

# Czy występuje „równoległa”, wewnątrzcząsteczkowa asocjacja pojedynczej nici 5'-->3' oligorybonukleotydowej cząsteczek RNA w warunkach fizjologicznych?

Katarzyna Lamparska  
Instytut Chemii Bioorganicznej  
Polska Akademia Nauk  
Poznań

Wspólną cechą prawoskrętnych form A, B, C i D dupleksów DNA, oraz A-RNA jest antyrównoległe ułożenie nici 5'-->3' w których parowanie zasad i strukturę łańcucha fosforocukrowego opisuje klasyczny model według Watsona i Cricka (1).

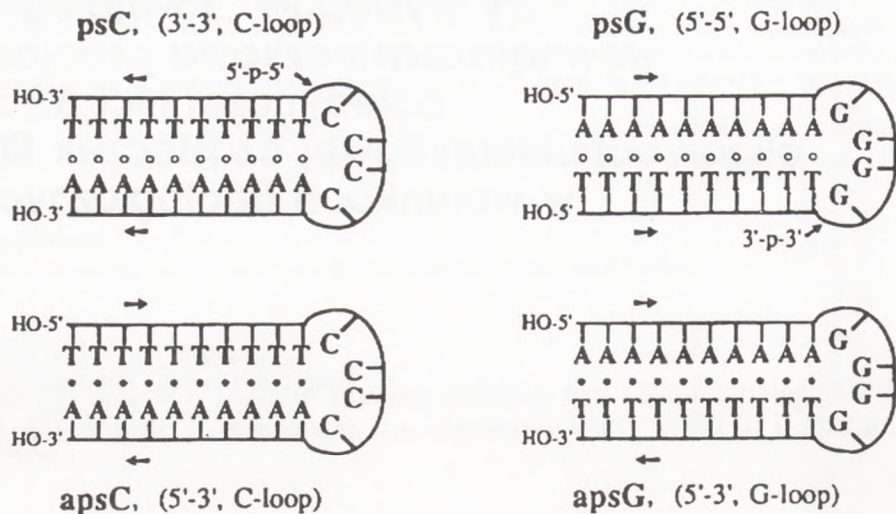
W ostatnich latach w związku z zainteresowaniem oligonukleotydowymi czynnikami regulacji ekspresji genów (strategia antysensowa), szczególną uwagę skupiono na możliwości równoległego ułożenia dwóch nici w obrębie tripleksów DNA oraz DNA/RNA. Wskazano na możliwość tworzenia dupleksów w których jedna z nici zbudowana jest z jednostek  $\alpha$ -anomerycznych. Wyniki te zainicjowały szersze badania możliwości tworzenia tzw. „równoległego” DNA.

Interesujące wyniki dotyczące konstrukcji i analizy strukturalnej modelu równoległej asocjacji w obrębie DNA uzyskano w laboratoriach van den Sande i Jovina (2,3). Oligodeoksynukleotydy zbudowano tak aby zawierały potencjalnie komplementarne sekwencje d(T)<sub>10</sub> i d(A)<sub>10</sub> spięte czteronukleotydową pętlą zawierającą deoksynukleotydy C lub G.

Przedstawione na rysunku 1 modele struktur szpilekowych otrzymano drogą chemiczną.

Dwie z czterech cząsteczek nazwane apsDNA „antyrównoległe DNA”, mają typowe, fosfordiestrowe wiązanie na całej swej długości i fragmenty d(T)<sub>10</sub> oraz d(A)<sub>10</sub> o przeciwnej polarności. Syntezę chemiczną antyrównoległego DNA metodą amidofosforynową prowadzono w typowym kierunku 3'-->5' na nośniku stałym (CPG) powiązany, poprzez linker, z grupą 3'-OH deoksyrybonukleozydu.

Pozostałe dwie cząsteczki, nazwane ps DNA „równoległe DNA”, zawierają fragmenty d(T)<sub>10</sub> i d(A)<sub>10</sub> w tej samej orientacji dzięki wprowadzeniu, na pewnym etapie syntezy, jednostkowych wiązań 3'-p-3', lub 5'-p-5' fosfordie-



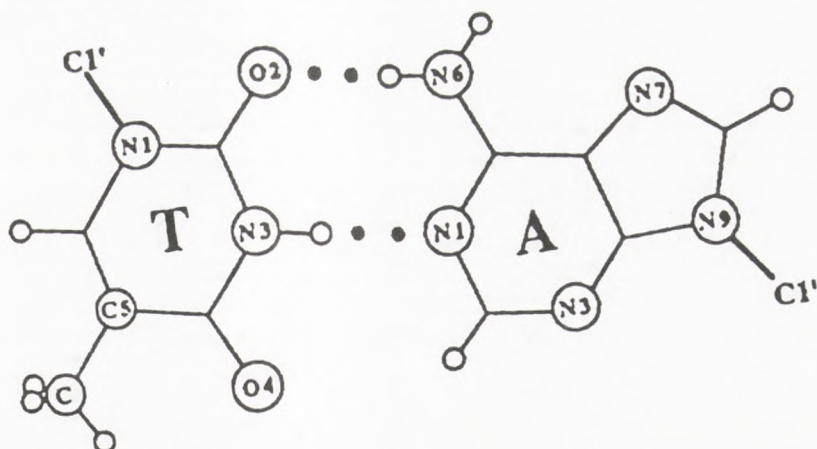
Rys. 1. Modele struktur szpilekowych oligodeoksynukleotydów do badań „równoległego” DNA.

strowych. W tym celu został zsyntezowany również 5'-amidofosforyn którego funkcję 3'-OH chroniono grupą dimetoksytrylową.

W przypadku cząsteczki psC, jej początkowa synteza zachodzi w typowym kierunku, czyli 3'-->5'. Przed rozpoczęciem syntezy pętli wprowadzono 5'-amidofosforyn w celu wytworzenia wiązania 5'-p-5'. Następnie, dla wydłużenia łańcucha stosowano typowe 3'-fosforynoamidy. W przypadku modelu psG już pierwszy nukleozyd był podłączony do CPG poprzez funkcję 5'-. Preparatykę oligodeoksynukleotydu prowadzono w kierunku 5'-->3', ale tylko do momentu rozpoczęcia syntezy pętli. W tym punkcie procedury został wprowadzony 3'-amidofosforyn, co powoduje utworzenie wiązania 3'-p-3'. Następnie użyte komponenty do syntezy miały już typową budowę 3'-amidofosforynową.

Otrzymane struktury szpilekowe poddano analizie elektroforetycznej, spektrofotometrycznej, CD oraz analizie enzymatycznej. Uzyskane wyniki: (i) podobna mobilność elektroforetyczna dupleksów ps i aps na żelach poliakrylamidowych w warunkach denaturujących i natywnych, (ii) substratowa aktywność dupleksów ps względem T4 DNA ligazy, (iii) wartości  $T_m$  dla dupleksów ps niższe niż aps, (iv) widma UV i CD wskazujące na helikalny, lecz odmienny od aps charakter dupleksów ps oraz (v) taki sam przebieg reakcji chemicznego metylowania struktur ps i aps, zdaniem autorów odzwierciedlały tworzenie się „równoległych” dupleksów psC i psG DNA.

Uzyskane wyniki eksperymentalne dowodzą o słuszności poprzedzających je doniesień Pattabiramana (4) i Kuryvavyi (5) w których opisane są wyniki obliczeń w polu siłowym (minimalizacja energii) dla modelu dupleksu d(A)<sub>6</sub>



Rys. 2. Schemat parowania dA-T według modelu oddziaływania *reverse* Watson-Crick.

d(T)<sub>6</sub> w którym parowanie zasad w psDNA jest możliwe dzięki asocjacji typu *reverse* Watson-Crick (odwrotne parowanie W-C). Zgodnie z tym modelem reszta tyminy obraca się o 180° dokoła osi N3-C6 względem kanonicznego parowania zasad, tak że wiązania glikozydowe znajdują się w konfiguracji *trans* (rys. 2). W ostatnio opublikowanej pracy (6) analogiczny schemat oddziaływania udowodniono dla „równoległych” DNA zawierających pary d(A)-d(U).

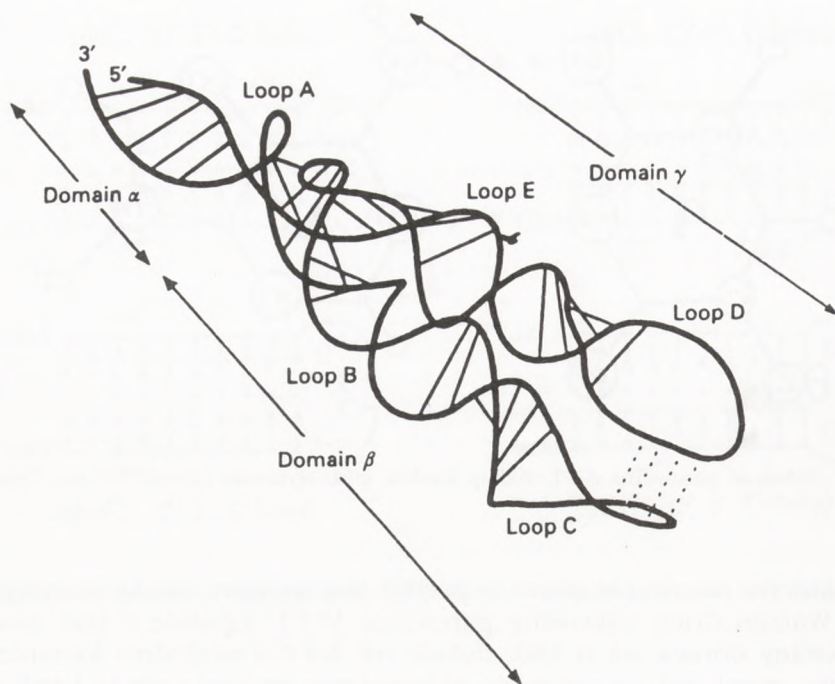
Antyrównoległa, wewnątrzcząsteczkowa asocjacja pojedynczej nici oligorybonukleotydy jest dominującym etapem procesu zwijania (ang. *folding*) RNA z utworzeniem regionów dwu- i jednoniciowych o bardzo zróżnicowanej budowie przestrzennej. W odróżnieniu od DNA, dwuniciowe regiony RNA charakteryzuje obecność, zaburzających ich regularność, wybrzuszeń jednostronnych (ang. *bulge loops*), dwustronnych (ang. *internal loops, bubbles*), czy też formowanie szpilek (ang. *hairpins*) lub bardziej złożonych motywów, jak np. pseudowęzłów (ang. *pseudoknots*) (7).

Przedstawione wyniki dotyczące tzw. „równoległego” DNA sprawiają, że po raz pierwszy od momentu odkrycia lewoskrętnej formy „Z” dupleksów RNA (8,9) powraca istotne pytanie dotyczące możliwości występowania innych niż klasyczne formy asocjacji dwóch fragmentów jednoniciowych RNA.

Już w 1961 r. Rich i wsp. (10) przedstawili, oparty na badaniach krytalograficznych, model struktury kwasu poliadenylogowego w środowisku kwaśnym. Obserwowano parowanie A-AH<sup>+</sup> w obrebie dwóch równoległe usytuowanych nici.

Powstają pytania czy równoległa, wewnątrzcząsteczkowa asocjacja nici oligorybonukleotydy może mieć miejsce w warunkach fizjologicznych, a zatem zbliżonego do neutralnego pH? Czy ten typ asocjacji ma znaczenie dla procesu zwijania RNA?

Istotnymi przesłankami dla poszukiwania odpowiedzi na te pytania był dowód krytalograficzny na występowanie równoległej, wewnątrzcząsteczko-



Rys. 3. Model struktury roślinnego 5S rRNA wg Barciszewskiego i wsp. (12) ukazujący równoległe, wewnątrzcząsteczkowe oddziaływanie między pętlami C i D.

wej asocjacji, w obrębie jednej pary nukleotydowej  $G_{15}-C_{48}$  w cząsteczce  $tRNA^{Phe}$  (11) oraz postulowanie przez Barciszewskiego i wsp. (12) modelu struktury roślinnego 5S rRNA w którym dochodzi do oddziaływania dwóch regionów szpilkowych poprzez równoległą asocjację ich pętli (rys. 3).

W świetle tego na uwagę zasługuje praca Tchurikova i wsp. (13) w której, analogicznie do przedstawionego podejścia metodycznego dla udokumentowania „równoległego” DNA, autorzy analizują możliwość „równoległej” asocjacji dwóch łańcuchów oligorybonukleotydowych.

Modelowe cząsteczki RNA zawierające regiony potencjalnej asocjacji A-U na długości 45 bp otrzymano na drodze enzymatycznej metodą transkrypcji *in vitro* z wykorzystaniem plazmidowych DNA, polimerazy T7 oraz znakowanych izotopem fosforu\* lub trytem 5'-trifosforanów rybonukleozydów. Strukturę transkryptów typu *run off* przedstawiłam poniżej.

\* Izotop fosforu  $^{33}P$  został użyty w badaniach opublikowanych w pracy Tchurikova i wsp. (13).

**<sup>33</sup>P-RNA:** 5'--cucgccc (A)<sub>1</sub>(U)<sub>2</sub>(A)<sub>3</sub>(U)<sub>4</sub>(A)<sub>5</sub>(U)<sub>6</sub>(A)<sub>7</sub>(U)<sub>8</sub>(A)<sub>9</sub> ggggau--3' **76 zasad**

**<sup>3</sup>H-apRNA:** 5'--gaucccc (U)<sub>9</sub>(A)<sub>8</sub>(U)<sub>7</sub>(A)<sub>6</sub>(U)<sub>5</sub>(A)<sub>4</sub>(U)<sub>3</sub>(A)<sub>2</sub>(U)<sub>1</sub> gggguac--3' **106 zasad**

**<sup>3</sup>H-pRNA:** 5'--cucgccc (U)<sub>1</sub>(A)<sub>2</sub>(U)<sub>3</sub>(A)<sub>4</sub>(U)<sub>5</sub>(A)<sub>6</sub>(U)<sub>7</sub>(A)<sub>8</sub>(U)<sub>9</sub> ggggau--3' **76 zasad**

**<sup>3</sup>H-miRNA:** 5'--gaucccc (A)<sub>9</sub>(U)<sub>8</sub>(A)<sub>7</sub>(U)<sub>6</sub>(A)<sub>5</sub>(U)<sub>4</sub>(A)<sub>3</sub>(U)<sub>2</sub>(A)<sub>1</sub> gggguac--3' **106 zasad**

Możliwość asocjacji równoległej transkryptów analizowano drogą hybrydyzacji w warunkach obojętnego pH, a zatem w warunkach zbliżonych do fizjologicznych. Kolejno hybrydyzowano znakowany fosforem matrycowy 76-mer RNA zawierający sekwencję (A)<sub>1</sub>(U)<sub>2</sub>(A)<sub>3</sub>(U)<sub>4</sub>(A)<sub>5</sub>(U)<sub>6</sub>(A)<sub>7</sub>(U)<sub>8</sub>(A)<sub>9</sub> z trzema różnymi <sup>3</sup>H-RNA. Jeden z nich, miRNA („mirror RNA”) zawierający sekwencję (A)<sub>9</sub>(U)<sub>8</sub>(A)<sub>7</sub>(U)<sub>6</sub>(A)<sub>5</sub>(U)<sub>4</sub>(A)<sub>3</sub>(U)<sub>2</sub>(A)<sub>1</sub> zastosowano jako tzw. negatywną próbkę kontrolną. Jego orientacja jest symetryczna do matrycowego RNA i nie oczekiwano tworzenia się zarówno antyrównoległych czy równoległych dupleksów o pełnej długości 45 par zasad.

Po hybrydyzacji każda próbka była analizowana bezpośrednio, przez rozdział na żelach poliakryloamidowych w warunkach denaturujących lub niedenaturujących, czy też po trawieniu RNazą A.

Wobec faktu, że obserwowano nukleazowo odporne odcinki tworzące się przez autoasocjację matrycowego <sup>33</sup>P-RNA z formowaniem szpilek, zawierających pary A-U oraz A-A i U-U, konieczne było użycie odpowiedniego nadmiaru molowego pRNA. Ustalono konieczność użycia 5-krotnego nadmiaru pRNA podczas hybrydyzacji z <sup>33</sup>P-RNA. Tworzenie się hybrydu pomiędzy <sup>33</sup>P-RNA i pRNA ustalono rozdzielając próbkę po hybrydyzacji na żelu w warunkach niedenaturujących. Okazało się, że nadmiar pRNA był wystarczający do związania wszystkich cząsteczek <sup>33</sup>P-RNA — nie obserwowano wolniej migrujących struktur typowych dla procesów autoasocjacji <sup>33</sup>P-RNA. Utworzony hybryd zawierał zbudowany z 45 par zasad odcinek stabilny na działanie RNazy A.

W eksperymentach kontrolnych po hybrydyzacji <sup>33</sup>P-RNA z apRNA, obserwowano trzon o długości 56 bp, odpowiadający antyrównoległemu dupleksowi utworzonemu przez komplementarny trzon A/U, o długości 45 par zasad i przyległe krótkie sekwencje odpowiadające wektorowi plazmidowemu pGEM. Hybrydyzacja <sup>33</sup>P-RNA z miRNA i następcze trawienie hybrydu RNazą A prowadziło do formowania z niską wydajnością krótkiego, stabilnego regionu par (A)<sub>9</sub>-(U)<sub>8</sub> tworzących się z fragmentów jednoniciowych ulegających autoasocjacji.

Uzyskane wyniki pozwoliły autorom postulować możliwość równoległej asocjacji dwóch nici 5'-->3' oligorybonukleotydydowych w badanym hybrydzie <sup>33</sup>P-RNA/pRNA. Zdaniem autorów, ich obserwacje znajdują swoje odzwierciedlenie w wynikach badań efektywnej inhibicji translacji *in vivo* z wykorzystaniem mogących asocjować równoległe komplementarnych RNA (14).

W odróżnieniu od wcześniejszych badań dotyczących „równoległego” DNA autorzy nie dysponują odpowiednią ilością preparatów dla przeprowadzenia doświadczeń o charakterze strukturalnym, których wyniki pozwoliłyby w pełni udokumentować taki model asocjacji dwóch nici RNA. Niemniej, przedstawione badania przybliżają nas do momentu uzyskania, odpowiedzi na

tytułowe pytanie artykułu — pytania o istotnej wadze dla zrozumienia mechanizmów zwijania RNA (ang. *RNA folding*). Dotychczas, struktura krystalograficzna tRNA<sup>Phe</sup> dostarcza jedyne w pełni udokumentowanego przykładu równoległej, wewnątrzcząsteczkowej asocjacji RNA.

## Literatura

1. Saenger W., (1984), *Principles of Nucleic Acids Structure*, Springer, Berlin, Heidelberg.
2. van de Sande J. M., Ramsing N. B., Germann M. W., Elhorst W., Kalisch B. W., Kitzing E. V., Pon R. T., Clegg R. C., Jovin T. M., (1988), *Science*, 241, 551-557.
3. Ramsing N. B., Jovin T. M., (1988), *Nucleic Acids Res.*, 16, 6659-6676.
4. Pattabiraman N., (1986), *Biopolimers*, 25, 1603-1606.
5. Kuryvavyi V. V., (1987), *Molek. Biol. (Russ.)*, 21, 1486-1496.
6. Fortsch I., Fritzsche H., Birch-Hirschfeld E., Evertsz E., Klement R., Jovin T. M., Zimmer Ch., (1996), *Biopolimers*, 38, 209-220.
7. Wyatt J. R., Tinoco Jr. I., (1993), *The RNA World*, Eds. Gesteland R. F., Atkins J. F., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 465-496
8. Hall K., Cruz P., Tinoco I. Jr., Jovin T. M., van de Sande J. H., (1984), *Nature (London)*, 311-584.
9. Adamiak R. W., Gałat A., Skalski B., (1985), *Biochim. Biophys Acta*, 825, 345-825.
10. Rich A., Davies D. R., Crick F. H. C., Watson J. D., (1961), *J. Mol. Biol.*, 3, 71-86.
11. Kim S. H., Quigley G. J., Suddath F. L., McPherson A., Sneden D., Kim J. J., Weinzierl J., Rich A., (1973), *Science*, 179, 285-288.
12. Barciszewska M. Z., Erdmann V. A., Barciszewski J., (1996), *Biol. Rev.*, 71, 1-25, i prace tam cytowane.
13. Tchurikov N. A., Ponomarenko N. A., Golova Y. B., Chernov B. K., (1995), *J. Biomol. Struct. and Dynam.*, 13, 507-513.
14. Ponomarenko N. A., Chistyakova L. G., Chernov B. K., Tchurikov., (1992), *Proc. Russian Acad. Sci.*, 27, 584-588.

## Is parallel, intramolecular association of 5'-->3' oligoribonucleotide strand possible in RNA under physiological conditions ?

### Summary

The article briefly presents the design and chemical synthesis of parallel stranded DNA with formation of reverse Watson-Crick base pairs. Tchurikov et al. attempted an analysis of parallel RNA-RNA duplex formation. Single stranded RNA, prepared by *in vitro* transcription with T7 polymerase using <sup>33</sup>P and <sup>3</sup>H nucleoside 5'-triphosphates, were appropriately hybridized and analysed by polyacrylamide gel electrophoresis prior and after RNase A digestion. Results obtained allow to conclude on the formation of parallel stranded, RNA stable to RNase A. The presented data show the importance of intramolecular parallel association of the single stranded RNA during its folding.

### Key words:

Parallel stranded DNA, parallel stranded RNA, base pairing, RNA folding.

### Adres do korespondencji:

Katarzyna Lamparska, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań.