



Mikromacierze izoenergetyczne, nowa metoda badania struktury RNA

Elżbieta Kierzek, Agata Frątczak

Instytut Chemii Bioorganicznej, Polska Akademia Nauk, Poznań

Isoenergetic microarrays, a new method to study the structure of RNA

Summary

RNA is one of the most important molecule essential for proper functioning of the cell. However, there are a growing number of RNAs for which biological function and structure are not known. Isoenergetic microarrays have been designed and apply as a new method to study the structure and interactions of RNAs. Isoenergetic microarrays are built with short modified RNA probes. The 2'-O-methylated and LNA-modified oligomer probes have been designed in such a way, that the interaction of each probe with its complementary single stranded fragment of target RNA has comparable thermodynamic stability (is isoenergetic). This method was tested and optimized on several native RNAs.

Key words:

microarrays, microarray mapping, isoenergetic microarrays, RNA, LNA, RNA folding, secondary structure, structure prediction, thermodynamic stability.

1. Wprowadzenie

Kwasy rybonukleinowe zbudowane są z pojedynczego łańcucha polinukleotydowego, który fałdując się tworzy, oprócz fragmentów dwuniciowych (helikalnych), rejony jednoniciowe oraz szereg drugo- i trzeciorzędowych motywów strukturalnych takich jak: struktury spinkowe, wybrzuszenia jednostronne i dwustronne, pętle wieloramienne czy pseudowęzły. Ze strukturą RNA nierozzerwalnie związana jest jego funkcja, dlatego w poznaniu jego roli podstawowe jest określenie struktury RNA.

Do badania struktury drugorzędowej cząsteczek RNA powszechnie wykorzystuje się kilka metod. Jedną z nich jest metoda

Adres do korespondencji

Elżbieta Kierzek,
Instytut Chemii
Bioorganicznej,
Polska Akademia Nauk,
ul. Noskowskiego 12/14,
61-704 Poznań.

filogenetyczna, polegająca na porównywaniu sekwencji kilku homologicznych RNA i określaniu wspólnego dla wszystkich schematu oddziaływań drugorzędowych (1,2). Inne podejście oparte jest na przewidywaniu termodynamicznie najtrwalszej struktury RNA, w tym celu wykorzystuje się takie programy komputerowe jak RNA-structure czy Mfold (3,4). Kolejnym sposobem badania struktury RNA są metody mapowania chemicznego i enzymatycznego (5,6). W mapowaniu chemicznym wykorzystuje się zdolność fragmentów jednoniciowych RNA do specyficznego reagowania z określonymi związkami chemicznymi (m. in. DMS, CMCT, ketoksal). Często wykorzystuje się także zdolność niektórych kationów (np. Pb^{2+}) do selektywnego wiązania z fragmentami jednoniciowymi RNA i następczej hydrolizy sąsiadujących wiązań fosfodiesterowych (7). Do mapowania enzymatycznego wykorzystuje się endonukleazy (np. S1, T1, V1), które specyficznie hydrolizują jedno- lub dwuniciowe fragmenty RNA. Strukturę RNA można badać również na poziomie atomowym wykorzystując metody biofizyczne takie jak krystalografia czy spektroskopia NMR. Dostępne metody eksperymentalne dają cenne informacje o strukturze RNA jednakże są bardzo czasochłonne i pracochłonne. W czasach, kiedy w tak ogromnym tempie przybywa nowo odkrytych RNA o nieznanym kształcie i funkcji stają się one niewystarczające. Niezbędne jest zatem poszukiwanie nowych metod pozwalających szybciej i dokładniej określać struktury drugorzędowe cząsteczek RNA. Taką możliwość stwarza metoda mapowania mikromacierzowego.

2. Mapowanie mikromacierzowe jako nowa metoda badania struktury RNA

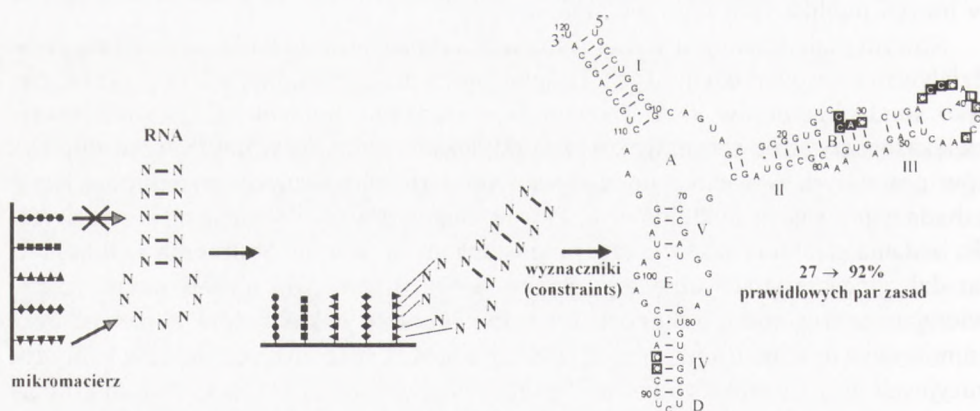
Mikromacierze są bardzo użytecznym narzędziem badania kwasów nukleinowych. Obecność określonych genów czy ich fragmentów może być analizowana za pomocą różnego typu mikromacierzy DNA. Wielorakie aspekty wykorzystania mikromacierzy DNA, zwłaszcza w badaniach biologicznych zostały przedstawione w innych publikacjach tego wolumenu.

Nowym podejściem jest wykorzystanie mikromacierzy do badania struktury i oddziaływań kwasów nukleinowych. Drugim *novum* przedstawionej metody jest użycie jako sond oligomerów RNA. Trzecim, wprowadzenie modyfikacji do sond, które zwiększają trwałość termodynamiczną dupleksów hybrydacyjnych, czyli dupleksów powstałych w wyniku oddziaływań sond zlokalizowanych na mikromacierzy z badanym kwasem nukleinowym. Pewne elementy wykorzystania mikromacierzy do badania struktury RNA zostały przedstawione w pracach Southerna pod koniec lat dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku (8-11). Otrzymywał on mikromacierz zawierającą szereg sond, o długości od 1 do kilkunastu nukleotydów. Ponieważ była to mikromacierz oparta na sondach DNA, trwałość tworzonych dupleksów hybrydacyjnych była stosunkowo niska. Użyteczność uzyskanych w ten sposób mikromacierzy w badaniach strukturalnych była zatem bardzo ograniczona. Przedstawiona przez Southerna idea, jakkolwiek interesująca, wymagała odmiennego podejścia do

tego problemu. Zaproponowane przez naszą grupę badawczą mapowanie mikromacierzowe oparte jest na ogólnej wiedzy o strukturze drugorzędowej RNA i termodynamice dupleksów tworzonych podczas hybrydyzacji.

Analiza struktury drugorzędowej dowolnego RNA pokazuje, że tworzą ją fragmenty jedno- i dwuniciowe. Te ostatnie powstają poprzez oddziaływanie komplementarnych fragmentów jednoniciowych cząsteczki RNA, a zatem nie mogą wiązać się do sondy mikromacierzy. Natomiast fragmenty jednoniciowe RNA mogą wiązać się z komplementarną sondą oligonukleotydową (rys. 1). Ponieważ badany RNA jest fluorescencyjnie lub radioaktywnie wyznakowany to fakt jego wiązania do komplementarnej sondy można łatwo wykryć. Informacja o jednoniciowych fragmentach RNA jest bardzo użyteczna w przewidywaniu struktury drugorzędowej RNA takimi programami jak Mfold i RNAstructure. Wprowadzone do tych programów ograniczenia procesu fałdowania struktury drugorzędowej (tzw. wyznaczniki, ang. *constraints*) RNA powodują, że generowane są jedynie struktury drugorzędowe o najniższej energii swobodnej (ΔG_{37}°), które równocześnie są zgodne z wprowadzonymi danymi eksperymentalnymi (rys. 1).

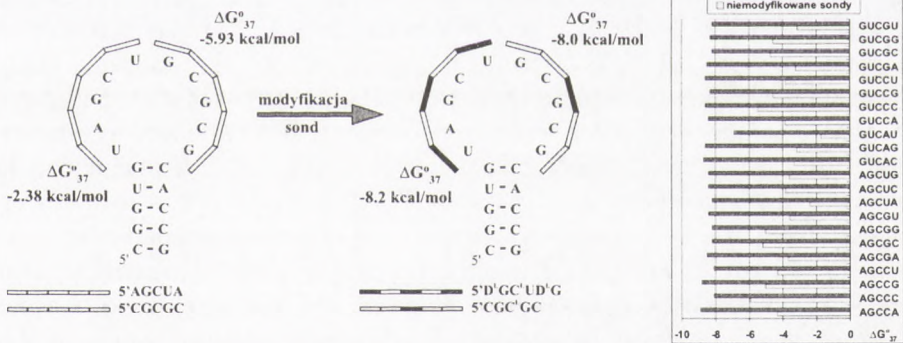
Ponieważ mapowanie mikromacierzowe służy określeniu struktury drugorzędowej RNA istotne jest, aby podczas hybrydyzacji badanego RNA do mikromacierzy nie następowało zaburzenie czy zmiana jego struktury. Analiza struktur drugorzędowych wielu RNA pokazuje, że fragmenty jednoniciowe są krótkie, zwykle 2-10-nukleotydowe, przeciętnie 4-6-nukleotydowe. Należy jednak pamiętać, że nawet we fragmentach jednoniciowych mamy zwykle do czynienia ze słabymi, niekanonicznymi oddziaływaniami zasad czy ich udziałem w oddziaływaniach trzeciorzędowych. Fakt, że fragmenty jednoniciowe w RNA są krótkie oraz założenie, że oddziaływania sondy oligonukleotydowej i jednoniciowego fragmentu nie powinno zaburzać



Rys. 1. Ogólny schemat oddziaływań RNA istotnych dla mapowania mikromacierzowego i przewidywania struktury drugorzędowej RNA.

struktury badanego RNA sprawił, że do mapowania mikromacierzowego użyto krótkich, 5-7-nukleotydowych sond hybrydacyjnych.

Na wstępnym etapie badania prowadzone były na mikromacierzach zawierających sondy 2'-O-metylo-heptanukleotydy (12). Mikromacierze te zostały nazwane nieizoenergetycznymi, w przeciwieństwie do wprowadzonych później i omówionych poniżej mikromacierzy izoenergetycznych. Użycie 2'-O-metylowanych sond oligonukleotydowych sprawiło, że trwałość termodynamiczna tworzonych dupleksów hybrydacyjnych była wyższa niż w przypadku DNA czy RNA (13). Ponadto, chemiczna synteza takich modyfikowanych sond oraz proces ich pozyskania jest tańszy i łatwiejszy. Do badań modelowych został wybrany 5S rRNA z *E. coli*. Struktura drugorzędowa tego RNA generowana programami Mfold czy RNAstructure zawierała jedynie 27% par zasad struktury filogenetycznej 5S rRNA. Zastosowanie w programie RNAstructure danych z mapowania nieizoenergetycznymi mikromacierzami doprowadziło do struktury drugorzędowej 5S rRNA, która zawierała aż 92% zgodności par zasad ze strukturą filogenetyczną (12). Na podstawie tych badań, oprócz wykazania zalet metody mapowania mikromacierzowego, można było również zaobserwować pewne jej niedogodności, które wiązały się z różną trwałością termodynamiczną dupleksów hybrydacyjnych. Najogólniej wiadomo, że sekwencja dupleksu hybrydacyjnego determinuje jego trwałość termodynamiczną. Zostało to zilustrowane na przykładzie modelowej struktury spinkowej RNA (rys. 2). Na schemacie tym przedstawiono równocześnie koncepcję mikromacierzy izoenergetycznych. Jeśli jeden fragment pętli jest bogaty w adenozyne i urydyny, a drugi w cytydyny i guanozyne to dupleks hybrydacyjny bogaty w pary G-C będzie termodynamicznie trwalszy niż dupleks zawierający głównie pary A-U. Obliczone wartości energii swobodnej dla obu dupleksów hybrydacyjnych wynoszą odpowiednio



Rys. 2. Schematyczne przedstawienie oddziaływań mikromacierzy izoenergetycznych z modelową spinką RNA. Przekształcenie sond nieizoenergetycznych (lewa spinka RNA) w sondy izoenergetyczne (prawa spinka RNA) poprzez zastosowanie modyfikowanych nukleotydów. Po prawej stronie diagram, w którym porównano energie swobodne (ΔG_{37}° kcal/mol) fragmentu nieizoenergetycznej (białe słupki) i izoenergetycznej (szare słupki) pentamerowej biblioteki oligonukleotydowej.

– 2,38 i –5,93 kcal/mol. Mimo że sondy oligonukleotydowe mogą utworzyć duplekсы hybrydazyjne z obydwoma komplementarnymi fragmentami pętli RNA, to jednak detekcja duplesu hybrydazyjnego bogatego w pary A-U ($\Delta G_{37}^{\circ} = -2,38$ kcal/mol) jest praktycznie niemożliwa. Powoduje to istotne problemy z interpretacją wyników mapowania mikromacierzowego. Rozwiązaniem tych trudności było stworzenie nowego typu mikromacierzy – mikromacierzy izoenergetycznych. Jak to obrazuje modelowa spinka RNA pokazana na rysunku 2, wprowadzenie w określone pozycje sond modyfikowanych nukleotydów powoduje, że trwałość termodynamiczna duplesów hybrydazyjnych utworzonych przez modyfikowane izoenergetyczne sondy jest wyższa i bardzo do siebie zbliżona (równa odpowiednio –8,2 i –8,0 kcal/mol), zatem niezależna od sekwencji. W konsekwencji, w przypadku mikromacierzy izoenergetycznych jedynie obecność fragmentu jednoniciowego komplementarnego do sondy decyduje o detekcji hybrydazyacji. Jest to ogromną zaletą w stosunku do mikromacierzy nieizoenergetycznych, zawierających jako sondy niemodyfikowane oligonukleotydy, w których o detekcji hybrydazyacji decydują dwa czynniki, a mianowicie obecność fragmentu jednoniciowego komplementarnego do sondy oraz wystarczająca do detekcji trwałość termodynamiczna duplesu hybrydazyjnego.

Stworzenie mikromacierzy izoenergetycznych było możliwe dzięki przeprowadzonej kilka lat temu syntezie modyfikowanych kwasów nukleinowych o usztywnionej konformacji tzn. LNA (ang. *Locked Nucleic Acids*) (14-16). Obecność dodatkowego mostka metylenowego powoduje zmianę konformacyjną w obrębie rybozy, co prowadzi do zwiększania trwałości termodynamicznej duplesów RNA i DNA. Stwierdzono, że obecność pojedynczego nukleotydu typu LNA zwiększa trwałość termodynamiczną duplesów 2'-O-metyloRNA/RNA przeciętnie o około 1,5 kcal/mol i ma charakter addytywny (17). Należy zaznaczyć, że modyfikacja sond oligonukleotydowych nukleotydami typu LNA nie zmienia ich zdolności selektywnego rozpoznania i wiązania się z komplementarnym jednoniciowym fragmentem RNA. Na podstawie badań modelowych wykazano, że trwałość termodynamiczna (ΔG_{37}°) duplesu hybrydazyjnego większa niż -6 kcal/mol jest wystarczająca, aby wykryć taki duples. Zwiększenie trwałości duplesów hybrydazyjnych dzięki wprowadzeniu modyfikowanych nukleotydów, pozwoliło zmniejszyć długość stosowanych sond hybrydazyjnych do pentanukleotydów. Jest to o tyle istotne, że 1024 oligomery stanowią pulę wszystkich możliwych pentanukleotydów, a w przypadku heptanukleotydów możliwych oligonukleotydów jest już 16 384. Dodatkowo, oprócz zastosowania nukleotydów typu LNA, zwiększenie trwałości i izoenergetyczności sond mikromacierzy uzyskano poprzez zastąpienie w określonych pozycjach adenozynej jej analogiem, a mianowicie 2,6-diaminopurynorybozydem. Pochodna ta dzięki obecności dodatkowej grupy aminowej, w stosunku do adenozynej, pozwala tworzyć o jedno więcej wiązanie wodorowe z urydyną, co w praktyce przekłada się na zwiększenie trwałości termodynamicznej duplesów hybrydazyjnych (18). Dla szeregu sond izoenergetycznych, zwłaszcza tych bogatych w urydyny, na końcu 3' sondy dodano LNA guanozynę. Poprzez niekanoniczne oddziaływania wzmacnia ona trwałość du-

pleksu hybrydizacyjnego bez zaburzania selektywności pentanukleotydu sondy (19).

Przygotowanie biblioteki izoenergetycznych sond pentanukleotydu przeprowadzone było bardzo szczegółowymi badaniami termodynamicznymi określającymi wpływ nukleotydu typu LNA na trwałość dupleksów 2'-O-metyloRNA/RNA, w zależności od natury i położenia nukleotydu LNA w dupleksie (17,18). Jako modelowe zostały wybrane dupleksy 2'-O-metyloRNA/RNA, gdyż najlepiej oddają one naturę oddziaływań izoenergetycznych mikromacierzy i badanego RNA. Mianowicie, 2'-O-metylowy oligonukleotyd odpowiada sondzie mikromacierzy izoenergetycznej a oligoribonukleotyd jest modelem badanego RNA. Na podstawie badań modelowych wykazano, że największą stabilizację dupleksu hybrydizacyjnego uzyskuje się wprowadzając nukleotyd typu LNA w pozycje środkową dupleksu i wynosi ona od 0,8 do 2,5 kcal/mol, przeciętnie około 1,5 kcal/mol. Natomiast wprowadzenie nukleotydu typu LNA w pozycje 5'- lub 3'-terminalną powoduje zwiększenie trwałości termodynamicznej przeciętnie o 0,5 i 1,0 kcal/mol, odpowiednio dla pozycji 5'- i 3'-terminalnej. Ponieważ badania termodynamiczne prowadzone były na dużej grupie modelowych dupleksów 2'-O-metyloRNA/RNA, zawierających różnego typu i w różnych pozycjach nukleotydu LNA, możliwe było obliczenie wszystkich parametrów termodynamicznych modelu najbliższego sąsiedztwa. W konsekwencji pozwala to obliczyć z ponad 95% dokładnością trwałość termodynamiczną dowolnego dupleksu 2'-O-metyloRNA/RNA zawierającego dowolne nukleotydy typu LNA.

W przypadku mikromacierzy izoenergetycznych, które dedykowane są badaniu struktury RNA, bardzo ważne jest poznanie jak obecność pojedynczych niesparowań z udziałem nukleotydu typu LNA zmienia trwałość dupleksu hybrydizacyjnego. W badaniach wpływu szeregu pojedynczych niesparowań wykazano, że destabilizują one dupleksy o 1,6 – 7,0 kcal/mol, zależnie od typu niesparowania i jego położenia w dupleksie 2'-O-metyloRNA/RNA (17,18).

Pewną niedogodnością mikromacierzy zawierających krótkie sondy oligonukleotydu jest możliwość występowania tej samej sekwencji w badanym RNA więcej niż jeden raz. Może to stworzyć problemy związane z interpretacją wyników hybrydizacji. Niewątpliwą jednak korzyścią mikromacierzy izoenergetycznych zawierających krótkie modyfikowane pentanukleotydu sondy jest ich zwiększona selektywność. Obecność pojedynczego niesparowania w dupleksie hybrydizacyjnym utworzonym przez krótką sondę wprowadza względnie znacznie większe zmiany w jego trwałości termodynamicznej niż w tym utworzonym przez długą sondę oligonukleotydu. Cała biblioteka to 1024 pentanukleotydy, jest ona zatem mała i łatwa do przygotowania i rozpowszechnienia w postaci mikromacierzy przez firmy komercyjne. Dodatkowo, mały rozmiar biblioteki umożliwia przygotowanie mikromacierzy uniwersalnych czyli zawierających wszystkie możliwe sondy pentanukleotydu. W konsekwencji nie wymaga to przygotowania każdorazowo mikromacierzy dedykowanych określonym RNA, gdyż uniwersalne izoenergetyczne mikromacierze mogą być narzędziem badania struktury i oddziaływań dowolnego RNA.

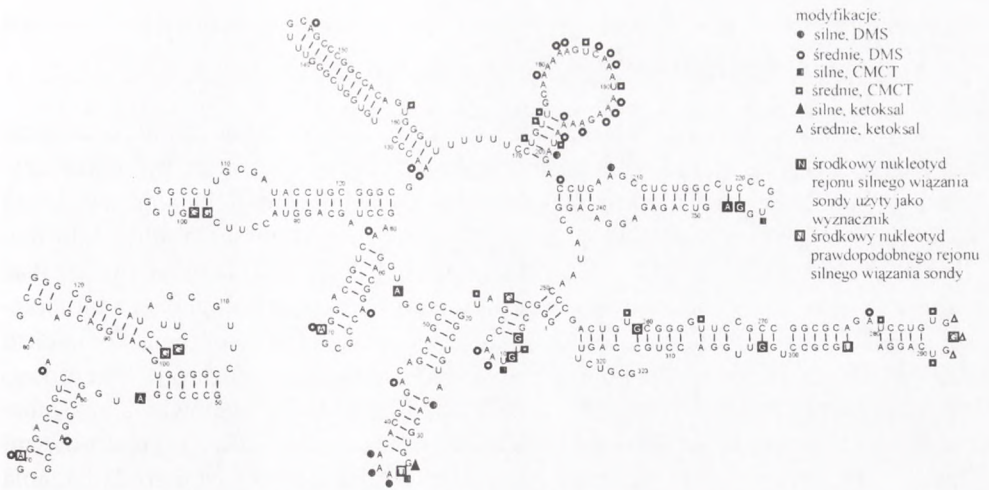
3. Omówienie mapowania mikromacierzowego na przykładzie 5' końcowego fragmentu retrotranspozonowego RNA z *Bombyx mori*

Izoenergetyczne mikromacierze zostały użyte do badania struktury końca 5' otwartej ramki odczytu (ORF) R2 RNA z *Bombyx mori* (R2Bm 5'RNA) (20). Jest to 323-nukleotydowy, niedawno odkryty regulatorowy RNA, który wpływa na zmianę funkcji białka R2 podczas retrotranspozycji. Ustalano, że R2Bm 5'RNA decyduje o wiązaniu DNA przez białko R2 powyżej miejsca insercji i odpowiednio ustawia białko R2 umożliwiając hydrolizę drugiej nici tego DNA (21). Mimo określenia ważnej funkcji biologicznej R2Bm 5'RNA, jego struktura nie była znana.

Izoenergetyczne mikromacierze dla R2Bm 5'RNA były złożone z 232 specyficznych sond, komplementarnych „krok po kroku” do sekwencji RNA, z czego 45 sond posiadało 2 miejsca wiązania, 7 sond trzy możliwe miejsca wiązania w docelowym RNA. Łącznie sondy izoenergetyczne pokrywały 291 miejsc wiązania, co stanowi 91% wszystkich możliwych miejsc wiązania dla pentanukleotydowych sond. Ze względu na przewidywaną zbyt niską stabilność termodynamiczną dupleksów hybrydacyjnych podczas konstrukcji mikromacierzy pominięto 28 sond. Średnia przewidywana energia swobodna dla dupleksów hybrydacyjnych biblioteki izoenergetycznej użytej dla R2Bm 5'RNA wynosiła $-9,8 \pm 1,2$ kcal/mol czyli o 4,8 kcal/mol korzystniej niż średnia wartość energii swobodnej dupleksów hybrydacyjnych analogicznej biblioteki złożonej z niemodyfikowanych sond pentanukleotydowych.

Mikromacierze przygotowano na płytkach mikroskopowych pokrytych 2% agarozą, aktywowaną nadjodanem sodu. Sondy oligonukleotydowe posiadały C6 aminolinker na końcu 5', który umożliwiał wiązanie chemiczne do aktywowanej agarozy. Po naniesieniu sond i 4 godzinach inkubacji grupy aldehydowe były redukowane za pomocą wodorku borosodowego, następnie płytki były płukane i suszone. Przeprowadzono hybrydyzację znakowanego radioaktywnie R2Bm 5'RNA na mikromacierzach izoenergetycznych w wybranych warunkach: 1) 200 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl, pH 8 oraz 2) 1 M NaCl, 5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl, pH 8. Hybrydyzację przeprowadzano w temperaturze pokojowej przez 18 godzin, następnie mikromacierz płukano i wirowano. Rezultat hybrydyzacji obserwowano przy użyciu komputerowego skanera materiałów znakowanych radioizotopowo (*phosphorimager*). Wyniki analizowano następnie w programie ImageQuant.

Rezultaty hybrydyzacji w temperaturze pokojowej w 200 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl pH 8 były wykorzystane do określenia struktury drugorzędowej R2Bm 5'RNA. Wybrane warunki gwarantowały dobrą specyficzność, a jednocześnie były używane w eksperymentach biologicznych z cząsteczką R2Bm 5'RNA. Sekwencje silnie wiążących sond były poddawane analizie w programie RNAstructure pod kątem alternatywnych miejsc wiązania. Na podstawie tej analizy i przewidywanej energii wiązania do poszczególnych fragmentów R2Bm 5'RNA wybrano wyznaczniki (ang. *constraints*), które po wprowadzeniu do programu RNAstructure pozwoliły na wygenerowanie struktury drugorzędowej zgodnej z danymi mapowania mikromacierzo-



Rys. 3. Struktura drugorzędowa R2Bm 5'RNA wygenerowana przez program RNAstructure z wykorzystaniem wyznaczników z mapowania mikromacierzowego i chemicznego. Po lewej stronie fragment R2Bm 5'RNA (pomiędzy 50 a 123 nukleotydem), który tworzy strukturę pseudowężła.

wego. Wyznacznikami były środki komplementarnych fragmentów RNA silnie wiążących sondy. Struktura drugorzędowa R2Bm 5'RNA otrzymana na podstawie mapowania mikromacierzowego została przedstawiona na rysunku 3.

Na początkowym etapie badań, w celu zweryfikowania otrzymanej struktury i potwierdzenia użyteczności metody mapowania za pomocą mikromacierzy izoenergetycznych, zastosowano tradycyjne mapowanie chemiczne. Stwierdzono, że wyniki mapowania chemicznego są w zgodzie z zaproponowaną na podstawie mapowania mikromacierzowego strukturą drugorzędową R2Bm 5'RNA. Również wprowadzenie do programu RNAstructure wyznaczników jednocześnie z mapowania mikromacierzowego i chemicznego skutkowało w generowaniu tej samej struktury, co po zastosowaniu jedynie wyznaczników mapowania mikromacierzowego. Jedynie silne modyfikacje chemiczne zostały użyte jako wyznaczniki, jakkolwiek również położenie nukleotydów ulegających średniej modyfikacji podczas mapowania (z wyjątkiem modyfikacji w pozycji 127) było zgodne z przewidzianą strukturą R2Bm 5'RNA.

Niewielką dostępność do wiązania sond wykazuje rejon G50-G123, pomimo że przewidziana struktura posiada dużą wewnętrzną pętlę (po 5 nukleotydów z każdej strony). To samo dotyczy nukleotydów 94-98 będących w pętli. W badaniach NMR fragmentu R2Bm 5'RNA pomiędzy 50 a 123 nukleotydem dowiedziono możliwości alternatywnego pofałdowania tego rejonu w pseudowęzeł pokazany na rysunku 3.

Zarówno mapowanie mikromacierzowe jak i chemiczne ukazują bardzo zwartą strukturę R2Bm 5'RNA. Przewidziane rejonu pętlowe są potwierdzone przez silną reaktywność G33, U34, A35, A36 i A37 oraz średnią U285, G286, G287, G288 i U289 obserwowaną podczas mapowania chemicznego. Rejon od A182 to A200 jest również dostępny dla mapowania chemicznego i wykazuje średnią reaktywność.

4. Perspektywy wykorzystania mikromacierzy izoenergetycznych do badania oddziaływań i dynamiki struktury RNA

Na podstawie ogólnych zasad analizy struktury RNA za pomocą mikromacierzy przypuszcza się, że metoda mapowania mikromacierzowego może być także użytecznym sposobem badania kompleksów RNA z innymi biomolekułami, zwłaszcza takimi jak białka, antybiotyki, oligosacharydy czy różnego typu metabolity. Informacji o fragmentach RNA uwikłanych w oddziaływania z biomolekułami można uzyskać poprzez porównanie obrazu hybrydyzacji samego RNA i jego kompleksu z biomolekułą. Te fragmenty jednoniciowe RNA, które biorą udział w tworzeniu kompleksu nie będą hybrydowały do komplementarnych sond mikromacierzy. Przeprowadzono pierwsze badania kompleksów RNA-białko za pomocą mapowania mikromacierzowego. Dotyczyły one kompleksów białka opiekuńczego Hfq z regulatorowymi OxyS i DsrA RNA z *E. coli* i wykazano, że jest to bardzo obiecująca metoda badania kompleksów.

Na przykładzie 5S rRNA z *E. coli* wykazano, że mapowanie mikromacierzowe jest skuteczne w odróżnianiu dwóch konformerów tego RNA: A i B (12). Mikromacierze izoenergetyczne można także wykorzystać do badania dynamizmu konformacyjnego RNA i wynikających z tego zmian struktury RNA spowodowanych wiązaniem ligandów czy kationów metali dwuwartościowych.

5. Podsumowanie

Zaproponowano nową metodę badania struktury i oddziaływań RNA, z wykorzystaniem mikromacierzy. Dla uproszczenia i optymalizacji tej metody wprowadzono nowy typ mikromacierzy, opartych na krótkich, LNA modyfikowanych izoenergetycznych sondach oligonukleotydowych. Izoenergetyczny charakter sond sprawia, że trwałość termodynamiczna wszystkich dupleksów hybrydyzacyjnych jest bardzo podobna, w konsekwencji jedynie obecność jednoniciowego fragmentu w badanym RNA decyduje o hybrydyzacji. W przeprowadzonych badaniach struktury szeregu cząsteczek RNA wykazano, że uzyskane wyniki są zgodne z tymi z mapowania chemicznego RNA. Czas prowadzenia mapowania mikromacierzowego, jego uniwersalność i prostota sprawiają, że metoda ta może być alternatywą metody mapowania chemicznego czy enzymatycznego RNA.

Praca powstała w ramach realizacji projektów badawczych finansowanych przez MNiSW, granty nr 2P04A 03729 i N301 3383 33.

Literatura

1. Pace N. R., Thomas B. C., Woese C. R., (1999), in: Eds. Gesteland R. F., Cech T. R., Atkins J. F., *The RNA World*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 113-141.
2. Cannone J. J., Subramanian S., Schnare M. N., Collett J. R., D'Souza L. M., Du Y. S., Feng B., Lin N., Madabusi L. V., Muller K. M. et al., (2002), *BMC Bioinformatics*, 3.
3. Zuker M., (1989), *Science*, 244, 48-52.
4. Mathews D. H., Disney M. D., Childs J. L., Schroeder S. J., Zuker M., Turner D. H., (2004), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 101, 7287-7292.
5. Ehresmann C., Baudin F., Mougél M., Romby P., Ebel J. P., Ehresmann B., (1987), *Nucleic Acids Res.*, 15, 9109-9128.
6. Ziehler W. A., Engelke D. R., (2000), *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, 2, 6.1.1-6.1.21.
7. Michałowski D., Wrześciński J., Krzyżosiak W., (1996), *Biochemistry*, 35, 10727-10734.
8. Sohail M., Akhtar S., Southern E. M., (1999), *RNA*, 5, 646-655.
9. Mir K. U., Southern E. M., (1999), *Nat. Biotechnol.*, 17, 788-792.
10. Milner N., Mir K. U., Southern E. M., (1997), *Nat. Biotechnol.*, 15, 537-541.
11. Ooms M., Verhoef K., Southern E. M., Huthoff H., Berkhout B., (2004), *Nucleic Acids Res.*, 32, 819-827.
12. Kierzek E., Kierzek R., Turner D. H., Catrina I. E., (2006), *Biochemistry*, 45, 581-593.
13. Kierzek E., Mathews D. H., Ciesielska A., Turner D. H., Kierzek R., (2006), *Nucleic Acids Res.*, 34, 3609-3614.
14. Koshkin A. A., Singh S. K., Nielsen P., Rajwanshi V. K., Kumar R., Meldgaard M., Olsen C. E., Wengel J., (1998), *Tetrahedron*, 54, 3607-3630.
15. Koshkin A. A., Fensholdt J., Pfundheller H. M., Lomholt C., (2001), *J. Org. Chem.*, 66, 8504-8512.
16. Pedersen D. S., Rosenbohm C., Koch T., (2002), *Synthesis*, 802-808.
17. Kierzek E., Ciesielska A., Pasternak K., Mathews D. H., Turner D. H., Kierzek R., (2005), *Nucleic Acids Res.*, 33, 5082-5093.
18. Pasternak A., Kierzek E., Pasternak K., Turner D. H., Kierzek R., (2007), *Nucleic Acids Res.*, 35, 4055-4063.
19. Pasternak A., Kierzek E., Pasternak K., Frątczak A., Turner D. H., Kierzek R., (2007), *Biochemistry*, 47, 1249-1258.
20. Kierzek E., Kierzek R., Moss W. N., Christensen S. M., Eickbush T. H., Turner D. H., (2008), *Nucleic Acids Res.*, 36, 1770-1782.
21. Christensen S. M., Ye J. Q., Eickbush T. H., (2006), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 103, 17602-17607.