zasad, ^{Br}G3:G6 oraz

^{Me}G3:G6, zawiązują się pary zasad typu *N1-karboxylo*, *N7-amino*. Zastąpienie jednej reszty guanozyny resztą inozyny nie ma wpływu na typ powstającej pary zasad.

Wpływ dodatkowej grupy fosforanowej na końcu 5' na strukturę kwadrupleksów

W przypadku kwadrupleksu (**pG-C^{Me}GGCGG-C**)₄ obecność grupy fosforanowej zapobiegała tworzeniu się struktur wyższych rzędów i prowadziła do powstania stabilniejszej struktury. Z kolei wprowadzenie grupy fosforanowej na końcu 5' do cząsteczki G-CGGCGG-C zapobiegało powstawaniu kwadrupleksu.

Wpływ preorganizacji pary zasad G:G na powstawanie antyrównoległych kwadrupleksów

Usztywnienie pary zasad G:G w konformacji G_(syn):G_(anti) lub G_(anti):G_(syn) było kluczowe dla asocjacji dupleksów do antyrównoległych kwadrupleksów. Spośród wszystkich badanych przeze mnie związków zawierających powtórzenia CGG jedynie cząsteczka **pG-CGGCGG-C**, niezależnie od stężenia RNA i typu jednowartościowego kationu tworzyła dupleks, w którym obserwowałam równowagę pomiędzy parami zasad G_(syn):G_(anti) a G_(anti):G_(syn).

Wpływ reszty guanozyny na końcu 5' na tworzone struktury

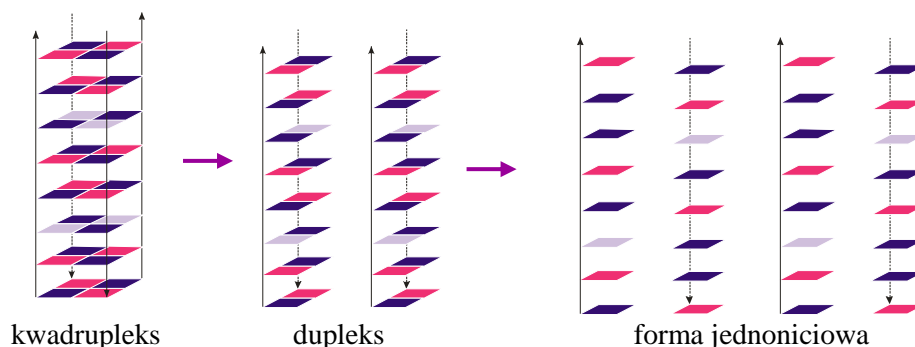
Pomimo, iż zazwyczaj obecność reszty guanozyny na końcu 5' prowadzi do powstawania struktur wyższych rzędów, to jej obecność okazała się być kluczowa dla utworzenia trwałego kwadrupleksu (G-CGGCGG-C)₄. W przypadku tej cząsteczki dwie reszty z końca 5', G1 i C2, były zaangażowane w tworzenie mieszanych tetrad G1:C2:G1:C2, które powstawały na skutek dimeryzacji dwóch podjednostek kwadrupleksów (rys. 195). Natomiast dla cząsteczek CGGCGG-C oraz CGGCGG-CG, pozbawionych reszty guanozyny na końcu 5', forma kwadrupleksu nie jest dominująca.

Polimorfizm strukturalny cząsteczek zbudowanych z powtórzeń CGG

Cząsteczki zbudowane z powtórzeń CGG, które nie zawierają żadnych modyfikacji chemicznych, wykazują tendencję do tworzenia zarówno dupleksów/spinek jak i równoległych kwadrupleksów. W porównywalnych warunkach stężenia RNA oraz soli, czynnikiem decydującym o przyjmowanej konformacji jest rodzaj jednowartościowego kationu. W środowisku zawierającym kationy K⁺ łatwo tworzą się kwadrupleksy natomiast dla przesunięcia równowagi dupleks - kwadrupleks w kierunku formy czteroniciowej, w obecności soli sodowej, wymagane jest większe stężenie RNA.

Trwałość sygnałów iminowych a topologia kwadrupleksów

W widmach cząsteczek **1** i **3**, zarejestrowanych w obniżonych temperaturach, obserwowałam dwa sygnały pochodzące od protonów iminowych w tetradach G3:G6:G3:G6. Wraz ze wzrostem temperatury sygnał od protonu iminowego reszty **G3** stopniowo zanikał oraz przesuwał się w kierunku niższych wartości ppm, natomiast drugi sygnał iminowy nie ulegał zmianie w szerokim zakresie temperatur. Na podstawie różnic w szybkości zaniku tych sygnałów można postulować, iż najpierw kwadrupleks rozpada się do dupleksu, a następnie powstaje forma jednoniciowa (rys. 216).



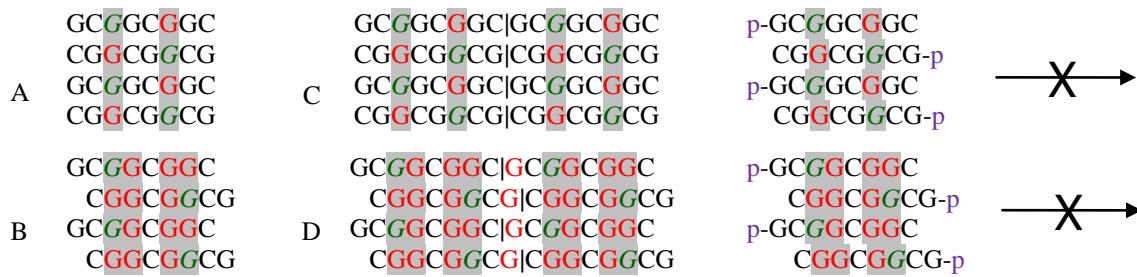
Rys. 216. Prawdopodobny schemat rozpadu antyrównoległego kwadrupleksu wraz ze wzrostem temperatury

W tetradach typu G:C:G:C wiązania wodorowe, które powstają w momencie asocjacji dwóch dupleksów są słabsze niż wiązania Watsona-Cricka w parze G:C i dlatego łatwiej ulegają zerwaniu. W przypadku antyrównoległego kwadrupleksu przedstawionego schematycznie na rys. 216 rozpad mieszanych tetrad wymusza jednoczesny rozpad G-tetrad. W zależności od typu kwadrupleksu schemat zaniku sygnałów iminowych może być odmienny. W kwadrupleksie (G-CGGCGG-C)₄ o topologii pokazanej na rys. 195 najpierw zanika sygnał od mieszanych tetrad G:C:G:C następnie równocześnie od czterech bardziej trwałych G-tetrad. Tak więc trwałość poszczególnych sygnałów iminowych powiązana jest z topologią kwadrupleksów oraz z typem tworzących je tetrad.

Tworzenie struktur wyższego rzędu

Niezależnie od sposobu przygotowania próbki, w widmach ¹H NMR cząsteczek, które zawierały resztę ^{Me}G lub ^{Br}G przy większym wzmocnieniu, było widać, iż sygnały rezonansowe nie schodzą do linii podstawowej. Te dodatkowe, bardzo szerokie sygnały były szczególnie widoczne w środowisku kationów K⁺. Obecność tych szerokich sygnałów jest dość typowa dla kwadrupleksów i jest wynikiem tworzenia się struktur wyższego rzędu, które powstają poprzez asocjację kwadrupleksów. Możliwe jest powstawanie również bardziej skomplikowanych struktur, w których nowe tetrazy zawiązują się z udziałem reszt pochodzących od różnych kwadrupleksów, niezaangażowanych w stabilizację poszczególnych podjednostek.

Najbardziej prawdopodobne mechanizmy prowadzące do powstania takich agregatów, dla cząsteczek zbudowanych z powtórzeń CGG, przedstawiłam na rys. 217.



Rys. 217. Potencjalny mechanizm powstawania struktur wyższego rzędu dla cząsteczek 1 i 3. Hipotetyczna struktura: dimeru kwadrupleksu (C), który powstał w wyniku oddziaływania warstwowego dwóch kwadrupleksów (A); dimeru kwadrupleksu (D), który powstał w wyniku asocjacji dwóch kwadrupleksów z lepкими końcami (B); (G - oznacza modyfikowaną resztę^{Me}G, ^{Br}G)

Taki dimer kwadrupleksu z lepкими końcami (rys. 217 D) może dalej łatwo asocjować, tworząc kwadrupleksy o jeszcze wyższych masach cząsteczkowych. Ponieważ powstający w ten sposób kwadrupleks jest zbudowany z sąsiadujących G-tetrad (rys. 217 D, kolor szary), powinien być bardzo trwały, zwłaszcza w obecności kationów potasu. Dlatego uważam, iż agregaty kwadrupleksów o różnej długości mogą stanowić główną formę uboczną w roztworze. W przypadku obu mechanizmów (rys. 217), wprowadzenie grupy fosforanowej na koniec 5' powinno zapobiegać wtórnej asocjacji kwadrupleksów. Zgodnie z oczekiwaniem w widmach cząsteczek pG-C^{Br}GGCGG-C oraz pG-C^{Me}GGCGG-C nie obserwowałam tych szerokich sygnałów.

Występowanie w genomie sekwencji, zdolnych do tworzenia kwadrupleksów

W genomie występuje ~ 376,000 sekwencji zawierających rejony powtórzeń guanozynowych przedzielonych fragmentami nieguanozynowymi, zdolnych do tworzenia kwadrupleksów (66). Występują one głównie w kluczowych biologicznie obszarach jak regiony promotorowe genów onkogennych czy końce chromosomów. Poznanie i zrozumienie natury kwadrupleksów jak również sposobu ich stabilizacji w komórce (np. BRACO-19) stwarza nadzieję na nowe formy leczenia przeciwnowotworowego. Także w regionie 5'-UTR mRNA może znajdować się ponad 3000 elementów mających tendencję do tworzenia kwadrupleksów RNA. Wśród powtórzeń trójnukleotydowych powtarzających się tandemowo, występujących w genomie, oprócz powtórzeń CGG (166;188;189;191), dowiedziono możliwość tworzenia się kwadrupleksów także dla powtórzeń (AGG)_n oraz (UGG)_n (152).

Mechanizm powstawania kwadrupleksów zbudowanych z powtórzeń CGG

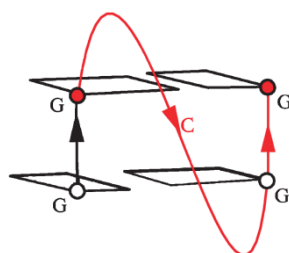
Nadal niewiele wiadomo o budowie i właściwościach kwadrupleksów DNA zbudowanych z powtórzeń CGG, a analogiczne struktury lub modele kwadrupleksów RNA w ogóle nie są znane. Dla cząsteczki DNA o sekwencji GCGGTTTGC GG już w 1995 roku Patel (141) zaproponował mechanizm formowania się kwadrupleksu poprzez dimeryzację dwóch spinek, co prowadziło do powstania G-tetrad i mieszanych tetrad typu G:C:G:C (rys. 218). Mechanizm ten nie może być uniwersalny dla typowych powtórzeń CGG, gdyż w sekwencji tej dwa motywy CGG są przedzielone

trójnukleotydom fragmentem TTT, co z pewnością wpływa na strukturę tego kwadrupleksu.



Rys. 218. Model kwadrupleksu zaproponowany przez Patela (141) dla cząsteczki GCGGTTTGCGG

Mechanizm ten nie może być odniesiony też do podobnych cząsteczek RNA. Przede wszystkim dlatego, że kwadrupleksy RNA preferują równoległe ułożenie nici, które jest determinowane silną tendencją rybonukleotydów do przyjmowania konformacji *anti* wokół wiązania *N*-glikozydowego. Na podstawie wyników moich badań zaproponowałam alternatywny mechanizm powstawania kwadrupleksów, dla cząsteczek RNA zbudowanych z powtórzeń CGG. Pokazałam, iż reszta cytydyny w sekwencji GGCGG jest zdolna do tworzenia pętli zewnętrznej (rys. 219). Taki motyw strukturalny może tworzyć zarówno kwadrupleks jednocząsteczkowy (dla cząsteczek zawierających co najmniej cztery powtórzenia CGG), jak i kwadrupleks dwucząsteczkowy (dla cząsteczek zawierających dwa powtórzenia CGG).



Rys. 219. Pętla zewnętrzna utworzona przez resztę cytydyny

Mechanizm ten został zaproponowany dla cząsteczki o naturalnej sekwencji, co sprawia, iż jest on bardziej uniwersalny i może być poprawny także dla innych cząsteczek RNA, zbudowanych z powtórzeń CGG. W DNA pojedyncze reszty pirymidyn łatwo tworzą pętle zewnętrzne, dlatego według tego mechanizmu być może mogą także powstawać kwadrupleksy DNA, bogate w powtórzenia CGG. Udowodniłam również, że w kwadrupleksach zbudowanych z powtórzeń r(CG) reszty cytydyny, oprócz pętli zewnętrznej, mogą też wchodzić w skład tetrad G:C:G:C.

Liczba powtórzeń CGG a struktura

Analizując dane literaturowe można dostrzec pewną zależność pomiędzy strukturą cząsteczek zbudowanych z powtórzeń CGG, a liczbą takich powtórzeń. Wyniki eksperymentów sugerowały, iż cząsteczki r(CG)₁₇ i r(CG)₂₀ tworzą strukturę spinki (próbki enzymatyczne, spektroskopia UV i CD) (152;192), natomiast cząsteczki zbudowane z ponad 90 powtórzeń r(CG) tworzą

W swojej pracy po raz pierwszy pokazałam jak są zbudowane kwadrupeksy RNA utworzone z powtórzeń CGG (rys. 221 B, D). Przedstawiłam także unikalne, nie opisane dotąd cechy widma UV zaobserwowane dla kwadrupeksów zawierających izolowane oraz modyfikowane chemicznie G-tetrazy (rys. 221 B). Choć w trakcie realizacji moich badań dowiedziałam się wiele o strukturze i właściwościach cząsteczek zbudowanych z powtórzeń CGG, jednak nadal kryją one wiele tajemnic.

VI. MATERIAŁY I METODY

VI.1 Synteza chemiczna

Analizowane cząsteczki RNA (tab. 27) otrzymano metodą amidofosforynową na podłożu stałym, wykorzystując doświadczenie kierowanej przez prof. R. Kierzka Pracowni Chemii RNA, w syntezie chemicznej kwasów nukleinowych. Syntezę prowadzono w skali 1 mikromolowej przy użyciu handlowo dostępnych amidofosforynow z blokadą 2'-O-TOM (2'-O-triizopropylsilyloksymetylową). Część modyfikowanych nukleozydów takich jak LNA, czy inozyna pochodziła z pracowni prof. R. Kierzka. Po syntezie otrzymywałam oligorybonukleotydy z wolną grupą 5'-OH. Wydajność czystego oligomeru z jednej skali syntezy wynosiła ~ 10 - 20 OD (1OD RNA = 40 µg/ml).

Tabela 27. Sekwencje cząsteczek RNA otrzymanych metodą amidofosforynową na podłożu stałym

Cząsteczki RNA	
7-mery	G-C ^L GGCGG-C
CGGCGG-C	pG-CGGCGG-C
8-mery	G-C ^{Br} GGCAG-C
CGGCGG-CG	G-CACGUG-C
G-CGGCGG-C	G-CCGCCG-C
G-CGGC ^{Br} GG-C	11-mery
G-C ^{Br} GGCGG-C	G(CGG) ₃ C
pG-C ^{Br} GGCGG-C	G(CCG) ₃ C
G-C ^{Br} GGCIG-C	18-mery
G-CIGC ^{Br} GG-C	G(CGG) ₄ C
G-C ^{Me} GGCGG-C	G(CCG) ₄ C
pG-C ^{Me} GGCGG-C	20-mer
G-C ^{Me} GGCIG-C	G-C ^{Br} GGCGG-C-AAAA-G-C ^{Br} GGCGG-C

Synteza 2',3',tri-O-acetylo-N2-acetylo-8-metyloguanozyny (Ac₄^{Me}G, III)

Ac ₄ ^{Br} G	726 mg, 1.36 mM
[(C ₆ H ₅) ₃ P] ₄ Pd	90 mg
Al(CH ₃) ₃	4 ml
THF bezwodny (SIGMA)	30 ml

suszka: żel krzemionkowy firmy MERCK

2',3',tri-O-acetylo-N2-acetylo-8-bromoguanozynę (**II**) oraz katalizator palladowy [(C₆H₅)₃P]₄Pd rozpuściłam w 10 ml THF, odparowałam i dosuszyłam przez ok. 40 minut pod zmniejszonym ciśnieniem. Następnie oba związki rozpuściłam w 30 ml THF, a trójszyjną kolbę zaopatrzoną w balon z argonem oraz septę umieściłam na mieszadle magnetycznym, pod chłodnicą zwrotną z suszką. Do ochłodzonej na łaźni lodowej o temperaturze 4°C mieszaniny reakcyjnej wkropliłam Al(CH₃)₃ i reakcję prowadziłam przez 24 godziny w temperaturze wrzenia. Po zakończeniu reakcji odparowałam THF, dodałam wodny roztwór kwaśnego węgla sodu i przeprowadziłam 3-krotnie ekstrakcję chlorkiem metylenu. Warstwy organiczne połączyłam, osuszyłam dodając bezwodny siarczan sodu, odsączyłam,

a następnie odparowałam do sucha. Otrzymałam 465 g 2',3',tri-O-acetylo-N2-acetylo-8-metyloguanozyny (**III**). Wydajność: około 65 %.

Kolejne etapy syntezy 3'-O-amidofosforynu 5'-O-dimetoksytrytylo-2'-O-tertbutylodimetylsililo-2N-((dimetyloamino)metyleno)-8-metyloguanozyny (**VI**) przebiegały standardowo (215).

VI.2. Przygotowanie RNA do badań

Przygotowanie cząsteczek RNA do badań po syntezie chemicznej przebiegało w kilku etapach.

VI.2.1. Usunięcie grup ochronnych oraz rozdzielanie cząsteczek RNA

W celu odcięcia oligomerów od podłoża, usunięcia grup zasadolabilnych oraz odsililowania, podłoże traktowano:

A.

Oligomery nie zawierające atomu bromu

40% roztworem CH_3NH_2 w H_2O (2 ml), całość inkubowano ~ 20 godzin w temperaturze pokojowej.

Oligomery zawierające atom bromu

32% roztworem $\text{NH}_4\text{OH}:\text{EtOH}$ (2ml, 3:1 v/v), całość inkubowano przez 2 dni w temperaturze pokojowej.

Następnie roztwór zbierano znad podłoża, podłoże dokładnie płukano mieszaniną $\text{EtOH}:\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (3:1:1 v/v/v). Roztwory łączono i odparowano do sucha (wyparka wirówkowa). Otrzymany osad oligorybonukleotydu rozpuszczono w 0.5 ml trójfluorowodoru trójetyloaminy (1M w THF) i inkubowano przez 20 godzin w temperaturze pokojowej (z wytrząsaniem do momentu rozpuszczenia).

B.

Oligomery - niezależnie od sekwencji

32% roztworem $\text{NH}_4\text{OH}:\text{EtOH}$ (2ml, 3:1 v/v), całość inkubowano przez noc w temperaturze $\sim 50^\circ\text{C}$. Następnie próbkę wymroźono przez 15 minut w temperaturze -20°C , roztwór znad silikażelu przesączono przez sączek, silikażel przepłukano 3 x 0.5 ml wody i przesącz odparowano do sucha. Po dodaniu 30 μl DMF-u i 270 μl $(\text{Et})_3\text{N}\cdot 3\text{HF}$, zapewniając bezwodne warunki, próbkę ogrzewano w temperaturze 55°C przez 2-3 h, mieszając co 10 minut aż do rozpuszczenia osadu. Następnie dodano 5 ml n-butanolu i umieszczono próbkę w temperaturze -20°C w celu strącenia osadu oligomeru. Po 1 godzinie osad został zwirowany w temperaturze 4°C (10 min, 5000 obr/min), roztwór został zlany, a osad wysuszony pod zmniejszonym ciśnieniem.

W celu rozdzielania oligomerów o różnej długości po syntezie stosowano różne metody:

Cienkowarstwowa chromatografia cieczowa (TLC)

Próbki RNA rozpuszczono w 100 μl wody i nałożono na płytki silikażelowe (20x20 cm), następnie płyty rozwijano w układzie n-propanol/amoniak/woda 55:35:10 lub 58:32:10 (v/v/v). Po zakończeniu

rozdziálu (~ 4-5 h) prążki odpowiadające właściwym oligorybonukleotydom wyskrobano z płytek i eluowano 3-krotnie 2 ml wody. Połączone frakcje odparowano do sucha.

W celu usunięcia resztek silikażelu, próbki rozpuszczono w 500 µl wody, następnie wirowano w temperaturze pokojowej przy 12000 obr/min przez 3 minuty, roztwór przeniesiono do nowych probówek (Eppendorf) oraz użyto kolumn zawierających silanizowane podłoże C18 (Sep-Pak, firmy Waters). Oczyszczone oligomery RNA liofilizowano i przechowywano w -20°C. Otrzymywano 10 – 20 OD z syntezy w skali 1 mikromolowej.

Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC)

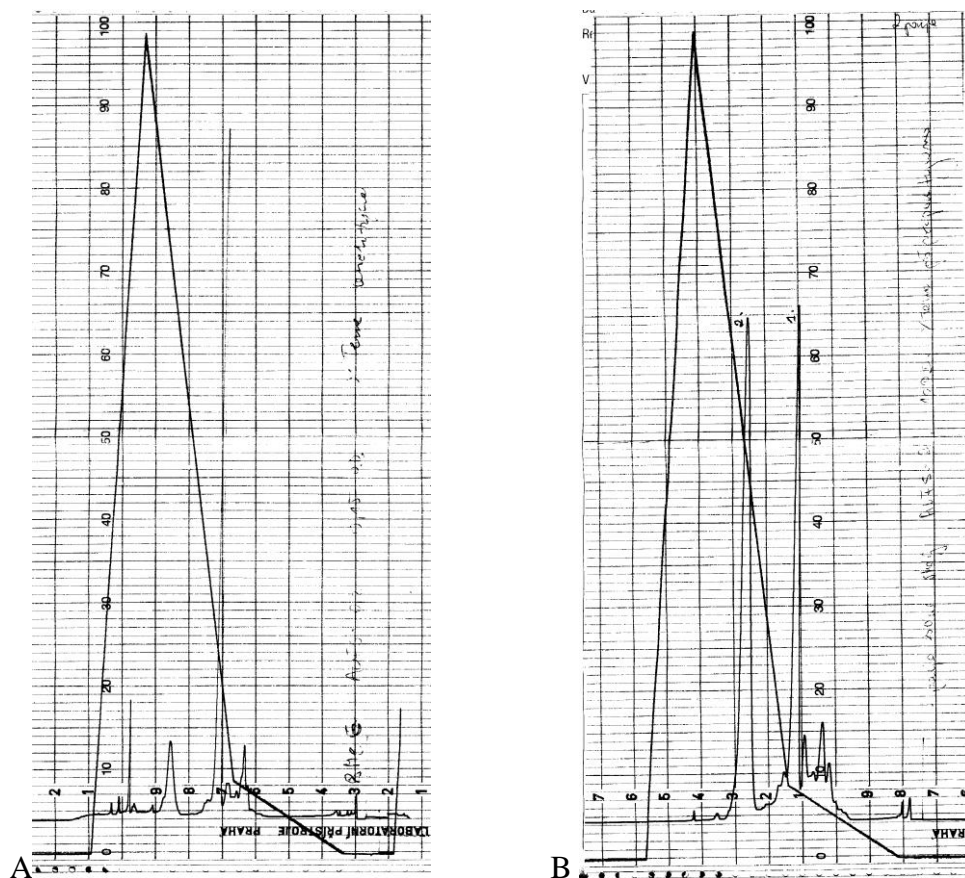
Jest to alternatywna metoda, która była stosowana do oczyszczania cząsteczek RNA. Próbki RNA w ilościach podanych w tabelach 28 i 29 były nastrzyknięte do układu chromatograficznego, a następnie eluowane gradientowo. Czas retencji dla G-CGGCGG-C wynosił w skali analitycznej ~ 16.3 min (20% B), a w skali półpreparatywnej ~ 12 min (8% B) dla 1 piksu oraz ~ 19.4 min (43% B) dla 2 piksu (rys. 222). Po zakończeniu rozdziálu frakcje zawierające główną cząsteczkę odparowano do sucha. Czystość sprawdzono wykonując spektrometr mas typu MALDI-TOF.

Tabela 28. Program gradientowy zastosowany do rozdziálu w skali analitycznej

kolumna analityczna - XTerra™ RP18 ^{5µm} (4.6X150mm)				
czas	przepływ (ml/min)	A%	B%	informacje dodatkowe
program gradientowy 1				
0	1	100	0	
25	1	90	10	0.1 – 0.2 OD RNA
30	1	50	50	
32	1	100		A - 10 mM NH ₄ HCO ₃
47	1	100		B - 10 mM NH ₄ HCO ₃ /CH ₃ CN (1/1 v/v)
47.01	0.10	100		AUFS = 0.2
program gradientowy 2				
0	1	100	0	
15	1	90	10	
27	1	0	100	
32	1	100	0	
42	1	100	0	
42.02	0.10	100	0	

Tabela 29. Program gradientowy zastosowany do rozdziálu w skali półpreparatywnej

kolumna półpreparatywna - XTerra™ RP18 ^{7µm} (7.8X150mm)				
czas	przepływ (ml/min)	A%	B%	informacje dodatkowe
program gradientowy				
0	2	100	0	
15	2	90	10	10 OD RNA
27	2	0	100	
32	2	100	0	A 10 mM NH ₄ HCO ₃
42	2	100	0	B 10 mM NH ₄ HCO ₃ /CH ₃ CN (1/1 v/v)
42.02	0.10	100	0	AUFS = 2



Rys. 222. Chromatogramy z rozdziłu zanieczyszczonej cząsteczki $G-C^{Me}GGCGG-C$, otrzymane techniką HPLC: skala analityczna (A), skala preparatywna (B)

Elektroforeza poliakrylamidowa w warunkach denaturujących (PAGE)

Żel denaturujący 19% na dużą płytę:

- mocznik 47.25 g
- żel poliakrylamidowy 40% (19:1) – 56.25 ml
- bufor TBE \times 10 – 11.25 ml
- woda – 11.25 ml
- APS - 1 ml

korek: 10 ml roztworu żelu + 10 μ l TEMED

- TEMED – do reszty 20 μ l
- bufor elektroforetyczny - 1 \times TBE

Elektroforezę preparatywną w warunkach denaturujących stosowano do oczyszczania długiego oligorybonukleotydu (44-meru) syntetyzowanego chemicznie po etapie usunięcia grup ochronnych (grubość żelu 2 mm, rozmiar żelu 30 \times 40 cm). Elektroforezę prowadzono 4 godziny przy mocy prądu 60 W. Główny oligorybonukleotyd eluowano z żelu 7 ml sterylnej, dejonizowanej wody przez 2 dni i następnie odsalano na kolumnkach NAP-25 (elucja sterylną, dejonizowaną H₂O). Dla odsolonego oligomeru RNA wykonano widma masowe (MALDI-TOF), w celu sprawdzenia czy otrzymano cząsteczkę o właściwej długości.

VI.2.2. Oczyszczenie cząsteczek RNA od niskocząsteczkowych związków

Stosowane roztwory:

10 mM NH₄HCO₃

NH₄HCO₃ = 7 9.8 mg

H₂O do 100 ml

W celu odsolenia próbek lub usunięcia innych niskocząsteczkowych zanieczyszczeń używano:

Kolumnienki Sep-Pak C18

Kolumny zawierające silanizowane podłoże C18 przemyto 10 ml acetonitrylu, a następnie 10 ml 10 mM roztworu wodorowęglanu amonu. Na tak przygotowane kolumny nakładano próbki rozpuszczone w 10 ml 10 mM roztworu wodorowęglanu amonu. Zebrano trzy frakcje oznaczone odpowiednio:

L – przesącz uzyskany po nałożeniu próbki na kolumnę,

W – przemycie próbki 10 ml 10 mM roztworem wodorowęglanu amonu oraz

C – frakcja właściwa, zawierająca oligorybonukleotyd zebrany przez przemycie kolumny 5 ml 30 % roztworu acetonitrylu w wodzie.

Na płytce TLC wykonano w skali testowej próbę na obecność oligorybonukleotydu w trzech zebranych frakcjach lub badano absorbancję poszczególnych frakcji, a frakcję C zawierającą oligorybonukleotyd odparowano do sucha.

Kolumny Sephadex G-25

Odsalanie 44-meru przeprowadzono na kolumnie sporządzonej z żelu Sephadex G-25. Prędkość przemieszczania się cząsteczek wzdłuż żelu jest odwrotnie proporcjonalna do ich masy cząsteczkowej. Przed rozdziałem kolumnę przemyto 300 ml wody. Po prawie całkowitym odsączeniu wody z żelu naniesiono roztwór RNA, a po jego wnikięciu w żel również ostrożnie naniesiono na kolumnę 1 ml wody w celu dalszego wnikięcia tego roztworu do wnętrza żelu. Po wnikięciu i tej porcji, kolumnę nad żelem napełniono ostrożnie sterylną, dejonizowaną wodą i utrzymywano jej objętość na względnie stałym poziomie przez cały czas prowadzenia rozdziału. Po zebraniu pierwszych 20 ml (frakcja bez RNA) podstawiono kolejne próbki na 10 ml, zbierając do nich następne frakcje po 10 ml. W sumie zebrano 9 frakcji zawierających RNA, z czego pierwsze 2 były odsolone, kolejne 7 było nadal zasolonych. Frakcje zasolone odparowano i wykonano dla nich ponownie rozdział na kolumnie. Odsolone RNA odparowano (wyparka wirówkowa).

Wytrącanie RNA

A.

Do 3 ml 2% NaClO₄ w suchym acetonie dodano ok. 150 µl RNA i dokładnie wymieszano. Następnie 1,5 ml zawiesiny przeniesiono do próbki Eppendorf i wirowano 10 minut (10000 obr/min).

Supernatant usunięto, dodano drugą porcję zawiesiny, ponownie zwirowano i usunięto supernatant. Osad przemyto 3 razy 100 µl suchego acetonu i wysuszono.

B.

Do 4.5 ml n-butanolu dodano ok. 0.5 ml roztworu 44-meru w trójfluorowodoru trójetyloaminy i dokładnie wymieszano. Następnie 5 ml tej zawiesiny umieszczono na 1 godzinę w -20°C, po czym wirowano w 4 °C przez 5 minut (5000 obr/min). Supernatant usunięto, a osad dosuszono.

Dializa

woreczek dializacyjny: SpectraIPor®CE(Cellulose Ester), MWCO 500, średnica 5 mm, objętość 1 ml

Do 3-krotnie przemytego sterylną wodą woreczka dializacyjnego dodano roztwór zasolonego oligomeru i woreczek umieszczono w litrowej butelce ze sterylną wodą. Dializę prowadzono przez 24 h w temperaturze 4°C lub temperaturze pokojowej cały czas mieszając. Wodę zmieniano 3 razy. Następnie zawartość woreczka dializacyjnego przeniesiono do próbówki Eppendorf i odparowano do sucha.

Ultrafiltracja

próbówki ultrafiltracyjne: Amicon Ultra-4, membrana z regenerowanej celulozy o punkcie odcięcia 3 kDa, objętość 4 ml

Do 3-krotnie przemytej sterylną wodą próbówki ultrafiltracyjnej dodano roztwór zasolonego oligomeru i próbówkę umieszczono w wirówce. Szybkość wirowania (~ 10800 rpm) w temperaturze 25°C została tak dobrana, aby w ciągu 12 minut przefiltrować ~ 3 ml roztworu. Wodę zmieniano 3-4 razy otrzymując w ten sposób odsoloną próbkę. Metodę ultrafiltracji stosowano także do zmiany buforu. W tym celu odsoloną zawartość próbówki przefiltrowano dodatkowo 2 krotnie, używając nowego buforu, a następnie pozostały roztwór przeniesiono do próbówki typu Shigemi i uzupełniono buforem do objętości 300µl. Tak przygotowana próbka była gotowa do dalszych badań.

Obliczanie ilości RNA do badań

Ilość RNA była obliczana spektrofotometrycznie, korzystając z wzorów przedstawionych poniżej:

$$OD=A \cdot \text{roz} \cdot V$$

A = absorbancja

roz = rozcieńczenie w kuwecie

V = objętość całkowita roztworu [ml]

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

c - stężenie [mol/dm³]

ε - współczynnik ekstynkcji [dm³/mol·cm]

l - droga optyczna [cm]

Współczynniki ε obliczano korzystając z kalkulatora na stronie

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

RNA OD260 1 = 40 µg/ml

Homogenność otrzymanego preparatu potwierdzano przy pomocy widma ^1H NMR, MALDI-TOF MS lub elektroforetycznie.

VI.3. Bufory i metody standardowe stosowane w spektroskopii NMR

Bufory stosowane do przygotowania roztworów RNA do pomiarów NMR:

Bufor sodowy:

150 mM NaCl, 10 mM bufor fosforanu sodu, 0,1 mM EDTA, pH 6,6

NaCl – 438.3 mg

Na_2HPO_4 – 26.62 mg

NaH_2PO_4 – 37.49 mg

EDTA – 1.86 mg

uzupełniono sterylną, dejonizowaną wodą do 50 ml

Bufor potasowy:

150 mM KCl, 10 mM bufor fosforanu potasu, 0,1 mM EDTA, pH 6,6

KCl – 1.116g

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

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

EDTA – 0.1 mM, 3.72 mg

uzupełniono sterylną, dejonizowaną wodą do 100 ml

Tris-HCl

10mM Tris-HCl, pH 6,6

Tris-HCl – 12.11 mg

HCl (12.1 M) – 8 µl

uzupełniono sterylną, dejonizowaną wodą do 10 ml

Przygotowanie próbek RNA

Probówka typu Shigemi

Wszystkie eksperymenty NMR zostały wykonane w probówkach typu Shigemi, które umożliwiają uzyskanie 2-krotnie wyższego stężenia roztworu niż w tradycyjnej probówce o średnicy 5 mm. Probówki te posiadają plastikowe elementy, powyżej i poniżej badanego roztworu, które mają taką samą podatność magnetyczną jak rozpuszczalnik.



Próbki w D₂O

Roztwory oligomerów były odparowane do sucha, ponownie dwukrotnie odparowane do sucha z 50 μ l D₂O (99,8%) a następnie rozpuszczone w D₂O (99,96% ampułki Aldrich, 0,3 ml - próbówka typu Shigemi). Próbki bezpośrednio w próbówce typu Shigemi były umieszczone w płaszczu z gorącej wody oraz były suszone przy użyciu długiej igły, helem o czystości 5.0 z dodatkowym filtrem.

Próbki w H₂O

W celu analizy sygnałów wymienialnych atomów wodoru zliofilizowane próbki były rozpuszczone w H₂O/D₂O (270 μ l : 30 μ l - próbówka typu Shigemi) przy pH 6,6. Obecność 10% deuteru jest niezbędna ze względów aparaturowych dla celów tzw. stabilizacji jądrowej (ang. *lock*).

W celu uzyskania właściwego zwijania się łańcuchów RNA, przed rozpoczęciem serii pomiarów w D₂O i H₂O/D₂O, próbki były grzane w temperaturze 95°C przez 3 minuty i powoli schładzane do temperatury pokojowej.

Rejestracja widm

Widma NMR przedstawione w pracy zostały wykonane na spektrometrach Bruker AVANCE II 400, Bruker AVANCE III 700 (Instytut Chemii Bioorganicznej PAN) oraz Bruker AVANCE II 600 (Wydział Chemii UAM w Poznaniu). Widma były procesowane za pomocą programu TOPSPIN 3.1 (Bruker Biospin) oraz analizowane za pomocą takich programów jak Cara, czy Felix.

Widma ¹H NMR

Jednowymiarowe widma ¹H NMR w D₂O wykonano w zakresie temperatur 15°C-30°C, głównie w temperaturze 25°C przy szerokości spektralnej 12 ppm. Zależność widm ¹H NMR od temperatury badano w różnych zakresach w zależności od próbki, najszerszy zakres obejmował temperatury od 5°C do 80°C. Resztkowy sygnał wody HDO był usuwany za pomocą naświetlania małą mocą metodą presaturacji (ang. *presaturation*).

Jednowymiarowe widma ¹H NMR w mieszaninie H₂O/D₂O (v/v, 9:1) wykonano głównie w temperaturze 10°C, 15°C, 20°C i 25°C, w niektórych przypadkach zakres temperatur wynosił do 80°C, przy szerokości spektralnej 20 ppm. Silny sygnał pochodzący od H₂O tłumiony był za pomocą gradientowych impulsów metodą WATERGATE (213) (d₁₉ = 264 μ s dla 400 MHz oraz 176 μ s dla 600 MHz).

Widma 2D NMR

Dwuwymiarowe, fazoczułe widma 2D NOESY (D₂O) wykonano w temperaturze 15°C, 20°C lub 25°C. Temperatura była dobierana w taki sposób, aby uzyskać jak najlepsze rozseparowanie sygnałów. Widma wykonano przy dwóch różnych czasach mieszania (d₈, ang. *mixing time*): 150 ms oraz 400 ms. W celu przypisania sygnałów H2', czasami rejestrowano widmo 2D NOESY z czasem mieszania 80 ms.

Widma 2D NOESY w H₂O/D₂O (9:1, v/v) wykonano w temperaturze 10°C, 15°C, 25°C lub 40°C z czasem mieszania 150 ms z zastosowaniem sekwencji impulsów WATERGATE do tłumienia sygnału wody.

Fazoczułe widma 2D DQF-COSY (D₂O) wykonano w temperaturze 20°C lub 25°C. Zarejestrowano widma dla dwóch różnych zakresów: obejmującego wszystkie protony 9.20 – 2.00 ppm, jak również dla zawężonego zakresu obejmującego tylko sygnały reszt cukrowych 6.50 – 2.00 ppm. Dla zawężonego zakresu widma stosowano 4048 punktów w kierunku F2 w celu zwiększenia rozdzielczości.

Fazoczułe widma korelacyjne ¹H-¹³C HSQC wykonano głównie dla zawężonego zakresu obejmującego sygnały ¹³C tylko od reszt cukrowych (55-100 ppm). Widmo obejmujące cały zakres sygnałów ¹³C, także od sygnałów aromatycznych (55-165 ppm), zarejestrowano stosując sekwencję wykorzystującą kształtne impulsy do odsprzęgnięcia oddziaływań z ¹³C.

W fazoczułych widmach korelacyjnych ¹H-³¹P HSQC (D₂O) szerokość spektralna wynosiła 2.5 ppm w kierunku F2 i 5 ppm w kierunku F1 (O2 = -1 ppm, wzorzec trimetylofosforan).

Widma 2D ¹H-¹⁵N HSQC (H₂O) wykonano w temperaturze 10°C lub 15°C. Zarejestrowano widma dla dwóch różnych zakresów: obejmującego przesunięcia chemiczne atomów azotu N2 reszt guanozyn oraz N4 reszt cytydyn (zakres 50-100 ppm), jak również dla zawężonego zakresu obejmującego tylko sygnały NH1 (zakres 140-150 ppm).

Pomiar współczynnika dyfuzji translacyjnej

Szybkość procesu dyfuzji cząstek określa parametr zwany współczynnikiem dyfuzji *D*. Wartość współczynnika dyfuzji translacyjnej zależy od takich parametrów jak wielkość, kształt cząsteczki, temperatura oraz lepkość roztworu.

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r_s}$$

k - stała Boltzmana;

T - temperatura;

η - lepkość;

r_s - promień hydrodynamiczny cząsteczki

Pomiar metodą NMR opiera się na zależności współczynnika dyfuzji od intensywności sygnału widma NMR zgodnie z równaniem Stejskala-Tannera:

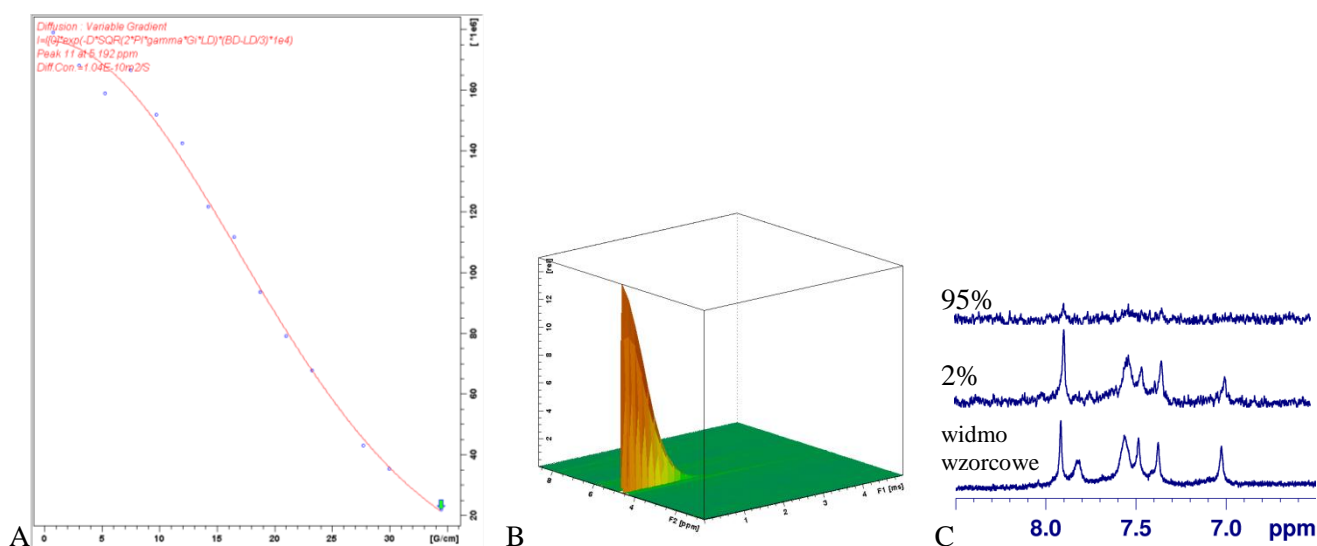
$$I = I_0 e^{-D q^2 (\Delta - \delta/3)}$$

q - 4257.7 Hz/G

Δ - 150 ms

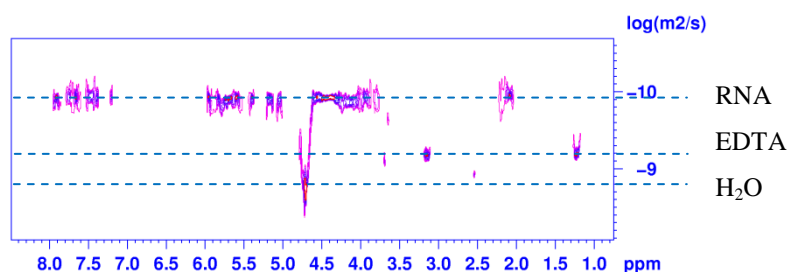
δ - 4 ms

Rejestrując zmianę intensywności widma wraz ze zmianą gradientu pola G (rys. 223 A, B) przy ustalonym czasie pomiędzy gradientami (150 ms) i czasie trwania tych zaburzeń pola magnetycznego (4 ms) wyznaczono współczynniki dyfuzji w badanych próbkach. Wartości Δ oraz δ zostały tak dobrane, aby przy mocy gradientu 2% intensywność sygnałów w widmie ^1H NMR była możliwie niezaburzona, natomiast przy mocy gradientów 95% intensywność tych sygnałów była bliska zera (rys. 223 C).



Rys. 223. Zmiana intensywności sygnału w widmie NMR wraz ze zmianą gradientu pola G (A, B), sposób optymalizacji wartości δ (Δ , δ)

Pomiary współczynnika dyfuzji wykonywano dla tych samych próbek, które używane były do pozostałych eksperymentów. Wyniki analizowane były w programie TOPSPIN 3.1 (moduł DOSY lub T1/T2). Technika ta pozwala na uzyskanie widm pseudo-2D (moduł DOSY), zawierających informację o prędkości dyfuzji cząsteczek w rozpuszczalniku. Ponieważ współczynnik dyfuzji zależy między innymi od promienia hydrodynamicznego cząsteczki, otrzymuje się więc rozseparowanie sygnałów zależne od wielkości cząsteczek (rys. 224).



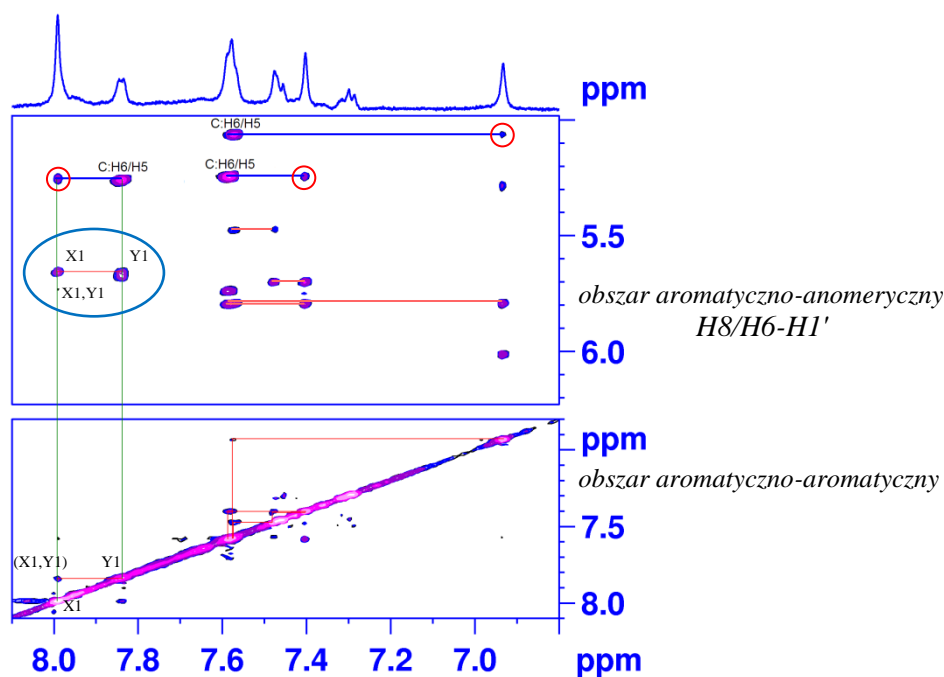
Rys. 224. Przykładowe widmo DOSY dla cząsteczki $G\text{-C}^{\text{Me}}\text{GGCIG-C}$, w kierunku $F1$ podane są wartości $\log(D)$

Przypisanie sygnałów w widmach NMR

Droga do wyznaczenia struktury w roztworze, rozpoczyna się od przypisania sygnałów rezonansowych pochodzących od protonów, jak także od innych jąder magnetycznych (^{13}C , ^{15}N , ^{31}P).

Wszystkie sygnały rezonansowe pochodzące od protonów w RNA koncentrują się w trzech charakterystycznych zakresach spektralnych: H8/H6, H1'/H5, H2'/H3'/H4'/H5'/H5'' i mieszczą się w wąskim przedziale 5 ppm (8.5-3.5 ppm) (np. rys. 111). Z uwagi na podobieństwo w strukturze chemicznej reszt nukleotydów, które przekłada się na podobieństwo przesunięć chemicznych w poszczególnych rejonach, sygnały te bardzo często nakładają się na siebie. Ponadto próbki RNA do badań NMR rozpuszczone są w D₂O, która zawiera około 0.01% HOD. Sygnał resztkowy od rozpuszczalnika (HDO) pojawia się w obszarze H2'/H3'/H4'/H5'/H5''. Podczas jego tłumienia mogą ulec wygaszeniu lub stłumieniu również sygnały rezonansowe pochodzące od protonów H2' i H3'.

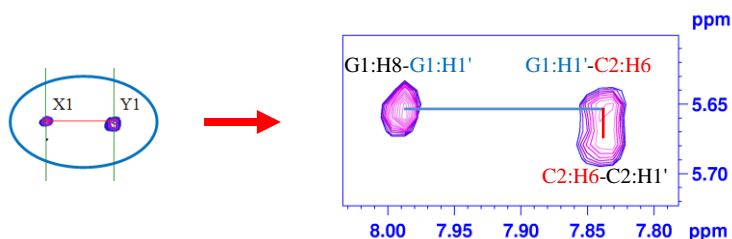
Przypisanie sygnałów w widmie 2D NOESY polega na analizie sygnałów korelacyjnych pomiędzy protonami znajdującymi się w odległości mniejszej niż około 4-5 Å. W widmach 2D NOESY w pierwszej kolejności analizowałam obszar aromatyczno-aromatyczny H8/H6-H8/H6 oraz aromatyczno-anomeryczny H8/H6-H5/H1', gdzie obserwuje się trzy rodzaje oddziaływań dipolowych: H8/H6_(n)-H8/H6_(n+1) oraz H8_(n-1)-H5_(n) oraz H8/H6-H1' (rys. 225).



Rys. 225. Sposób wyznaczenia sekwencyjnej ścieżki NOE

W pobliżu linii diagonalnej, w obszarze aromatyczno-aromatycznym, znajdują się sygnały H8/H6_(n)-H8/H6_(n+1) pochodzące od oddziaływań warstwowych pomiędzy kolejnymi zasadami w sekwencji. Dla regularnej struktury A-RNA w obszarze aromatyczno-anomerycznym obserwujemy słabe międzynukleotydowe sygnały korelacyjny typu H8_(n-1)-H5_(n), pomiędzy resztą cytydyny (n) a poprzednią w sekwencji resztą guanozyny (n-1) (rys. 225, sygnały w czerwonym kółku). Kontakty te, podobnie jak korelacje typu H8/H6_(n)-H8/H6_(n+1), dostarczają informacji, które reszty nukleotydowe sąsiadują ze sobą (rys. 225). Oddziaływania te są pomocne przy wyznaczeniu tak zwanej sekwencyjnej ścieżki NOE, czyli charakterystycznej dla kwasów nukleinowych ścieżki przekazywania magnetyzacji,

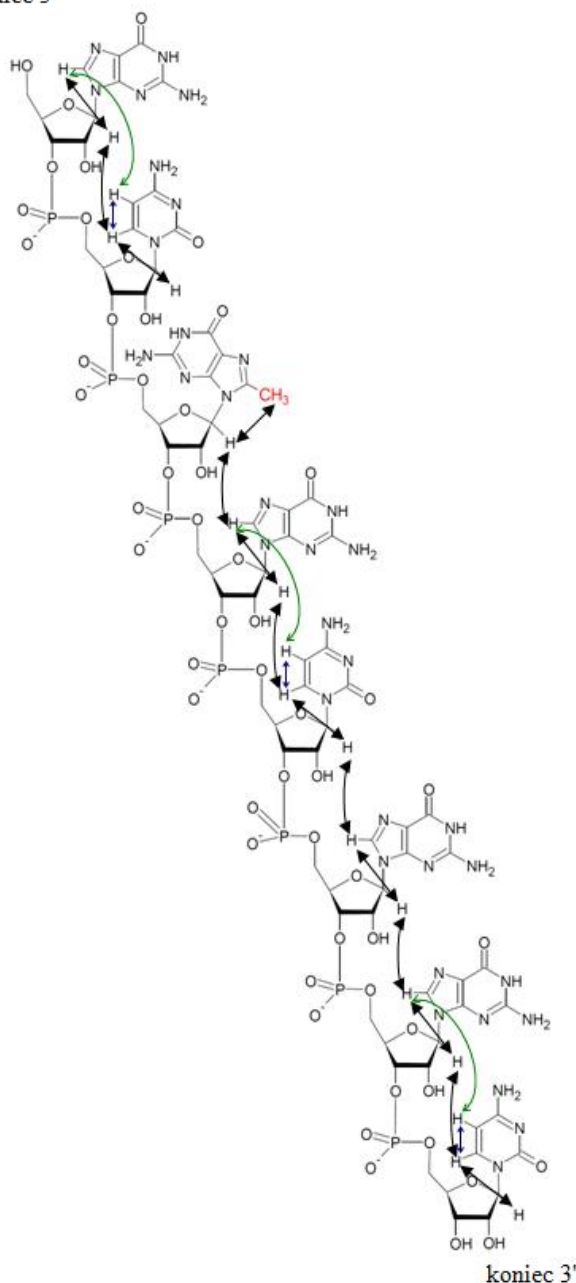
która dla regularnej, helikalnej struktury przebiega wzdłuż całego łańcucha. W sekwencyjnej ścieżce NOE oddziaływania wewnątrz nukleotydydowe $H8/H6_{(n)}-H1'_{(n)}$, występują na przemian z oddziaływaniami międzynukleotydydowymi $H1'_{(n)}-H8/H6_{(n+1)}$ (rys. 226, 227). Jeśli w obszarze aromatyczno-aromatycznym obserwujemy sygnał korelacyjny o przesunięciu chemicznym atomu np. X1, Y1 (zaznaczone zieloną linią) to w obszarze aromatyczno-anomerycznym pomiędzy atomami o przesunięciach protonów aromatycznych X1 oraz Y1 po przeprowadzeniu prostej (rys. 225, kolor czerwony) powstaje odcinek ścieżki NOE. Kolorem niebieskim zaznaczyłam korelacje $H8_{(n-1)}-H5_{(n)}$, które również odpowiadają odcinkom ścieżki NOE (rys. 225). Pozostałe fragmenty ścieżki są wyznaczane na podstawie analizy wewnątrz- i międzynukleotydydowych połączeń NOE obserwowanych w regionie $H8/H6-H1'$ widma NOESY (rys. 225). Przykładowo dla cząsteczki $G-C^{Me}GGCGG-C$ ścieżka ta zaczyna się od sygnału korelacyjnego **G1:H8-G1:H1'**, kolejnym sygnałem jest sygnał międzycząsteczkowy **G1:H1'-C2:H6**, kolejny sygnał jest znów wewnątrzcząsteczkowy **C2:H6-C2:H1'** i tak dalej (rys. 226).



Rys. 226. Fragment sekwencyjnej ścieżki NOE, na której zaznaczyłam wewnątrzcząsteczkowe sygnały **G1:H8-G1:H1'**, **C2:H6-C2:H1'** oraz międzycząsteczkowy sygnał **G1:H1'-C2:H6**.

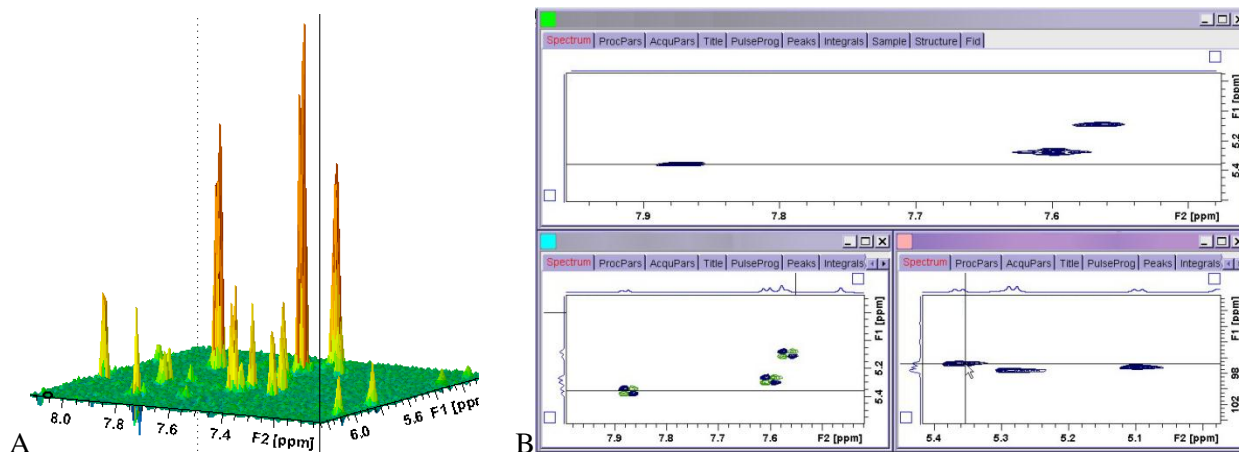
Sygnały korelacyjne wewnątrz- i międzycząsteczkowe dla tego samego atomu mają takie samo przesunięcie chemiczne w jednym z kierunków, dlatego łączy się je w pary poziomymi liniami dla wspólnych protonów $H1'$ (kolor niebieski) lub pionowymi liniami dla wspólnych protonów $H8/H6$ (kolor czerwony) (rys. 226). Proton $H8$ reszty **G1** jest bardziej odsłaniany od pozostałych protonów $H8$ i jego sygnał występuje przy największej wartości ppm, gdyż dla terminalnej reszty **G1** efekt przesłaniania indukowany prądami pierścieniowymi pochodzi tylko od sąsiedniej zasady z końca 3'. Wyznaczenie ścieżki NOE jest jednoznaczne z przypisaniem sygnałów od protonów $H8$, $H6$ i $H1'$. Sygnały anomeryczne $H1'$ są singletami. Brak rozszczepienia sygnałów $H1'$ jest wynikiem małych wartości stałych sprzężeń spinowo-spinowych $^3J_{H1'H2'}$.

koniec 5'



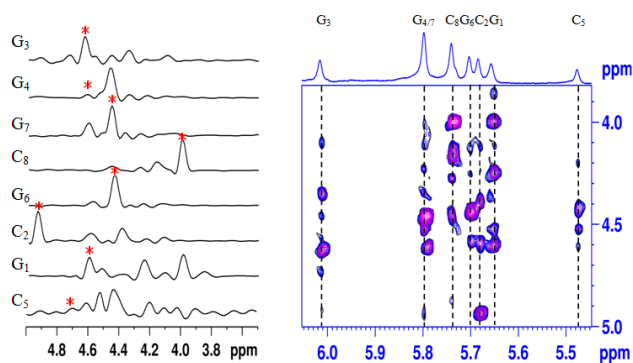
Rys. 227. Schemat ważniejszych oddziaływań dipolowych pokazanych na przykładzie oligomeru G-C^{Me}GGCGG-C; kolor czarny: sekwencyjna ścieżka NOE; kolor niebieski: sygnały korelacyjne H6-H5; kolor zielony: sygnały korelacyjne H8_(n-1)-H5_(n)

W rejonie aromatyczno-anomerycznym (rys. 225, 228), sygnały korelacyjne H6-H5 pochodzące od reszt cytydyn są najintensywniejsze ze względu na małą odległość NOE pomiędzy atomami wodoru, $d_{H_5H_6} = 2.45\text{\AA}$. Dla sekwencji G-C^{Me}GGCGG-C przykładowe przypisanie sygnałów H5 reszt cytydyn na podstawie równoczesnej analizy trzech typów widm pokazałam na rysunku 228 B. W widmie ¹H-¹H DQF-COSY obserwowałam trzy charakterystyczne sygnały korelacyjne od reszt C2, C5 oraz C8, przy tych samych wartościach ppm co w widmie 2D NOESY. W widmie ¹H-¹³C HSQC sygnały korelacyjne C5-H5 pojawiały się w typowym dla atomu węgla C5 zakresie, przy ok. 97 ppm, w którym nie występują inne sygnały. W ten sposób jednoznacznie zidentyfikowałam sygnały H5 i H6 tych reszt.



Rys. 228. Przypisanie sygnałów rezonansowych pochodzących od protonów H6 i H5 reszt cytydyny dla cząsteczki G-C^{Me}GGCGG-C.

Z powodu nakładania się sygnałów H2' z sygnałami H3'/H4' przypisanie sygnałów od tych protonów nie jest łatwe. Ponadto, dla regularnych struktur A-RNA, w widmach DQF-COSY nie obserwuje się sygnałów korelacyjnych H1'-H2', ze względu na małe wartości wicynalnych, spinowo-spinowych stałych sprzężenia. Sygnały H2' przypisałam na podstawie analizy sygnałów NOE pomiędzy protonami H1'(n)-H2'(n) oraz H8/H6(n)-H2'(n) w widmie 2D-NOESY. Sygnały H1'-H2' pochodzą od wewnątrzcząsteczkowych oddziaływań dipolowych i są najsilniejsze w rejonie H5/H1'-H2'/H3'/H4'/H5'/H5". Odległość pomiędzy nimi wynosi ok. 2.7 - 2.8 Å i nie zależy od konformacji reszty cukrowej.



Rys. 229. Fragment widma 2D NOESY dla G-C^{Me}GGCGG-C obejmujący region H5/H1'-H2'/H3'/H4'/H5'/H5" przedstawiony w formie mapy konturowej; linie w kierunku F2 (wzdłuż przesunięć chemicznych $\delta_{H1'}$) wyznaczające przekroje widma 2D NOESY, pomocne do przypisania sygnałów protonów H2'. Sygnały H2' na przekrojach oznaczono gwiazdką [$d_8=150$ ms, D₂O, 25°C, 150 mM NaCl, bufor sodowy: 150 mM NaCl, 10 mM fosforan sodu, 0.1 mM EDTA]

Dla reszty nukleotydydowej G4 w cząsteczce G-C^{Me}GGCGG-C intensywność przekroju sygnału pochodzącego od protonu H2' jest niewielka, prawdopodobnie wynika to z częściowego nakładania się sygnału H1' reszty G4 i G7 oraz zaburzenia intensywności całego przekroju wzdłuż przesunięcia chemicznego H1' (rys. 229). Oprócz tego sygnału zaburzona była także intensywność sygnału pochodzącego od atomu H2' reszty C5, ponieważ jego przesunięcie chemiczne jest zbliżone do przesunięcia wody i sygnał ten został stłumiony wraz z sygnałem pochodzącym od wody (rys. 229).

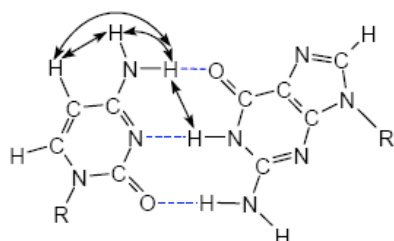
W rejonie, w którym znajdują się sygnały korelacyjne między atomami H8/H6 a H2'/H3'/H4'/H5'/H5'' można także wyznaczyć sekwencyjną ścieżkę NOE typu H8/H6-H2'. Sygnały te są intensywne dla struktur typu A-RNA, ponieważ typowa odległość wewnątrzcząsteczkowa H8/H6-H2' wynosi 3.4-4.3 Å, a międzycząsteczkowa 1.8-2.6 Å. Ponieważ wyznaczenie przesunięć chemicznych protonów H2' tylko na podstawie analizy widma 2D NOESY nie zawsze jest łatwe, to poprawność tych przypisań sprawdzałam w widmach ^1H - ^{13}C HSQC. Analizowałam, czy dla danej częstotliwości protonu H2' w kierunku F2 istnieje sygnał, którego przesunięcie chemiczne węgla znajduje się w obszarze charakterystycznych przesunięć chemicznych dla atomu węgla C2.

Przypisania części pasm rezonansowych protonów H3', H4' oraz H5'/H5'' dokonałam na podstawie analizy widm DQF-COSY, w których obserwowałam sygnały korelacyjne pomiędzy protonami H2'-H3', H3'-H4', H4'-H5', H4'-H5'' oraz H5'-H5'' (obszar zaznaczony na czarno na rys. 114). Poprawność przypisania sygnałów protonów H3' dla reszt od C2 do C8 potwierdziłam analizą widma ^1H - ^{31}P HSQC (rys. 116). Sygnały nieprzypisane na podstawie widma DQF-COSY zostały zidentyfikowane na podstawie widm ^1H - ^{13}C -HSQC (rejon H3', H4' oraz H5'/H5''; rys. 115) oraz ^1H - ^1H NOESY. W obszarze diagonalnym H2'/H3'/H4'/H5'/H5'' w widmie zarejestrowanym z czasem mieszania 150 ms, sygnały NOE dla protonów H5'-H5'' są najintensywniejsze. Dodatkowo obserwowałam sygnały korelacyjne typu H8/H6-H5' lub H8/H6-H5'' w obszarze aromatyczno-cukrowym H8/H6-H2'/H3'/H4'/H5'/H5''.

W typowych eksperymentach wykonywanych dla próbek RNA w H_2O stężenie atomów wodoru w cząsteczce wody jest około 55000 razy większe od stężenia badanej próbki ($[\text{H}_2\text{O}] = 55000 \text{ mM}$, $[\text{RNA}] \sim 2 \text{ mM}$). Dopiero po stłumieniu intensywnego sygnału od cząsteczki wody można obserwować sygnały od badanej cząsteczki. Jednak rejestrując widmo w H_2O należy zachować szczególną ostrożność, gdyż intensywność takich sygnałów zależy również od metody zastosowanej do tłumienia sygnału pochodzącego od rozpuszczalnika. Istnieje kilka metod redukcji silnego sygnału pochodzącego od H_2O , ale każda z nich wprowadza innego typu zakłócenia intensywności sygnałów. W swojej pracy najczęściej stosowałam metodę „WATERGATE” (213), która jest najskuteczniejsza oraz w najmniejszym stopniu zaburza sygnały pochodzące od oligorybonukleotydu. Dodatkowo wraz ze spadkiem temperatury zwiększała się lepkość roztworu, w wyniku czego wszystkie sygnały rezonansowe niekorzystnie poszerzały się. Niejednokrotnie, aby otrzymać wąskie sygnały labilnych protonów, eksperymenty prowadziłam w 15°C , nawet kosztem ich mniejszej intensywności.

Aby dokonać przypisania sygnałów protonów iminowych oraz aminowych, należy zarejestrować widmo 2D NOESY w obniżonej temperaturze, aby te sygnały były widoczne. Typowe sygnały korelacyjne od wymienialnych protonów w parach zasad G:C obserwujemy pomiędzy

zaznaczonymi atomami wodoru (rys. 230). Na ich podstawie przypisałam wszystkie sygnały rezonansowe pochodzące od protonów iminowych reszt guanozyny i aminowych reszt cytydyn.



Rys. 230. Para zasad G:C z zaznaczonymi oddziaływaniami dipolowymi

Sygnał protonu iminowego reszty guanozyny w obrębie kanonicznej pary G:C można przypisać analizując trzy kolejne oddziaływania dipolowe: wewnątrzcząsteczkowe pomiędzy protonem H5 cytydyny a niewiążącym protonem H4₁ grupy aminowej (C:H5-H4₁:C), następnie pomiędzy niezwiązanym wodorowo protonem H4₁ a związanym wodorowo protonem H4₂ (C:H4₁-H4₂:C) oraz kluczowe, międzycząsteczkowe oddziaływania pomiędzy protonem H4₂ reszty cytydyny a protonem iminowym H1 reszty guanozyny (C:H4₂-H1:G). W ten sposób dla cząsteczki G-C^{Me}GGCGG-C, na podstawie znanych już przesunięć chemicznych protonu H5 reszt cytydyn (tab. 18, przypisania w D₂O), wyznaczyłam przesunięcia chemiczne protonów NH1 w parach G:C.

VI.4. Materiały i metody standardowe stosowane do elektroforezy

Związki promieniotwórcze

[γ ³²P] ATP (4000 – 5000 Ci/mmol, ICN)

Stosowane bufony i roztwory:

10×TBE

Tris - 108 g

kwas borowy - 55 g

EDTA - 7.4 g

H₂O do 1000 ml

1M Tris, 1000 mM kwas borowy, 25 mM EDTA; pH 8,3

Bufor elektroforetyczny 1×TBE

100 mM Tris, 100 mM kwas borowy, 2,5 mM EDTA; pH 8,3

Bufor elektroforetyczny 0,25×TBE

25 mM Tris, 25 mM kwas borowy, 0,625 mM EDTA; pH 8,3

Bufor dla T4 kinazy polinukleotydowej - Fermentas

50 mM Tris-HCl pH 7,3, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 0,1 mM spermidyna i 0,1 mM EDTA

40% roztwór żelu poliakrylamidowego 19 : 1 (w / w)

190 g akrylamidu, 10 g bisakrylamidu, H₂O do 500 ml

40% roztwór żelu poliakrylamidowego 29 : 1 (w / w)

193,33 g akrylamidu, 6,66 g bisakrylamidu, H₂O do 500 ml

Roztwory obciążające do nakładania na żel próbek zawierających RNA

Elektroforeza w warunkach denaturujących

8 M mocznik, próbki obciążano w stosunku 1:1

Elektroforeza w warunkach niedenaturujących

30% glicerol, próbki obciążano w stosunku 5:1

Barwniki stosowane w elektroforezie próbek zawierających RNA

0,02% w/v błękit bromofenolowy, 0,02% w/v ksylencjanol, 30% glicerol (warunki niedenaturujące) lub 8 M mocznik (warunki denaturujące)

Roztwór Stains-All:

0.1 % Stains-All (0.01 g na 10 ml formamidu)

10 ml 0.1 % Stains-All w formamidzie

10 ml formamidu

50 ml 2-propanolu

3 ml 1M Tris-HCl pH 8.6

127 ml H₂O

VI.4.1. Znakowanie kwasów nukleinowych

VI.4.1.1. Znakowanie końca 5' kwasów nukleinowych izotopem ^{32}P

RNA	A	0.1 OD (~1 μl)	B	0.05 OD
woda		do 7.5 μl		do 16.3 μl
bufor dla kinazy T4		1 μl		2 μl
T4 kinaza polinukleotydowa		1 μl		1 μl
$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$		0.5-1.5 μl		0.7 μl

Do reakcji znakowania izotopem ^{32}P końca 5' cząsteczek RNA z wolną grupą OH stosowałam odczynniki podane powyżej. Reakcję prowadziłam w skali 10 lub 20 μl . Do jednej reakcji wykorzystywałam ~ 10 μCi $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$, 2U enzymu oraz 0.4 – 2 μg RNA. Reakcję prowadziłam przez 30 min w temperaturze 37°C.

Wyznakowane izotopowo cząsteczki RNA oczyszczałam w denaturującym żelu poliakrylamidowym stosując bufor 1 \times TBE. Prążki odpowiadające właściwym fragmentom RNA, które było wizualizowane w świetle UV, wycięłam z żelu (po elektroforezie preparatywnej) i eluowałam przez inkubację kawałków żelu w 300 μl sterylnej wody przez noc, w temperaturze 4°C, z łagodnym wytrząsaniem. Następnie strącałam etanolem (750 μl) z dodatkiem octanu sodu (30 μl) i glikogenu (2 μl), po 30 minutach chłodzenia próbki w suchym lodzie wirowałam (30 min, 4°C, 14 tys. rpm) i osuszałam. Poziom radioaktywności znakowanych cząsteczek oznaczałam za pomocą licznika scyntylicyjnego.

VI.4.1.2. Znakowanie końca 3' RNA izotopem ^{32}P w reakcji ligowania

<i>Synteza pCp</i>		<i>Ligacja</i>	
0.1 mM Cp	1 μl	RNA	0.05-0.1
bufor dla kinazy T4	0.4 μl	bufor dla ligazy T4	2 μl
T4 kinaza polinukleotydowa	1 μl	10 mM ATP	4 μl
$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$	1 μl	T4 RNA ligaza	2 μl
H ₂ O	1.0 μl	pCp	4 μl
		H ₂ O	do 20 μl

Reakcję znakowania izotopem ^{32}P w pozycji 5',3'-difosforanu cytydyny prowadziłam przez 30 minut w temperaturze 37°C. Następnie enzym dezaktywowałam przez ogrzanie mieszaniny reakcyjnej w temperaturze 65°C przez 5 min i umieszczałam tę mieszaninę w lodzie. W drugim etapie reakcji przeprowadzałam znakowanie RNA na końcu 3' poprzez ligację z 5',3'-difosforanem cytydyny, wykorzystując T4 ligazę RNA. Przed dodaniem innych reagentów, RNA zdenaturowałam przez 1 minutę w 95°C i gwałtownie schłodziłam do 0°C. Reakcję prowadziłam przez 4 h w temperaturze 37°C. Wyznakowane izotopowo cząsteczki RNA oczyszczałam w denaturującym żelu poliakrylamidowym stosując bufor 1 \times TBE. Wycięte z żelu wyznakowane RNA, które było wizualizowane w świetle UV, umieszczałam w próbówce Eppendorf i eluowałam przez 12 godzin

300 μ l wody. Następnie w celu precypitacji RNA, do zebranego z nad żelu supernatantu dodałam 1/10 objętości 3 M octanu sodu (30 μ l), 3 objętości schłodzonego (4°C) 96% etanolu (750 μ l) i glikogenu (2 μ l), po czym całość inkubowałam w suchym lodzie przez 30 minut. Następnie roztwór wirowałam (14.000 r.p.m., 30 min., 4°C), oddzieliłam supernatant, a otrzymany osad suszyłam w wyparce wirówkowej. Poziom radioaktywności znakowanych cząsteczek oznaczyłam za pomocą licznika scyntylacyjnego.

VI.4.2. Elektroforeza kwasów rybonukleinowych w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących

Żel 19% na małą płytę:

- mocznik 10.5 g
- żel poliakrylamidowy 40% (19:1) - 12.5 ml
- bufor TBEx10 - 2.5 ml
- woda - 2.5 ml
- APS - 0.25 ml
- TEMED - 10 μ l
- bufor elektroforetyczny - 1×TBE

Metodę elektroforezy analitycznej (grubość żelu 0,4 mm) w warunkach denaturujących wykorzystywałam również do sprawdzania homogenności próbki (rozmiar żelu 15×15 cm). Stosowałam żel poliakrylamidowy o usieciowaniu 19:1 (stosunek wagowy akrylamidu do bisakrylamidu) z 8 M mocznikiem. Elektroforezę prowadziłam przy mocy prądu 15 - 20 W. Każdą elektroforezę poprzedzałam preelektroforezą, stosując o połowę mniejszą moc niż podczas właściwej elektroforezy. Próbki obciążałam w stosunku 1:1 8 M roztworem mocznika lub formamidu z barwnikami elektroforetycznymi. W celu sprawdzenia homogenności próbki nakładałam na kieszonkę ~ 10,000 CPM znakowanego RNA lub 0.15 OD RNA z wolną grupą OH.

VI.4.3. Elektroforeza kwasów rybonukleinowych w żelu poliakrylamidowym w warunkach niedenaturujących

Żel 15%:

- żel poliakrylamidowy 29:1 - 11.25 ml
- bufor TBEx10 - 0.75 ml
- woda - 17.75 ml
- APS - 0.25 ml
- TEMED - 10 μ l
- bufor elektroforetyczny - 0.25×TBE

Elektroforezę krótkich cząsteczek RNA w warunkach niedenaturujących prowadziłam w kontrolowanych warunkach prądowych i temperaturowych, korzystając z zestawu DNA Pointer System firmy Kucharczyk. Elektroforezy prowadziłam w kontrolowanej temperaturze żelu wynoszącej

4°C lub 20°C, przy stałej mocy prądu (15 do 20 W) przez 45-50 minut. Stosowałam płyty o rozmiarze 16 × 10 cm i przekładki grubości 1mm. Próbki obciążałam 30% glicerolem z barwnikami w stosunku 5:1. Ilości znakowanego RNA nakładane na kieszonkę wynosiły 6,000 – 10,000 CPM. Ilości RNA z wolną grupą OH nakładane standardowo na kieszonkę wynosiły 0.15-0.50 OD.

Wyniki eksperymentów były wizualizowane:

A. Z użyciem znakowanych izotopem ^{32}P cząsteczek RNA: po 3 do 4 godzin przy pomocy ekranów odwzorowujących i skanera radioaktywności Typhoon 8600 z oprogramowaniem ImageQuant lub FLA-5100 z oprogramowaniem MultiGauge V.3 (FujiFilm).

B. Z użyciem cząsteczek z wolną grupą 5'OH: żele były wybarwiane przez 30-60 min w barwniku Stains-All, następnie płukane wodą do momentu odbarwienia żelu, zabezpieczone w bezbarwnej folii oraz skanowane na skanerze.

Stężenie kwasu nukleinowego, z wolną grupą OH, oznaczałam na podstawie pomiarów absorpcji przy długości fali $\lambda = 260 \text{ nm}$.

VI.5. Pomiary termodynamiczne oraz krzywe topnienia przy 295 nm

Bufory stosowane do topnień:

A

10 mM fosforan sodu, 0.1 mM Na_2EDTA

150 mM NaCl, 10 mM fosforan sodu, 0.1 mM Na_2EDTA

1 M NaCl, 20 mM kakodylan sodu, 0.1 mM Na_2EDTA

B

150 mM KCl, 10 mM fosforan potasu, 0.1 mM Na_2EDTA

Trwałość termodynamiczną cząsteczek RNA analizowałam na spektrofotometrze Beckman DU-640 z termoprogramatorem, wykorzystując metodę topnienia UV. Pomiary trwałości termodynamicznej cząsteczek RNA prowadziłam w świetle UV przy długości fali 260 nm. Zakres temperatur zawierał się w granicach od 5°C do 90°C, a szybkość zmian temperatury wynosiła 1°C/min. Pomiar absorbancji następował co pół minuty. Dla określenia parametrów termodynamicznych stosowałam do dziewięciu stężeń każdego oligomeru w zakresie od 10^{-4} do 10^{-6} M. Badane cząsteczki rozpuszczone były w jednym z trzech podanych wyżej buforów (A) i umieszczone w trzech kuwetach kwarcowych o pojemności 30 μl , 150 μl oraz 300 μl i o drodze optycznej odpowiednio 0,1 cm, 0,5 cm i 1 cm. Do pomiaru wzorcowego stosowałam taki sam bufor w jakim przygotowywałam badane próbki. Próbki w każdej kuwecie były umieszczone pod warstwą oleju, ogrzane do temperatury 90°C, a następnie, w celu usunięcia bąbelków powietrza, kuwety były

wirowane. Po zakończonym pomiarze roztwory oligomerów rozcieńczałam w każdej z kuwet oddzielnie, aby uzyskać dziewięć różnych stężeń. Przykładowy protokół rozcieńczenia oligomeru został przedstawiony na rysunku 231.

	Sequence		Abs. (80C) in water	Volume (ml)	Dilution	# OD	Ext. Coeff	# Mol	Abs. (20C) in buffer
RNA	GCGGCGGC		7,790	0,5	2	7,8	71200	1,09E-07	
RNA	GCGGCGGC		7,790	0,5	2	7,8	71200	1,1E-07	
	RNA 8MER			$\epsilon_{260} =$	71200				
					E5		E5		
Conc. #	Conc. (M)	Path (cm)	Th. Abs	Volume (ul)	# Mol	Vol. Stock A (ul)	Vol. Stock B (ul)	Vol. Prevs. (ul)	Vol. Buffer (ul)
1	2,4E-04	0,100	1,70	30	7,163E-09	16,37	16,37	Dry Down	30
2	1,5E-04	0,100	1,06	30	4,483E-09			18,77	11,23
3	9,4E-05	0,100	0,67	30	2,805E-09			18,77	11,23
4	5,9E-05	0,500	2,08	150	8,778E-09	20,06	20,06	Dry Down	150
5	3,7E-05	0,500	1,30	150	5,494E-09			93,87	56,13
6	2,3E-05	0,500	0,82	150	3,438E-09			93,87	56,13
7	1,4E-05	1,000	1,02	300	4,303E-09	9,83	9,83	Dry Down	300
8	9,0E-06	1,000	0,64	300	2,693E-09			187,75	112,25
9	5,6E-06	1,000	0,40	300	1,685E-09			187,75	112,25

Rys. 231. Przykładowy protokół rozcieńczeń stosowany w eksperymentach topnienia UV

Z analizy krzywych topnień oligomerów w programie MeltWin 3.5 uzyskiwałam takie parametry termodynamiczne jak entalpię (ΔH°), entropię (ΔS°) oraz energię swobodną (ΔG°).

Krzywa topnienia potwierdzająca powstawanie kwadrupleksu rejestrowana była przy długości fali 295 nm w obecności buforu potasowego -150 mM KCl (B) lub buforu sodowego -150 mM NaCl.

VI.6. Absorpcyjne widma różnicowe (TDS)

Widma TDS otrzymałam przy użyciu spektrofotometru UV/VIS Beckman DU 640 poprzez rejestrację widm UV (zakres fal 200 nm - 350 nm, pomiar co 0.1 nm) w dwóch różnych temperaturach: poniżej oraz powyżej temperatury topnienia dla kwasów nukleinowych. Widmo, które otrzymuje się w wyniku ich odjęcia nosi nazwę absorpcyjnego widma różnicowego (TDS).

Do pomiaru stosowałam stężenia RNA rzędu 10^{-6} - 10^{-4} M. Widma analizowałam za pomocą oprogramowania Origin 8. W celu porównania widm pasmo występujące przy ~ 280 nm zostało znormalizowane do wartości 1.

VI.7. Widma dichroizmu kołowego (CD)

Widma dichroizmu kołowego (CD) wykonane zostały przez dr P. Skowronka na spektropolarymetrze Jasco J-810, znajdującym się na Wydziale Chemii UAM w Poznaniu. Do pomiaru (zakres fal 200 nm -350 nm, pomiar co 0.5 nm, 4 zliczenia) stosowano próbki RNA, których absorpcja wynosiła pomiędzy 0.3-1.0. Próbkę przygotowywane były w różnych buforach oraz kuwetach o różnych drogach optycznych. Widma analizowane były za pomocą oprogramowania Origin 8.

Bufory stosowane do przygotowania próbek:

10 mM fosforan sodu, 0.1 mM Na₂EDTA

150 mM NaCl, 10 mM fosforan sodu, 0.1 mM Na₂EDTA

150 mM KCl, 10 mM fosforan potasu, 0.1 mM Na₂EDTA

Stosowane kuwety:



droga optyczna 1 cm



droga optyczna 0.5 cm



droga optyczna 0.1 cm

Widma CD zostały znormalizowane zgodnie ze wzorem:

$$\Delta\epsilon = \theta / (32,980CLN)$$

$$A = \epsilon CL$$

$$\Delta\epsilon = \theta\epsilon / (32,980AN)$$

$\Delta\epsilon$ – molowa różnica absorpcji [$\text{cm}^2 \cdot \text{mmol}^{-1}$]

θ – pierwotna amplituda CD [mdeg]

C – stężenie próbki [mol/litr]

L- grubość kuwety [cm]

N- liczba nukleotydów w RNA

VI.8. Spektrometria mas (MS)

Do sprawdzania poprawności sekwencji otrzymanych oligonukleotydów wykorzystana została spektrometria mas (**MALDI – TOF**). Do analizy oddawano ok. 0.2 OD (~15µl), odsolonej próbki RNA.

Stechiometria kwadrupleksów - ESI-MS

Cząsteczki RNA przed pomiarem były dializowane w obecności 150 mM NH₄OAc oraz dwukrotnie w obecności dejonizowanej wody (Na⁺, K⁺, < 1mg/kg). Następnie, przygotowałam zatężone roztwory 200 mM NH₄OAc oraz 800 µM RNA w formie jednoniciowej w wodzie. Roztwory te służyły do przygotowanie próbek RNA do pomiarów.

Roztwór bazowy

400 µl roztworu 50 µM kwadrupleksu w 150 mM NH₄OAc przygotowałam przez zmieszanie 100 µl 800 µM RNA w formie jednoniciowej z 300 µl 200 mM NH₄OAc. Roztwór był ogrzewany przez

5 minut w temperaturze $\sim 100^{\circ}\text{C}$, następnie schłodzony do temperatury pokojowej i przechowywany w temperaturze 4°C .

Roztwór do pomiarów

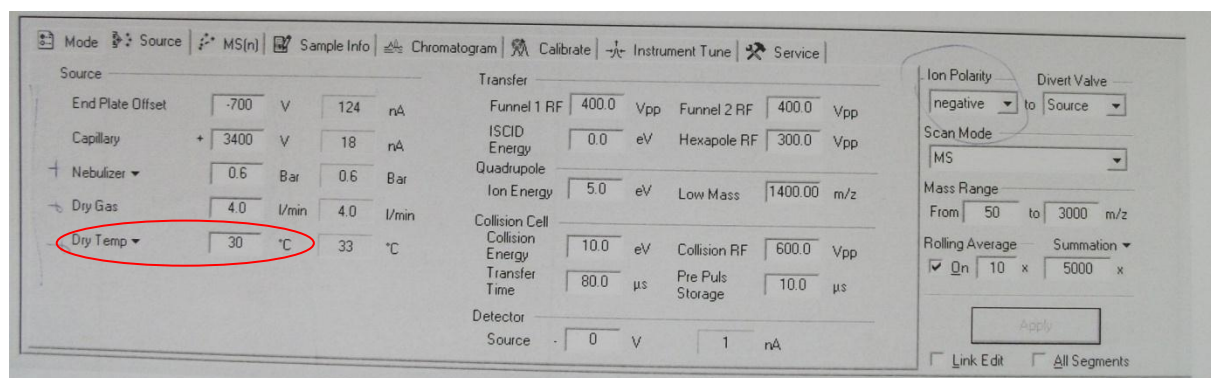
A

Roztwór $5\ \mu\text{M}$ oligonukleotydu np. $(\text{G-C}^{\text{Br}}\text{GGCGG-C})_4$ w obecności metanolu (20%) został przygotowany przez zmieszanie $5\ \mu\text{l}$ $50\ \mu\text{M}$ oligonukleotydu z $35\ \mu\text{l}$ $150\ \text{mM}$ NH_4OAc oraz $10\ \mu\text{l}$ metanolu ($\geq 99,8\%$).

B

Roztwór $70\ \mu\text{M}$ oligonukleotydu np. $(\text{G-C}^{\text{Br}}\text{GGCGG-C})_4$ ($280\ \mu\text{M}$ formy jednoniciowej) w obecności metanolu (20%) został przygotowany przez zmieszanie $17.5\ \mu\text{l}$ $800\ \mu\text{M}$ RNA w formie jednoniciowej z $22.5\ \mu\text{l}$ $333\ \text{mM}$ NH_4OAc oraz $10\ \mu\text{l}$ metanolu ($\geq 99,8\%$).

Na rys. 232 przedstawiłam warunki, w których prowadzony był eksperyment. Kluczowe dla zarejestrowania sygnału od kwadrupleksu okazało się obniżenie temperatury pomiaru z 80°C do 30°C .



Rys. 232. Parametry stosowane do rejestracji widm masowych (ESI-MS); jonizacja poprzez elektrorozpraszanie

VI.9. X-plor

Wstępne obliczenia, na podstawie których zaproponowano model kwadrupleksu zbudowanego z cząsteczki $\text{G-C}^{\text{Me}}\text{GGCGG-C}$ przeprowadziłam za pomocą programu *Xplor-NIH*. Niezbędne dla modyfikacji pola siłowego CHARMM parametry dla 8-metyloguanozyny otrzymałam na podstawie obliczeń programem MOPAC.

VI.10. WAŻNIEJSZA APARATURA

- syntetyzer BioAutomation Corporation MerMade 12
- syntetyzer DNA/RNA firmy Applied Biosystems 392
- aparat do elektroforezy pionowej w ściśle kontrolowanej temperaturze żelu, DNA Pointer System, firmy Kucharczyk
- aparat do elektroforezy pionowej w żelu poliakrylamidowym, firmy Kucharczyk, model MEDIUM
- phosphorimager Typhoon G-8600 – Amersham Pharmacia
- Fluorescent Image Analyzer FLA-5100 – FujiFilm
- licznik scyntylacyjny Beckmann LS5000TA
- spektrofotometr Beckman DU-70 z termoprogramatorem
- LKB Bromma 8300 Uvicord II (monitorowanie elucji oligomerów odsalanych metodą chromatografii kolumnowej)
- pH-metr, firmy Denver Instrument
- instrument HPLC, firmy Waters
- spektrometr NMR: Bruker AVANCE II 400 MHz oraz 600 MHz, Bruker AVANCE III 700 MHz
- spektrometr MALDI – TOF, micro TOF-Q firmy Bruker
- spektrometr CD JASCO J-810

VII. LITERATURA

1. Kiliszek,A., Kierzek,R., Krzyzosiak,W.J. and Rypniewski,W. (2011) Crystal structures of CGG RNA repeats with implications for fragile X-associated tremor ataxia syndrome. *Nucl. Acids Res.*, **39**, 7308-7315.
2. Bukowiecka-Matusiak,M. and Ziemecka,I. Perspektywy stosowania metody blokowej do syntezy modyfikowanych oligonukleotydów w roztworze i na stałym podłożu. *Wiadomości Chemiczne* 63(1-2), 63-83.
3. Adrian,M., Heddi,B. and Phan,A.T. NMR spectroscopy of G-quadruplexes. *Methods*.
4. Matsugami,A., Xu,Y., Noguchi,Y., Sugiyama,H. and Katahira,M. (2007) Structure of a human telomeric DNA sequence stabilized by 8-bromoguanosine substitutions, as determined by NMR in a K⁺ solution. *FEBS Journal*, **274**, 3545-3556.
5. Neidle,S. Principles of Nucleic Acid Structure. 28. 2010.
6. Webba da Silva,M. (2007) NMR methods for studying quadruplex nucleic acids. *Methods*, **43**, 264-277.
7. Virgilio,A., Esposito,V., Randazzo,A., Mayol,L. and Galeone,A. (2005) 8-Methyl-2'-deoxyguanosine incorporation into parallel DNA quadruplex structures. *Nucl. Acids Res.*, **33**, 6188-6195.
8. Schneider,B., Morávek,Z. and Berman,H.M. (2004) RNA conformational classes. *Nucl. Acids Res.*, **32**, 1666-1677.
9. Jeffrey,G.A. and Saenger,W. Hydrogen Bonding in Biological Structures. Springer-Verlag . 2010.
10. Auffinger,P. and Westhof,E. (1997) Rules governing the orientation of the 2'-hydroxyl group in RNA. *Journal of Molecular Biology*, **274**, 54-63.
11. Auffinger,P. and Westhof,E. (2000) Water and ion binding around RNA and DNA (C,G) oligomers. *Journal of Molecular Biology*, **300**, 1113-1131.
12. Dock-Bregeon,A.C., Chevrier,B., Podjarny,A., Johnson,J., de Bear,J.S., Gough,G.R., Gilham,P.T. and Moras,D. (1989) Crystallographic structure of an RNA helix: [U(UA)₆A]₂. *Journal of Molecular Biology*, **209**, 459-474.
13. Randazzo,A., Esposito,V., Ohlenschlager,O., Ramachandran,R. and Mayol,L. (2004) NMR solution structure of a parallel LNA quadruplex. *Nucl. Acids Res.*, **32**, 3083-3092.
14. Krishnan-Ghosh,Y., Stephens,E. and Balasubramanian,S. (2004) A PNA₄ Quadruplex. *Journal of the American Chemical Society*, **126**, 5944-5945.
15. Saccá,B., Lacroix,L. and Mergny,J.L. (2005) The effect of chemical modifications on the thermal stability of different G-quadruplex-forming oligonucleotides. *Nucl. Acids Res.*, **33**, 1182-1192.
16. Zhang,D.H., Fujimoto,T., Saxena,S., Yu,H.Q., Miyoshi,D. and Sugimoto,N. (2010) Monomorphic RNA G-Quadruplex and Polymorphic DNA G-Quadruplex Structures Responding to Cellular Environmental Factors. *Biochemistry*, **49**, 4554-4563.
17. Mashima,T., Matsugami,A., Nishikawa,F., Nishikawa,S. and Katahira,M. (2009) Unique quadruplex structure and interaction of an RNA aptamer against bovine prion protein. *Nucl. Acids Res.*, **37**, 6249-6258.
18. Martadinata,H. and Phan,A.T.é. (2009) Structure of Propeller-Type Parallel-Stranded RNA G-Quadruplexes, Formed by Human Telomeric RNA Sequences in K⁺ Solution. *Journal of the American Chemical Society*, **131**, 2570-2578.

19. Randazzo,A., Esposito,V., Ohlenschlager,O., Ramachandran,R. and Mayol,L. (2004) NMR solution structure of a parallel LNA quadruplex. *Nucl. Acids Res.*, **32**, 3083-3092.
20. Liu,H., Matsugami,A., Katahira,M. and Uesugi,S. (2002) A Dimeric RNA Quadruplex Architecture Comprised of Two G:G(:A):G:G(:A) Hexads, G:G:G:G Tetrads and UUUU Loops. *Journal of Molecular Biology*, **322**, 955-970.
21. Cheong,C. and Moore,P.B. (1992) Solution structure of an unusually stable RNA tetraplex containing G- and U-quartet structures. *Biochemistry*, **31**, 8406-8414.
22. Collie,G.W., Haider,S.M., Neidle,S. and Parkinson,G.N. (2010) A crystallographic and modelling study of a human telomeric RNA (TERRA) quadruplex. *Nucl. Acids Res.*, **38**, 5569-5580.
23. Pan,B., Shi,K. and Sundaralingam,M. (2006) Crystal Structure of an RNA Quadruplex Containing Inosine Tetrad: Implications for the Roles of NH₂ Group in Purine Tetrads. *Journal of Molecular Biology*, **363**, 451-459.
24. Pan,B., Shi,K. and Sundaralingam,M. (2006) Base-tetrad swapping results in dimerization of RNA quadruplexes: Implications for formation of the i-motif RNA octaplex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 3130-3134.
25. Pan,B., Xiong,Y., Shi,K., Deng,J. and Sundaralingam,M. Crystal Structure of an RNA Purine-Rich Tetraplex Containing Adenine Tetrads: Implications for Specific Binding in RNA Tetraplexes. *Structure (London, England : 1993)* 11(7), 815-823. 7-1-2003.
26. Pan,B., Xiong,Y., Shi,K. and Sundaralingam,M. An Eight-Stranded Helical Fragment in RNA Crystal Structure: Implications for Tetraplex Interaction. *Structure (London, England : 1993)* 11(7), 825-831. 7-1-2003.
27. Pan,B., Xiong,Y., Shi,K. and Sundaralingam,M. Crystal Structure of a Bulged RNA Tetraplex at 1.1 Å Resolution: Implications for a Novel Binding Site in RNA Tetraplex. *Structure (London, England : 1993)* 11(11), 1423-1430. 11-1-2003.
28. Deng,J., Xiong,Y. and Sundaralingam,M. (2001) X-ray analysis of an RNA tetraplex (UGGGGU)₄ with divalent Sr²⁺ ions at subatomic resolution (0.61 Å). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**, 13665-13670.
29. Kettani,A., Bouaziz,S., Gorin,A., Zhao,H., Jones,R.A. and Patel,D.J. (1998) Solution structure of a Na cation stabilized DNA quadruplex containing G:G:G:G and G:C:G:C tetrads formed by G-G-G-C repeats observed in adeno-associated viral DNA. *Journal of Molecular Biology*, **282**, 619-636.
30. Schultze,P., Smith,F.W. and Feigon,J. (1994) Refined solution structure of the dimeric quadruplex formed from the Oxytricha telomeric oligonucleotide d(GGGGTTTTGGGG). *Structure*, **2**, 221-233.
31. Wang,Y. and Patel,D.J. (1992) Guanine residues in d(T2AG3) and d(T2G4) form parallel-stranded potassium cation stabilized G-quadruplexes with anti glycosidic torsion angles in solution. *Biochemistry*, **31**, 8112-8119.
32. Wang,Y. and Patel,D.J. Solution structure of the human telomeric repeat d[AG3(T2AG3)3] G-tetraplex. *Structure (London, England : 1993)* 1(4), 263-282. 12-15-1993.
33. Tran,P.L.T., Mergny,J.L. and Alberti,P. Stability of telomeric G-quadruplexes. *Nucl. Acids Res.*
34. Parkinson,G.N., Lee,M.P.H. and Neidle,S. (2002) Crystal structure of parallel quadruplexes from human telomeric DNA. *Nature*, **417**, 876-880.
35. Zhang,N., Gorin,A., Majumdar,A., Kettani,A., Chernichenko,N., Skripkin,E. and Patel,D.J. (2001) V-shaped scaffold: a new architectural motif identified in an A·(G·G·G·G) pentad-containing dimeric

- DNA quadruplex involving stacked G(anti)·G(anti)·G(anti)·G(syn) tetrads. *Journal of Molecular Biology*, **311**, 1063-1079.
36. Hud,N.V. and Plavec,J. The role of cations in determining quadruplex structure and stability. *Quadruplex Nucleic Acids* , 100-130. 2006. Cambridge,, UK.
 37. Bouaziz,S., Kettani,A. and Patel,D.J. (1998) A K cation-induced conformational switch within a loop spanning segment of a DNA quadruplex containing G-G-G-C repeats. *Journal of Molecular Biology*, **282**, 637-652.
 38. Parkinson,G.N. (2006) Fundamentals of Quadruplex Structures. In Neidle,S. and Balasubramanian,S. (eds.), *Quadruplex Nucleic Acids*. The Royal Society of Chemistry, pp. 1-30.
 39. Gros,J., Rosu,F., Amrane,S., De Cian,A., Gabelica,V., Lacroix,L. and Mergny,J.L. (2007) Guanines are a quartet's best friend: impact of base substitutions on the kinetics and stability of tetramolecular quadruplexes. *Nucl. Acids Res.*, **35**, 3064-3075.
 40. Miller,M.C., Buscaglia,R., Chaires,J.B., Lane,A.N. and Trent,J.O. (2010) Hydration Is a Major Determinant of the G-Quadruplex Stability and Conformation of the Human Telomere 3'- Sequence of d(AG3(TTAG3)3). *Journal of the American Chemical Society*, **132**, 17105-17107.
 41. Xue,Y., Kan,Z.y., Wang,Q., Yao,Y., Liu,J., Hao,Y.h. and Tan,Z. (2007) Human Telomeric DNA Forms Parallel-Stranded Intramolecular G-Quadruplex in K⁺ Solution under Molecular Crowding Condition. *Journal of the American Chemical Society*, **129**, 11185-11191.
 42. Renčiuk,D., Kejnovská,I., Školáková,P., Bednářová,K., Motlová,J. and Vorlíčková,M. (2009) Arrangements of human telomere DNA quadruplex in physiologically relevant K⁺ solutions. *Nucl. Acids Res.*, **37**, 6625-6634.
 43. Zhang,D.H. and Zhi,G.Y. (2010) Structure monomorphism of RNA G-quadruplex that is independent of surrounding condition. *Journal of Biotechnology*, **150**, 6-10.
 44. Hazel,P., Huppert,J., Balasubramanian,S. and Neidle,S. (2004) Loop-Length-Dependent Folding of G-Quadruplexes. *Journal of the American Chemical Society*, **126**, 16405-16415.
 45. Smirnov,I. and Shafer,R.H. (2000) Effect of Loop Sequence and Size on DNA Aptamer Stability. *Biochemistry*, **39**, 1462-1468.
 46. Hazel,P., Huppert,J., Balasubramanian,S. and Neidle,S. (2004) Loop-Length-Dependent Folding of G-Quadruplexes. *Journal of the American Chemical Society*, **126**, 16405-16415.
 47. Bourdoncle,A., Est+ève Torres,A., Gosse,C., Lacroix,L., Vekhoff,P., Le Saux,T., Jullien,L. and Mergny,J.L. (2006) Quadruplex-Based Molecular Beacons as Tunable DNA Probes. *Journal of the American Chemical Society*, **128**, 11094-11105.
 48. Guédin,A., Gros,J., Alberti,P. and Mergny,J.L. (2010) How long is too long? Effects of loop size on G-quadruplex stability. *Nucl. Acids Res.*, **38**, 7858-7868.
 49. Guédin,A., De Cian,A., Gros,J., Lacroix,L. and Mergny,J.L. (2008) Sequence effects in single-base loops for quadruplexes. *Biochimie*, **90**, 686-696.
 50. Rachwal,P.A., Findlow,I.S., Werner,J.M., Brown,T. and Fox,K.R. (2007) Intramolecular DNA quadruplexes with different arrangements of short and long loops. *Nucl. Acids Res.*, **35**, 4214-4222.
 51. Kettani,A., Basu,G., Gorin,A., Majumdar,A., Skripkin,E. and Patel,D.J. (2000) A two-stranded template-based approach to G·(C-A) triad formation: designing novel structural elements into an existing DNA framework. *Journal of Molecular Biology*, **301**, 129-146.

52. Kuryavyi,V., Kettani,A., Wang,W., Jones,R. and Patel,D.J. (2000) A diamond-shaped zipper-like DNA architecture containing triads sandwiched between mismatches and tetrads. *Journal of Molecular Biology*, **295**, 455-469.
53. Kuryavyi,V., Majumdar,A., Shallop,A., Chernichenko,N., Skripkin,E., Jones,R. and Patel,D.J. (2001) A double chain reversal loop and two diagonal loops define the architecture of unimolecular DNA quadruplex containing a pair of stacked G(syn).G(syn).G(anti).G(anti) tetrads flanked by a G.(T-T) triad and a T.T.T triple. *Journal of Molecular Biology*, **310**, 181-194.
54. Viglasky,V., Bauer,L., Tluckova,K. and Javorsky,P. Evaluation of human telomeric G-quadruplexes: the influence of overhanging sequences on quadruplex stability and folding. 2010.
55. Arora,A., Nair,D.R. and Maiti,S. (2009) Effect of flanking bases on quadruplex stability and Watson-Crick duplex competition. *FEBS Journal*, **276**, 3628-3640.
56. Zhang,N., Gorin,A., Majumdar,A., Kettani,A., Chernichenko,N., Skripkin,E. and Patel,D.J. (2001) Dimeric DNA quadruplex containing major groove-aligned A·T·A·T and G·C·G·C tetrads stabilized by inter-subunit Watson-Crick A·T and G·C pairs. *Journal of Molecular Biology*, **312**, 1073-1088.
57. Amrane,S., Ang,R.W.L., Tan,Z.M., Li,C., Lim,J.K.C., Lim,J.M.W., Lim,K.W. and Phan,A.T. (2009) A novel chair-type G-quadruplex formed by a Bombyx mori telomeric sequence. *Nucl. Acids Res.*, **37**, 931-938.
58. Kelly,J.A., Feigon,J. and Yeates,T.O. (1996) Reconciliation of the X-ray and NMR Structures of the Thrombin-Binding Aptamer d(GGTTGGTGTGGTGG). *Journal of Molecular Biology*, **256**, 417-422.
59. Lim,K.W., Amrane,S., Bouaziz,S., Xu,W., Mu,Y., Patel,D.J., Luu,K.N. and Phan,A.T.é. (2009) Structure of the Human Telomere in K⁺ Solution: A Stable Basket-Type G-Quadruplex with Only Two G-Tetrad Layers. *Journal of the American Chemical Society*, **131**, 4301-4309.
60. Phan,A. and atel,D.J. (2003) Two-Repeat Human Telomeric d(TAGGGTTAGGGT) Sequence Forms Interconverting Parallel and Antiparallel G-Quadruplexes in Solution: Distinct Topologies, Thermodynamic Properties, and Folding/Unfolding Kinetics. *Journal of the American Chemical Society*, **125**, 15021-15027.
61. Burger,A.M., Dai,F., Schultes,C.M., Reszka,A.P., Moore,M.J., Double,J.A. and Neidle,S. (2005) The G-Quadruplex-Interactive Molecule BRACO-19 Inhibits Tumor Growth, Consistent with Telomere Targeting and Interference with Telomerase Function. *Cancer Research*, **65**, 1489-1496.
62. Tauchi,T., Shin-ya,K., Sashida,G., Sumi,M., Okabe,S., Ohyashiki,J.H. and Ohyashiki,K. (2006) Telomerase inhibition with a novel G-quadruplex-interactive agent, telomestatin: in vitro and in vivo studies in acute leukemia. *Oncogene*, **25**, 5719-5725.
63. Izbicka,E., Wheelhouse,R.T., Raymond,E., Davidson,K.K., Lawrence,R.A., Sun,D., Windle,B.E., Hurley,L.H. and Von Hoff,D.D. (1999) Effects of Cationic Porphyrins as G-Quadruplex Interactive Agents in Human Tumor Cells. *Cancer Research*, **59**, 639-644.
64. Weisman-Shomer,P., Cohen,E., Hershco,I., Khateb,S., Wolfovitz-Barchad,O., Hurley,L.H. and Fry,M. (2003) The cationic porphyrin TMPyP4 destabilizes the tetraplex form of the fragile X syndrome expanded sequence d(CGG)n. *Nucl. Acids Res.*, **31**, 3963-3970.
65. Dixon,I.M., Lopez,F., Tejera,A.M., Esteve,J.P., Blasco,M.A., Pratviel,G. and Meunier,B. (2007) A G-Quadruplex Ligand with 10000-Fold Selectivity over Duplex DNA. *Journal of the American Chemical Society*, **129**, 1502-1503.
66. Huppert,J.L. and Balasubramanian,S. Prevalence of quadruplexes in the human genome. *Nucl. Acids Res.*, **33**, 2908-2916.

67. Huppert,J.L. (2008) Hunting G-quadruplexes. *Biochimie*, **90**, 1140-1148.
68. Lipps,H.J. and Rhodes,D. (2009) G-quadruplex structures: in vivo evidence and function. *Trends in Cell Biology*, **19**, 414-422.
69. Paeschke,K., Simonsson,T., Postberg,J., Rhodes,D. and Lipps,H.J. (2005) Telomere end-binding proteins control the formation of G-quadruplex DNA structures in vivo. *Nat Struct Mol Biol*, **12**, 847-854.
70. Schaffitzel,C., Berger,I., Postberg,J., Hanes,J., Lipps,H.J. and Plckthun,A. (2001) In vitro generated antibodies specific for telomeric guanine-quadruplex DNA react with *Stylynychia lemnae* macronuclei. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**, 8572-8577.
71. Granotier,C., Pennarun,G., Riou,L., Hoffschir,F., Gauthier,L.R., De Cian,A., Gomez,D., Mandine,E., Riou,J.F., Mergny,J.L. *et al.* Preferential binding of a G-quadruplex ligand to human chromosome ends. *Nucl. Acids Res.*, **33**, 4182-4190.
72. Eddy,J. and Maizels,N. (2006) Gene function correlates with potential for G4 DNA formation in the human genome. *Nucl. Acids Res.*, **34**, 3887-3896.
73. Johnson,J.E., Cao,K., Ryvkin,P., Wang,L.S. and Johnson,F.B. (2010) Altered gene expression in the Werner and Bloom syndromes is associated with sequences having G-quadruplex forming potential. *Nucl. Acids Res.*, **38**, 1114-1122.
74. Duquette,M.L., Handa,P. and Maizels,M. Intracellular transcription of G-rich DNAs induces formation of G-loops, novel structures containing G4 DNA. *Genes Dev.* 18(13), 1618-1629. 2004.
75. Fry,M. Tetraplex DNA and its interacting proteins. *Frontiers in Bioscience* 12, 4336-4351. 2007.
76. Ribeyre,C., Lopes,J., Boul+e,J.B., Piazza,A., Guedin,A., Zakian,V.A., Mergny,J.L. and Nicolas,A. (2009) The Yeast Pif1 Helicase Prevents Genomic Instability Caused by G-Quadruplex-Forming CEB1 Sequences In Vivo. *PLoS Genet*, **5**, e1000475.
77. Ireson,C.R. and Kelland,L.R. (2006) Discovery and development of anticancer aptamers. *Molecular Cancer Therapeutics*, **5**, 2957-2962.
78. Cahoon,L.A. and Seifert,H.S. (2009) An Alternative DNA Structure Is Necessary for Pilin Antigenic Variation in *Neisseria gonorrhoeae*. *Science*, **325**, 764-767.
79. Makarov,V.L., Hirose,Y. and Langmore,J.P. Long G Tails at Both Ends of Human Chromosomes Suggest a C Strand Degradation Mechanism for Telomere Shortening. *Cell* 88(5), 657-666. 3-7-1997.
80. Griffith,J.D., Comeau,L., Rosenfield,S., Stansel,R.M., Bianchi,A., Moss,H. and de Lange,T. Mammalian Telomeres End in a Large Duplex Loop. *Cell* 97(4), 503-514. 5-14-1999.
81. Patel,D.J., Phan,A.T. and Kuryavyi,V. (2007) Human telomere, oncogenic promoter and 5'-UTR G-quadruplexes: diverse higher order DNA and RNA targets for cancer therapeutics. *Nucl. Acids Res.*, **35**, 7429-7455.
82. Wang,Y. and Patel,D.J. Solution structure of the *Tetrahymena* telomeric repeat d(T2G4)₄ G-tetraplex. *Structure* (London, England : 1993) 2(12), 1141-1156. 12-1-1994.
83. Sun,D., Thompson,B., Cathers,B.E., Salazar,M., Kerwin,S.M., Trent,J.O., Jenkins,T.C., Neidle,S. and Hurley,L.H. (1997) Inhibition of Human Telomerase by a G-Quadruplex-Interactive Compound. *Journal of Medicinal Chemistry*, **40**, 2113-2116.
84. Han,H. and Hurley,L.H. (2000) G-quadruplex DNA: a potential target for anti-cancer drug design. *Trends in Pharmacological Sciences*, **21**, 136-142.

85. Paeschke,K., Juranek,S., Simonsson,T., Hempel,A., Rhodes,D. and Lipps,H.J. (2008) Telomerase recruitment by the telomere end binding protein-[beta] facilitates G-quadruplex DNA unfolding in ciliates. *Nat Struct Mol Biol*, **15**, 598-604.
86. Lei,M., Podell,E.R., Baumann,P. and Cech,T.R. (2003) DNA self-recognition in the structure of Pot1 bound to telomeric single-stranded DNA. *Nature*, **426**, 198-203.
87. Azzalin,C.M., Reichenbach,P., Khoriantuli,L., Giulotto,E. and Lingner,J. (2007) Telomeric Repeat-Containing RNA and RNA Surveillance Factors at Mammalian Chromosome Ends. *Science*, **318**, 798-801.
88. Xu,Y., Kaminaga,K. and Komiyama,M. (2008) G-Quadruplex Formation by Human Telomeric Repeats-Containing RNA in Na⁺ Solution. *Journal of the American Chemical Society*, **130**, 11179-11184.
89. Redon,S., Reichenbach,P. and Lingner,J. (2010) The non-coding RNA TERRA is a natural ligand and direct inhibitor of human telomerase. *Nucl. Acids Res.*, **38**, 5797-5806.
90. Boul-Elia,F., Murchie,A.I.H. and Lilley,D.M.J. (1992) NMR study of parallel-stranded tetraplex formation by the hexadeoxynucleotide d(TG4T). *Nature*, **360**, 280-282.
91. Laughlan,G., Murchie,A.I., Norman,D.G., Moore,M.H., Moody,P.C., Lilley,D.M. and Luisi,B. (1994) The high-resolution crystal structure of a parallel-stranded guanine tetraplex. *Science*, **265**, 520-524.
92. Kimura,T., Xu,Y. and Komiyama,M. (2009) Human telomeric RNA r(UAGGGU) sequence forms parallel tetraplex structure with U-quartet. *Nucleic Acids Symposium Series*, **53**, 239-240.
93. Xu,Y., Ishizuka,T., Kimura,T. and Komiyama,M. (2010) A U-Tetrad Stabilizes Human Telomeric RNA G-Quadruplex Structure. *Journal of the American Chemical Society*, **132**, 7231-7233.
94. Pradhan,D., Hansen,L.H., Vester,B. and Petersen,M. (2011) Selection of G-Quadruplex Folding Topology with LNA-Modified Human Telomeric Sequences in K⁺ Solution. *Chem. Eur. J.*, **17**, 2405-2413.
95. Phan,A., Modi,Y.S. and Patel,D.J. (2004) Two-repeat Tetrahymena Telomeric d(TGGGGTTGGGGT) Sequence Interconverts Between Asymmetric Dimeric G-quadruplexes in Solution. *Journal of Molecular Biology*, **338**, 93-102.
96. Haider,S.M., Parkinson,G.N. and Neidle,S. (2003) Structure of a G-quadruplex-Ligand Complex. *Journal of Molecular Biology*, **326**, 117-125.
97. Zhang,N., Phan,A. and Patel,D.J. (2005) (3+1) Assembly of Three Human Telomeric Repeats into an Asymmetric Dimeric G-Quadruplex. *Journal of the American Chemical Society*, **127**, 17277-17285.
98. Luu,K.N., Phan,A.T., Kuryavyi,V., Lacroix,L. and Patel,D.J. (2006) Structure of the Human Telomere in K⁺ Solution: An Intramolecular (3 + 1) G-Quadruplex Scaffold. *Journal of the American Chemical Society*, **128**, 9963-9970.
99. Phan,A.T., Luu,K.N. and Patel,D.J. Different loop arrangements of intramolecular human telomeric (3+1) G-quadruplexes in K⁺ solution. *Nucl. Acids Res.*, **34**, 5715-5719.
100. Phan,A., Kuryavyi,V., Luu,K.N. and Patel,D.J. (2007) Structure of two intramolecular G-quadruplexes formed by natural human telomere sequences in K⁺ solution. *Nucl. Acids Res.*, **35**, 6517-6525.
101. Ambrus,A., Chen,D., Dai,J., Bialis,T., Jones,R.A. and Yang,D. Human telomeric sequence forms a hybrid-type intramolecular G-quadruplex structure with mixed parallel/antiparallel strands in potassium solution. *Nucl. Acids Res.*, **34**, 2723-2735.

102. Lim,K.W., Alberti,P., Gu+ędin,A., Lacroix,L., Riou,J.F., Royle,N.J., Mergny,J.L. and Phan,A.T. (2009) Sequence variant (CTAGGG)_n in the human telomere favors a G-quadruplex structure containing a G·C·G·C tetrad. *Nucl. Acids Res.*, **37**, 6239-6248.
103. Seenisamy,J., Bashyam,S., Gokhale,V., Vankayalapati,H., Sun,D., Siddiqui-Jain,A., Streiner,N., Shinya,K., White,E., Wilson,W.D. *et al.* (2005) Design and Synthesis of an Expanded Porphyrin That Has Selectivity for the c-MYC G-Quadruplex Structure. *Journal of the American Chemical Society*, **127**, 2944-2959.
104. Yang,D. and Hurley,L.H. (2006) Structure of the Biologically Relevant G-Quadruplex in the c-MYC Promoter. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, **25**, 951-968.
105. Sun,D., Guo,K., Rusche,J.J. and Hurley,L.H. Facilitation of a structural transition in the polypurine/polypyrimidine tract within the proximal promoter region of the human VEGF gene by the presence of potassium and G-quadruplex-interactive agents. *Nucl. Acids Res.*, **33**, 6070-6080.
106. Guo,K., Pourpak,A., Beetz-Rogers,K., Gokhale,V., Sun,D. and Hurley,L.H. (2007) Formation of Pseudosymmetrical G-Quadruplex and i-Motif Structures in the Proximal Promoter Region of the RET Oncogene. *Journal of the American Chemical Society*, **129**, 10220-10228.
107. Cogoi,S. and Xodo,L.E. (2006) G-quadruplex formation within the promoter of the KRAS proto-oncogene and its effect on transcription. *Nucl. Acids Res.*, **34**, 2536-2549.
108. Dexheimer,T.S., Sun,D. and Hurley,L.H. (2006) Deconvoluting the Structural and Drug-Recognition Complexity of the G-Quadruplex-Forming Region Upstream of the bcl-2 P1 Promoter. *Journal of the American Chemical Society*, **128**, 5404-5415.
109. Dai,J., Dexheimer,T.S., Chen,D., Carver,M., Ambrus,A., Jones,R.A. and Yang,D. (2006) An Intramolecular G-Quadruplex Structure with Mixed Parallel/Antiparallel G-Strands Formed in the Human BCL-2 Promoter Region in Solution. *Journal of the American Chemical Society*, **128**, 1096-1098.
110. Rankin,S., Reszka,A.P., Huppert,J., Zloh,M., Parkinson,G.N., Todd,A.K., Ladame,S., Balasubramanian,S. and Neidle,S. (2005) Putative DNA Quadruplex Formation within the Human c-kit Oncogene. *Journal of the American Chemical Society*, **127**, 10584-10589.
111. Qin,Y., Rezler,E.M., Gokhale,V., Sun,D. and Hurley,L.H. (2007) Characterization of the G-quadruplexes in the duplex nuclease hypersensitive element of the PDGF-A promoter and modulation of PDGF-A promoter activity by TMPyP4. *Nucl. Acids Res.*, **35**, 7698-7713.
112. De Armond,R., Wood,S., Sun,D., Hurley,L.H. and Ebbinghaus,S.W. (2005) Evidence for the Presence of a Guanine Quadruplex Forming Region within a Polypurine Tract of the Hypoxia Inducible Factor 1alpha Promoter. *Biochemistry*, **44**, 16341-16350.
113. Balasubramanian,S., Hurley,L.H. and Neidle,S. (2011) Targeting G-quadruplexes in gene promoters: a novel anticancer strategy? *Nat Rev Drug Discov*, **10**, 261-275.
114. Phan,A.T., Modi,Y.S. and Patel,D.J. (2004) Propeller-Type Parallel-Stranded G-Quadruplexes in the Human c-myc Promoter. *Journal of the American Chemical Society*, **126**, 8710-8716.
115. Ambrus,A., Chen,D., Dai,J., Jones,R.A. and Yang,D. (2005) Solution Structure of the Biologically Relevant G-Quadruplex Element in the Human c-MYC Promoter. Implications for G-Quadruplex Stabilization. *Biochemistry*, **44**, 2048-2058.
116. Phan,A.T., Kuryavyi,V., Gaw,H.Y. and Patel,D.J. (2005) Small-molecule interaction with a five-guanine-tract G-quadruplex structure from the human MYC promoter. *Nat Chem Biol*, **1**, 167-173.

117. Phan,A.T., Kuryavyi,V., Burge,S., Neidle,S. and Patel,D.J. (2007) Structure of an Unprecedented G-Quadruplex Scaffold in the Human c-kit Promoter. *Journal of the American Chemical Society*, **129**, 4386-4392.
118. Kuryavyi,V., Phan,A.T. and Patel,D.J. (2010) Solution structures of all parallel-stranded monomeric and dimeric G-quadruplex scaffolds of the human c-kit2 promoter. *Nucl. Acids Res.*, **38**, 6757-6773.
119. Dai,J., Chen,D., Jones,R.A., Hurley,L.H. and Yang,D. NMR solution structure of the major G-quadruplex structure formed in the human BCL2 promoter region. *Nucl. Acids Res.*, **34**, 5133-5144.
120. Kuryavyi,V. and Patel,D.J. Solution Structure of a Unique G-Quadruplex Scaffold Adopted by a Guanosine-Rich Human Intronic Sequence. *Structure* (London, England : 1993) **18**(1), 73-82. 1-13. 2010.
121. Kumari,S., Bugaut,A., Huppert,J.L. and Balasubramanian,S. (2007) An RNA G-quadruplex in the 5' UTR of the NRAS proto-oncogene modulates translation. *Nat Chem Biol*, **3**, 218-221.
122. Bugaut,A., Rodriguez,R., Kumari,S., Hsu,S.T.D. and Balasubramanian,S. (2010) Small molecule-mediated inhibition of translation by targeting a native RNAG-quadruplex. *Org. Biomol. Chem.*, **8**, 2771-2776.
123. Gomez,D., Guédin,A., Mergny,J.L., Salles,B., Riou,J.F., Teulade-Fichou,M.P. and Calsou,P. (2010) A G-quadruplex structure within the 5'-UTR of TRF2 mRNA represses translation in human cells. *Nucl. Acids Res.*, **38**, 7187-7198.
124. Beaudoin,J.D. and Perreault,J.P. (2010) 5'-UTR G-quadruplex structures acting as translational repressors. *Nucl. Acids Res.*, **38**, 7022-7036.
125. Shahid,R., Bugaut,A. and Balasubramanian,S. (2010) The BCL-2 5' Untranslated Region Contains an RNA G-Quadruplex-Forming Motif That Modulates Protein Expression. *Biochemistry*, **49**, 8300-8306.
126. Viladoms,J., Escaja,N., Frieden,M., Gomez-Pinto,I., Pedroso,E. and Gonzalez,C. (2009) Self-association of short DNA loops through minor groove C:G:G:C tetrads. *Nucl. Acids Res.*, **37**, 3264-3275.
127. Escaja,N., Gomez-Pinto,I., Pedroso,E. and Gonzalez,C. (2007) Four-Stranded DNA Structures Can Be Stabilized by Two Different Types of Minor Groove G:C:G:C Tetrads. *Journal of the American Chemical Society*, **129**, 2004-2014.
128. Patel,P.K., Koti,A.S.R. and Hosur,R.V. (1999) NMR studies on truncated sequences of human telomeric DNA: Observation of a novel A-tetrad. *Nucl. Acids Res.*, **27**, 3836-3843.
129. Patel,P.K. and Hosur,R.V. (1999) NMR observation of T-tetrads in a parallel stranded DNA quadruplex formed by *Saccharomyces cerevisiae* telomere repeats. *Nucl. Acids Res.*, **27**, 2457-2464.
130. Patel,P.K., Bhavesh,N.S. and Hosur,R.V. (2000) Cation-Dependent Conformational Switches in d-TGGCGGC Containing Two Triplet Repeats of Fragile X Syndrome: NMR Observations. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **278**, 833-838.
131. Patel,P.K., Bhavesh,N.S. and Hosur,R.V. (2000) NMR Observation of a Novel C-Tetrad in the Structure of the SV40 Repeat Sequence GGGCGG. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **270**, 967-971.
132. Deng,J., Xiong,Y. and Sundaralingam,M. (2001) X-ray analysis of an RNA tetraplex (UGGGGU)₄ with divalent Sr²⁺ ions at subatomic resolution (0.61 Å). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**, 13665-13670.

133. Pan,B., Xiong,Y., Shi,K. and Sundaralingam,M. Crystal Structure of a Bulged RNA Tetraplex at 1.1 Å Resolution: Implications for a Novel Binding Site in RNA Tetraplex. *Structure* (London, England: 1993) **11**(11), 1423-1430. 11-1-2003.
134. Kettani,A., Gorin,A., Majumdar,A., Hermann,T., Skripkin,E., Zhao,H., Jones,R. and Patel,D.J. (2000) A dimeric DNA interface stabilized by stacked A·(G·G·G·G)·A hexads and coordinated monovalent cations. *Journal of Molecular Biology*, **297**, 627-644.
135. Searle,M.S., Williams,H.E.L., Gallagher,C.T., Grant,R.J. and Stevens,M.F.G. (2004) Structure and K⁺ ion-dependent stability of a parallel-stranded DNA quadruplex containing a core A-tetrad. *Org. Biomol. Chem.*, **2**, 810-812.
136. Liu,H., Kugimiya,A., Matsugami,A., Katahira,M. and Uesugi,S. Quadruplex structures of RNA 14-mer, r(GGAGGUUUUGGAGG) and DNA 14-mer, d(GGAGGTTTTGGAGG). *Nucleic Acids Symposium Series*, **2**, 177-178.
137. Lipay,J.M. and Mihailescu,M.R. (2009) NMR spectroscopy and kinetic studies of the quadruplex forming RNA r(UGGAGGU). *Mol. BioSyst.*, **5**, 1347-1355.
138. Phan,A., Kuryavyi,V., Ma,J.B., Faure,A., Andreola,M.L. and Patel,D.J. (2005) An interlocked dimeric parallel-stranded DNA quadruplex: A potent inhibitor of HIV-1 integrase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 634-639.
139. Krishnan-Ghosh,Y., Liu,D. and Balasubramanian,S. (2004) Formation of an Interlocked Quadruplex Dimer by d(GGGT). *Journal of the American Chemical Society*, **126**, 11009-11016.
140. Miyazaki,Y., Irobalieva,R.N., Tolbert,B.S., Smalls-Mantey,A., Iyalla,K., Loeliger,K., D'Souza,V., Khant,H., Schmid,M.F., Garcia,E.L. *et al.* (2010) Structure of a Conserved Retroviral RNA Packaging Element by NMR Spectroscopy and Cryo-Electron Tomography. *Journal of Molecular Biology*, **404**, 751-772.
141. Kettani,A., Kumar,A.R. and Patel,D.J. (1995) Solution Structure of a DNA Quadruplex Containing the Fragile X Syndrome Triplet Repeat. *Journal of Molecular Biology*, **254**, 638-656.
142. Fürtig,B., Richter,C., Wöhnert,J. and Schwalbe,H. (2003) NMR Spectroscopy of RNA. *Chem. Eur. J. of Chem. Bio.*, **4**, 936-962.
143. Webba da Silva,M. (2003) Association of DNA Quadruplexes through G:C:G:C Tetrads. Solution Structure of d(GCGGTGGAT). *Biochemistry*, **42**, 14356-14365.
144. Ghose,R., Marino,J.P., Wiberg,K.B. and Prestegard,J.H. (1994) Dependence of ¹³C Chemical Shifts on Glycosidic Torsional Angles in Ribonucleic Acids. *Journal of the American Chemical Society*, **116**, 8827-8828.
145. Greene,K.L., Wang,Y. and Live,D. (1995) Influence of the glycosidic torsion angle on ¹³C and ¹⁵N shifts in guanosine nucleotides: Investigations of G-tetrad models with alternating syn and anti bases. *Journal of Biomolecular NMR*, **5**, 333-338.
146. Ambrus,A. and Yang,D. (2007) Diffusion-ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy for analysis of DNA secondary structural elements. *Analytical Biochemistry*, **367**, 56-67.
147. Groves,P. and Webba da Silva,M. (2010) Rapid Stoichiometric Analysis of G-Quadruplexes in Solution. *Chem. Eur. J.*, **16**, 6451-6453.
148. Campbell,N.H. and Parkinson,G.N. (2007) Crystallographic studies of quadruplex nucleic acids. *Methods*, **43**, 252-263.

149. Šponer, J. and Špačková, N. (2007) Molecular dynamics simulations and their application to four-stranded DNA. *Methods*, **43**, 278-290.
150. Gray, D.M., Wen, J.D., Gray, C.W., Repges, R., Repges, C., Raabe, G. and Fleischhauer, J. (2008) Measured and calculated CD spectra of G-quartets stacked with the same or opposite polarities. *Chirality*, **20**, 431-440.
151. Mergny, J.L., Li, J., Lacroix, L., Amrane, S. and Chaires, J.B. Thermal difference spectra: a specific signature for nucleic acid structures. *Nucl. Acids Res.*, **33**, e138.
152. Sobczak, K., Michlewski, G., de Mezer, M., Kierzek, E., Krol, J., Olejniczak, M., Kierzek, R. and Krzyzosiak, W.J. (2010) Structural Diversity of Triplet Repeat RNAs. *Journal of Biological Chemistry*, **285**, 12755-12764.
153. Mergny, J.L., Phan, A.T. and Lacroix, L. (1998) Following G-quartet formation by UV-spectroscopy. *FEBS Letters*, **435**, 74-78.
154. Neidle and Balasubramanian, S. *Quadruplex Nucleic Acids*. 2006.
155. Rachwal, P.A. and Fox, K.R. (2007) Quadruplex melting. *Methods*, **43**, 291-301.
156. Lane, A.N., Chaires, J.B., Gray, R.D. and Trent, J.O. (2008) Stability and kinetics of G-quadruplex structures. *Nucl. Acids Res.*, **36**, 5482-5515.
157. Đapić, V., Abdomerović, V., Marrington, R., Peberdy, J., Rodger, A., Trent, J.O. and Bates, P.J. (2003) Biophysical and biological properties of quadruplex oligodeoxyribonucleotides. *Nucl. Acids Res.*, **31**, 2097-2107.
158. Paramasivan, S., Rujan, I. and Bolton, P.H. (2007) Circular dichroism of quadruplex DNAs: Applications to structure, cation effects and ligand binding. *Methods*, **43**, 324-331.
159. Xu, Y., Noguchi, Y. and Sugiyama, H. (2006) The new models of the human telomere d[AGGG(TTAGGG)₃] in K⁺ solution. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **14**, 5584-5591.
160. Joachimi, A., Benz, A. and Hartig, J.r.S. (2009) A comparison of DNA and RNA quadruplex structures and stabilities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **17**, 6811-6815.
161. Kypr, J. and Vorlíčková, M. (2002) Circular dichroism spectroscopy reveals invariant conformation of guanine runs in DNA. *Biopolymers*, **67**, 275-277.
162. Ren, L., Zhang, A., Huang, J., Wang, P., Weng, X., Zhang, L., Liang, F., Tan, Z. and Zhou, X. (2007) Quaternary Ammonium Zinc Phthalocyanine: Inhibiting Telomerase by Stabilizing G quadruplexes and Inducing G-Quadruplex Structure Transition and Formation. *Chem. Eur. J. of Chem. Bio.*, **8**, 775-780.
163. Gabelica, V. (2010) Determination of Equilibrium Association Constants of Ligand-DNA Complexes by Electrospray Mass Spectrometry. *Drug-DNA Interaction Protocols*. pp. 89-101.
164. Rosu, F., Gabelica, V., Poncelet, H. and De Pauw, E. (2010) Tetramolecular G-quadruplex formation pathways studied by electrospray mass spectrometry. *Nucl. Acids Res.*, **38**, 5217-5225.
165. Rosu, F., Gabelica, V., Houssier, C., Colson, P. and Pauw, E.D. (2002) Triplex and quadruplex DNA structures studied by electrospray mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **16**, 1729-1736.
166. Handa, V., Saha, T. and Usdin, K. (2003) The fragile X syndrome repeats form RNA hairpins that do not activate the interferon-inducible protein kinase, PKR, but are cut by Dicer. *Nucl. Acids Res.*, **31**, 6243-6248.

167. Tóth,T., Gáspári,Z. and Jurka,J. (2000) Microsatellites in Different Eukaryotic Genomes: Survey and Analysis. *Genome Research*, **10**, 967-981.
168. Gur-Arie,R., Cohen,C.J., Eitan,Y., Shelef,L., Hallerman,E.M. and Kashi,Y. (2000) Simple Sequence Repeats in Escherichia coli: Abundance, Distribution, Composition, and Polymorphism. *Genome Research*, **10**, 62-71.
169. Kozłowski,P., de Mezer,M. and Krzyżosiak,W.J. (2010) Trinucleotide repeats in human genome and exome. *Nucl. Acids Res.*, **38**, 4027-4039.
170. Wawrocka,A. and Krawczyński,M. Choroby neurodegeneracyjne powodowane przez ekspansję powtórzeń trójnukleotydów. *Nowiny lekarskie* 75(4), 389-393. 2006.
171. Napierala,M. and Krzyżosiak,W.J. (1997) CUG Repeats Present in Myotonin Kinase RNA Form Metastable "Slippery" Hairpins. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 31079-31085.
172. Napierala,M., Michalowski,D., de Mezer,M. and Krzyżosiak,W.J. (2005) Facile FMR1 mRNA structure regulation by interruptions in CGG repeats. *Nucl. Acids Res.*, **33**, 451-463.
173. Hagerman,R.J., Leavitt,B.R., Farzin,F., Jacquemont,S., Greco,C.M., Brunberg,J.A., Tassone,F., Hessler,D., Harris,S.W., Zhang,L. *et al.* Fragile-XAssociated Tremor/Ataxia Syndrome (FXTAS) in Females with the FMR1 Premutation. *American journal of human genetics* 74(5), 1051-1056. 5-1-2004.
174. Krol,J., Fiszer,A., Mykowska,A., Sobczak,K., de Mezer,M. and Krzyżosiak,W.J. Ribonuclease Dicer Cleaves Triplet Repeat Hairpins into Shorter Repeats that Silence Specific Targets. *Molecular cell* 25(4), 575-586. 2-23-2007.
175. Oostra,B.A. and Willemsen,R. (2003) A fragile balance: FMR1 expression levels. *Human Molecular Genetics*, **12**, R249-R257.
176. Melko,M. and Bardoni,B. (2010) The role of G-quadruplex in RNA metabolism: Involvement of FMRP and FMR2P. *Biochimie*, **92**, 919-926.
177. Hagerman,P.J. and Hagerman,R.J. (2007) Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome - an older face of the fragile X gene. *Nat Clin Pract Neuro*, **3**, 107-112.
178. Hagerman,P.J. and Hagerman,R.J. The Fragile-X Premutation: A Maturing Perspective. *American journal of human genetics* 74(5), 805-816. 5-1-2004.
179. Dombrowski,C., Lévesque,S., Morel,M.L., Rouillard,P., Morgan,K. and Rousseau,F. (2002) Premutation and intermediate-size FMR1 alleles in 10 572 males from the general population: loss of an AGG interruption is a late event in the generation of fragile X syndrome alleles. *Human Molecular Genetics*, **11**, 371-378.
180. Jacquemont,S., Hagerman,R.J., Leehey,M., Grigsby,J., Zhang,L., Brunberg,J.A., Greco,C., Des Portes,V., Jardini,T., Levine,R. *et al.* Fragile X Premutation Tremor/Ataxia Syndrome: Molecular, Clinical, and Neuroimaging Correlates. *American journal of human genetics* 72(4), 869-878. 4-1-2003.
181. Kenneson,A., Zhang,F., Hagedorn,C.H. and Warren,S.T. (2001) Reduced FMRP and increased FMR1 transcription is proportionally associated with CGG repeat number in intermediate-length and premutation carriers. *Human Molecular Genetics*, **10**, 1449-1454.
182. Hagerman,R.J. and Hagerman,P.J. (2002) The fragile X premutation: into the phenotypic fold. *Current Opinion in Genetics & Development*, **12**, 278-283.
183. Tassone,F., Hagerman,R.J., Taylor,A.K., Gane,L.W., Godfrey,T.E. and Hagerman,P.J. Elevated Levels of FMR1 mRNA in Carrier Males: A New Mechanism of Involvement in the Fragile-X Syndrome. *American journal of human genetics* 66(1), 6-15.

184. Tassone,F., Hagerman,R.J., Garcia-Arocena,D., Khandjian,E.W., Greco,C.M. and Hagerman,P.J. (2004) Intranuclear inclusions in neural cells with premutation alleles in fragile X associated tremor/ataxia syndrome. *Journal of Medical Genetics*, **41**, 43.
185. Ingham-Hawkins,D.J., Babul-Hirji,R., Chitayat,D., Holden,J.J., Yang,K.T., Lee,C., Hudson,R., Gorwill,H., Nolin,S.L., Glicksman,A. *et al.* (1999) Fragile X premutation is a significant risk factor for premature ovarian failure: The international collaborative POF in fragile X study-preliminary data. *Am. J. Med. Genet.*, **83**, 322-325.
186. Oberle,I., Rousseau,F., Heitz,D., Kretz,C., Devys,D., Hanauer,A., Boue,J., Bertheas,M.F. and Mandel,J.L. (1991) Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science*, **252**, 1097-1102.
187. Pieretti,M., Zhang,F., Fu,Y.H., Warren,S.T., Oostra,B.A., Caskey,C.T. and Nelson,D.L. Absence of expression of the FMR-1 gene in fragile X syndrome. *Cell* 66(4), 817-822. 8-23-1991.
188. Khateb,S., Weisman-Shomer,P., Hershco,I., Loeb,L.A. and Fry,M. (2004) Destabilization of tetraplex structures of the fragile X repeat sequence (CGG)_n is mediated by homolog-conserved domains in three members of the hnRNP family. *Nucl. Acids Res.*, **32**, 4145-4154.
189. Khateb,S., Weisman-Shomer,P., Hershco-Shani,I., Ludwig,A.L. and Fry,M. (2007) The tetraplex (CGG)_n destabilizing proteins hnRNP A2 and CBF-A enhance the in vivo translation of fragile X premutation mRNA. *Nucl. Acids Res.*, **35**, 5775-5788.
190. Ludwig,A.L., Raske,C., Tassone,F., Garcia-Arocena,D., Hershey,J.W. and Hagerman,P.J. (2009) Translation of the FMR1 mRNA is not influenced by AGG interruptions. *Nucl. Acids Res.*, **37**, 6896-6904.
191. Ofer,N., Weisman-Shomer,P., Shklover,J. and Fry,M. (2009) The quadruplex r(CGG)_n destabilizing cationic porphyrin TMPyP4 cooperates with hnRNPs to increase the translation efficiency of fragile X premutation mRNA. *Nucl. Acids Res.*, **37**, 2712-2722.
192. Sobczak,K., de Mezer,M., Michlewski,G., Krol,J. and Krzyzosiak,W.J. (2003) RNA structure of trinucleotide repeats associated with human neurological diseases. *Nucl. Acids Res.*, **31**, 5469-5482.
193. Kumar,A., Fang,P., Park,H., Guo,M., Nettles,K.W. and Disney,M.D. (2011) A Crystal Structure of a Model of the Repeating r(CGG) Transcript Found in Fragile X Syndrome. *Chem. Eur. J. of Chem. Bio.*, **12**, 2140-2142.
194. Zumwalt,M., Ludwig,A., Hagerman,P.J. and Dieckman,T. Secondary Structure and Dynamics of the r(CGG) Repeat in the mRNA of the Fragile X Mental Retardation 1 (FMR1) Gene. *RNA Biology* 4(2), 93-100.
195. Chen,X., Mariappan,S.V. and Catasti,P. (1995) Hairpins are formed by the single DNA strands of the fragile X triplet repeats: structure and biological implications. *Proc.Natl.Acad.Sci.U S A.* 92((11)), 5199-5203.
196. Marquis Gacy,A., Goellner,G., Jurani,N., Macura,S. and McMurray,C.T. (1995) Trinucleotide repeats that expand in human disease form hairpin structures in vitro. *Cell* 81(4), 533-540.
197. Nadel,Y., Weisman-Shomer,P. and Fry,M. (1995) The Fragile X Syndrome Single Strand d(CGG) Nucleotide Repeats Readily Fold Back to Form Unimolecular Hairpin Structures. *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 28970-28977.
198. Fojtik,P., Kejnovska,I. and Vorlickova,M. (2004) The guanine rich fragile X chromosome repeats are reluctant to form tetraplexes. *Nucl. Acids Res.*, **32**, 298-306.

199. Weisman-Shomer,P., Cohen,E. and Fry,M. (2000) Interruption of the fragile X syndrome expanded sequence d(CGG)_n by interspersed d(AGG) trinucleotides diminishes the formation and stability of d(CGG)_n tetrahelical structures. *Nucl. Acids Res.*, **28**, 1535-1541.
200. Usdin,K. (1998) NGG-triplet repeats form similar intrastrand structures: implications for the triplet expansion diseases. *Nucl. Acids Res.*, **26**, 4078-4085.
201. Usdin,K. and Woodford,K.J. (1995) CGG repeats associated with DNA instability and chromosome fragility form structures that block DNA synthesis in vitro. *Nucl. Acids Res.*, **23**, 4202-4209.
202. Chen,F.M. (1995) Acid-facilitated Supramolecular Assembly of G-quadruplexes in d(CGG)₄. *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 23090-23096.
203. Fry,M. and Loeb,L.A. (1994) The fragile X syndrome d(CGG)_n nucleotide repeats form a stable tetrahelical structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**, 4950-4954.
204. Webba da Silva,M. (2005) Experimental Demonstration of T:(G:G:G:G):T Hexad and T:A:A:T Tetrad Alignments within a DNA Quadruplex Stem. *Biochemistry*, **44**, 3754-3764.
205. Broda,M., Kierzek,E., Gdaniec,Z., Kulinski,T. and Kierzek,R. (2005) Thermodynamic Stability of RNA Structures Formed by CNG Trinucleotide Repeats. Implication for Prediction of RNA Structure. *Biochemistry*, **44**, 10873-10882.
206. Tavale,S.S. and Sobell,H.M. (1970) Crystal and molecular structure of 8-bromoguanosine and 8-bromoadenosine, two purine nucleosides in the syn conformation. *Journal of Molecular Biology*, **48**, 109-123.
207. Xu,Y., Ikeda,R. and Sugiyama,H. (2003) 8-Methylguanosine: A Powerful Z-DNA Stabilizer. *Journal of the American Chemical Society*, **125**, 13519-13524.
208. Shapiro,R. and Agarwal,S.C. (1966) Oxidation of guanine and guanosine by bromine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **24**, 401-405.
209. Hirota,K., Kitade,Y., Kanbe,Y. and Maki,Y. (1992) Convenient method for the synthesis of C-alkylated purine nucleosides: palladium-catalyzed cross-coupling reaction of halogenopurine nucleosides with trialkylaluminums. *J. Org. Chem.*, **57**, 5268-5270.
210. Remin,M. and Shugar,D. (1972) Conformation of the exocyclic 5'-CH₂OH in nucleosides and nucleotides in aqueous solution from specific assignments of the H5', and H5'' signals in the NMR spectra. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **48**, 636-642.
211. Cian,A.D. and Mergny,J.L. (2007) Quadruplex ligands may act as molecular chaperones for tetramolecular quadruplex formation. *Nucl. Acids Res.*, **35**, 2483-2493.
212. Mao,H. and Williamson,J.R. (1999) Assignment of the L30-mRNA complex using selective isotopic labeling and RNA mutants. *Nucl. Acids Res.*, **27**, 4059-4070.
213. Sklenar,V., Piotto,M., Leppik,R. and Saudek,V. (1993) Gradient-Tailored Water Suppression for ¹H-¹⁵N HSQC Experiments Optimized to Retain Full Sensitivity. *Journal of Magnetic Resonance, Series A*, **102**, 241-245.
214. Zhang,Z., Dai,J., Veliath,E., Jones,R.A. and Yang,D. (2010) Structure of a two-G-tetrad intramolecular G-quadruplex formed by a variant human telomeric sequence in K⁺ solution: insights into the interconversion of human telomeric G-quadruplex structures. *Nucl. Acids Res.*, **38**, 1009-1021.

215. Proctor,D.J., Kierzek,E., Kierzek,R. and Bevilacqua,P.C. (2003) Restricting the Conformational Heterogeneity of RNA by Specific Incorporation of 8-Bromoguanosine. *Journal of the American Chemical Society*, **125**, 2390-2391.