



**MATEMATICKO-FYZIKÁLNÍ  
FAKULTA**  
Univerzita Karlova

## **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Zuzana Johanovská

### **Konformační přechody a stabilita kvadruplexů nukleových kyselin**

Fyzikální ústav MFF UK

Vedoucí bakalářské práce: doc. RNDr. Peter Mojzeš, CSc.

Studijní program: Fyzika

Studijní obor: Obecná fyzika

Praha 2019

## **Poděkování**

Především bych ráda poděkovala panu doc. RNDr. Peteru Mojžešovi, CSc., za jeho trpělivost, ochotu a nadšení, s nimiž se mi při psaní této práce věnoval, a díky kterému na ní byla skutečně radost pracovat. Poděkování pak patří i mnoha dalším, kteří za mnou stáli a jsou tak (alespoň metaforicky) mým pevným bodem ve vesmíru, díky kterému je možné pohnout s jakkoli obtížnými překážkami.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů, literatury a dalších odborných zdrojů.

Beru na vědomí, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorského zákona v platném znění, zejména skutečnost, že Univerzita Karlova má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

V ..... dne.....

podpis

Název práce: Konformační přechody a stabilita kvadruplexů nukleových kyselin

Autor: Zuzana Johanovská

Katedra / Ústav: Fyzikální ústav UK, Oddělení fyziky biomolekul

Vedoucí bakalářské práce: doc. RNDr. Peter Mojžeš, CSc., Fyzikální ústav, Oddělení fyziky biomolekul

Abstrakt: Práce se zabývá studiem guaninových kvadruplexů, tj. nekanonickými čtyřvláknovými strukturami nukleových kyselin bohatých na repetitivně guaninové sekvence s potenciálně biologickým a nanotechnologickým významem. První část shrnuje základní informace o struktuře a topologii kvadruplexů, ve druhé části jsou pak uvedené poznatky o kvadruplexech *in vivo*. Třetí část je věnována metodám, užitým při vlastním měření, konkrétně Ramanově spektroskopii, cirkulárnímu dichroismu a absorpční spektroskopii. Následující části se věnují měření a zpracování vlastních experimentálních výsledků. V rámci práce bylo zkoumáno pět sekvencně blízkých oligonukleotidů odlišujícími se pouze bázemi v jednočlenných smyčkách. Byl zkoumán vliv koncentrace oligonukleotidu a draselných iontů  $K^+$  na stabilitu těchto kvadruplexů pomocí Ramanovy spektroskopie, přičemž byla pozorována neobvykle vysoká termální stabilita. Další experimenty zahrnovaly měření CD a absorpčních spekter za nižších koncentrací oligonukleotidů, dvou různých koncentrací draselných iontů a porovnání stability jednotlivých modifikací s publikovanými výsledky. Dále byla studována možná interakce s kationickým porfyrinem CuTMPyP4, podobná interakci s antiparalelním kvadruplexem TBA. Interakce s paralelním kvadruplexem však prokázána nebyla, potvrzen byl naopak vliv koncentrace iontů  $K^+$  na stabilitu kvadruplexů. Dále byla pozorována samovolná tvorba pravidelných mikrokystalů z kvadruplexů jednoho ze zkoumaných oligonukleotidů a pomocí Ramanova mikroskopu byla naměřena první Ramanova spektra krystalického kvadruplexu.

Klíčová slova: kvadruplex, nukleová kyseliny, Ramanova spektroskopie, cirkulární dichroismus, krystaly

Title: Conformational transitions and stability of quadruplex nucleic acids

Author: Zuzana Johanovská

Department: Institute of Physics, Division of Biomolecular Physics

Supervisor: doc. RNDr. Peter Mojzeš, CSc., Institute of Physics,  
Division of Biomolecular Physics

Abstract: The work deals with guanine quadruplexes, i.e., non-canonical four-stranded structures of nucleic acids rich in repetitive guanine sequences with potential biological and nanotechnological significance. The first part summarizes basic information about the structure and topology of quadruplexes, in the second part, the present knowledge about the quadruplexes *in vivo* are overviewed. The third part is devoted to experimental methods used in the present study, namely Raman spectroscopy, circular dichroism, and absorption spectroscopy. The next sections are devoted to the acquisition and treatment of your own experimental results. Five sequentially related oligonucleotides differing in the bases in a single-member loop were investigated. The effect of concentration of oligonucleotide and potassium ions  $K^+$  on the stability of these quadruplexes was investigated by Raman spectroscopy, and an unusually high thermal stability was observed. Other experiments included measurements of CDs and absorption spectra at lower oligonucleotide concentrations, two different potassium ion concentrations, and a comparison of the stability of individual modifications with the previously published results. Furthermore, the possible interaction with the cationic porphyrin CuTMPyP4, similar to the interaction with the antiparallel TBA quadruplex, was studied. However, interaction with parallel quadruplexes has not been proven, on the contrary, the effect of the concentration of  $K^+$  ions on the quadruplex stability has been confirmed. Furthermore, spontaneous formation of regular microcrystals from quadruplexes of one of the oligonucleotides studied here was observed and the first Raman spectra of the crystalline quadruplex were measured using a Raman microscope.

Keywords: quadruplex, nucleic acids, Raman spectroscopy, circular dichroism, crystals

# Obsah

<b>ÚVOD / PŘEDMLUVA</b>	<b>1</b>
<b>1. OBECNÝ ÚVOD DO STUDIA KVADRUPLEXŮ</b>	<b>2</b>
1.1. Chemická struktura nukleových kyselin	2
1.2. Prostorová struktura nukleotidu	3
1.3. Nekovalentní interakce mezi bázemi	5
1.3.1. <i>Watsonovo-Crickovo párování bází</i>	6
1.3.2. <i>Hoogsteenovo párování a guaninové tetrády</i>	7
1.3.3. <i>i-Motiv a další nekanonické struktury</i>	8
1.4. G-kvadruplexy a jejich druhy	9
1.5. Stabilita a konformace kvadruplexů v závislosti na prostředí a sekvenci oligonukleotidu	11
1.5.1. <i>Stabilizující kationty</i>	11
1.5.2. <i>Vliv dalších látek v roztoku</i>	13
1.5.3. <i>Vliv sekvence na stabilitu kvadruplexu</i>	15
<b>2. KVADRUPLEXY IN VIVO</b>	<b>17</b>
2.1. Telomerní sekvence a možný výskyt kvadruplexů	17
2.2. Vyšší struktury tvořené kvadruplexy v telomerních sekvencích	19
2.3. Moderní výzkum v telomerách <i>in vivo</i>	20
<b>3. EXPERIMENTÁLNÍ METODY STUDIA KVADRUPLEXŮ</b>	<b>22</b>
3.1. Absorpční spektroskopie	22
3.2. Cirkulární dichroismus (CD spektroskopie)	25
3.3. Ramanova spektroskopie	28
3.3.1. <i>Markery ve spektrech kvadruplexů a bází DNA</i>	31
<b>4. POSTUPY PŘÍPRAVY VZORKŮ, MĚŘENÍ A ZPRACOVÁNÍ DAT</b>	<b>34</b>
4.1. Zkoumané vzorky a jejich příprava	34

<b>4.2. Měření Ramanových spekter a jejich vyhodnocování</b>	<b>37</b>
4.2.1. Měření Ramanových spekter	37
4.2.2. Měření na Ramanově mikroskopu	38
4.2.3. Metody multivariantního statistického zpracování souborů experimentálních dat (faktorová analýza)	38
4.2.4. Vyhodnocování naměřených Ramanových spekter	40
<b>4.3. Měření absorpčních spekter a jejich vyhodnocování</b>	<b>42</b>
<b>4.4. Měření CD spekter a jejich vyhodnocování</b>	<b>43</b>
<b>5. VÝSLEDKY MĚŘENÍ</b>	<b>45</b>
<b>5.1. Absorpční spektra a určení koncentrace zásobních vzorků</b>	<b>45</b>
<b>5.2. Ramanova spektra</b>	<b>49</b>
5.2.1. Změny Ramanových spekter s rostoucí teplotou	49
5.2.2. Rozdíly Ramanových spekter kvadruplexů při ochlazování a ohřívání	56
5.2.3. Faktorová analýza termálních křivek kvadruplexů	62
5.2.4. Rozdíly spekter ostatních oligonukleotidů se spektrem S-G15	68
5.2.5. Zkoumání krystalků A-G15 na pomoci Ramanovy mikroskopie	70
<b>5.3. CD spektra</b>	<b>75</b>
<b>DISKUZE VÝSLEDKŮ</b>	<b>83</b>
<b>DOSLOV / ZÁVĚR</b>	<b>85</b>
<b>SEZNAM VYUŽITÝCH ZDROJŮ</b>	<b>86</b>
<b>SEZNAM TABULEK</b>	<b>88</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ</b>	<b>89</b>
<b>SEZNAM GRAFŮ</b>	<b>90</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK</b>	<b>92</b>

## Úvod

Cílem této práce je shrnout aktuální poznatky o guaninových kvadruplexech a rozšířit je o výsledky vlastního experimentu. Tyto nekanonické polymorfni struktury jsou již delší dobu pokládány za velice důležitou součást řízení genové exprese a zajímavý materiál pro nanotechnologie založené na samoskladných biomolekulách.

G-kvadruplexy vznikají z úseků nukleových kyselin bohatých na guaninové repetice, a to i za fyziologicky relevantních podmínek. V současné době byl jejich výskyt potvrzen i v nukleových kyselinách živých buněk (Manna, et al., 2018). V různých částech genetické informace lidí i dalších organismů se prokazatelně nachází sekvence, které za podmínek dosažitelných v buňce kvadruplexy tvoří, a teoreticky tak poskytují různé možnosti pro vznik vyšších prostorových struktur nukleových kyselin o různé stabilitě a s různou konformací. Vzhledem k tomu, jak velký význam má prostorové uspořádání genetické informace se tak předpokládá, že se kvadruplexy mohou účastnit některých stěžejních procesů v živých systémech, spojených zejména s regulací exprese genetické informace a procesů spojených s udržováním koncových sekvencí chromozomů (Palacký, 2012).

Proto může mít výzkum kvadruplexů velký význam v medicíně při vývoji nových léků, zahrnující i nanotechnologické aplikace. Mnoho týmů po celém světě se tak tímto tématem aktivně zabývá.<sup>1</sup>

V experimentální části této práce jsme se pokusili k existujícím poznatkům přispět tím, že jsme studovali vlastnosti pěti sekvencně příbuzných, poměrně jednoduchých oligonukleotidů, schopných tvořit kvadruplexy, konkrétně jejich stabilitu a konformační přechody mezi různými formami. Zkoumali jsme zejména chování kvadruplexů v roztocích s vysokými koncentracemi oligonukleotidů, a to pomocí Ramanovy spektroskopie, která je za těchto podmínek zvláště užitečná. Z hlediska zkoumání kvadruplexů je takový experiment zajímavý, neboť v jádrech buněk je koncentrace nukleových kyselin velmi vysoká. Provedli jsme měření absorpčních a CD spekter těchto oligonukleotidů při nižších koncentracích, abychom ověřili či rozšířili výsledky, získané jinými autory.

---

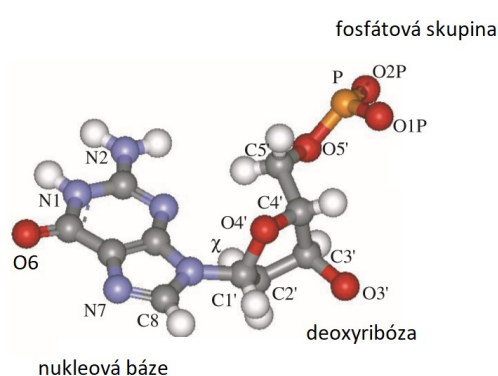
<sup>1</sup> Web of Science (<https://apps.webofknowledge.com/>) eviduje v posledních letech více než 500 článků ročně, zabývajících se tématem G-kvadruplexů



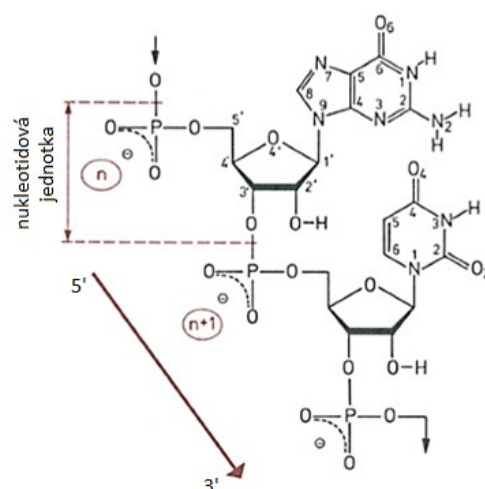
# 1. Obecný úvod do studia kvadruplexů

## 1.1. Chemická struktura nukleových kyselin

Nukleové kyseliny (RNA - ribonukleové kyseliny, DNA - deoxyribonukleové kyseliny) jsou biopolymery s velkým biologickým významem, jejichž prostřednictvím je uchovávána a exprimována genetická informace všech živých organismů, včetně virů. Základní stavební jednotkou těchto makromolekul je nukleotid, složený ze zbytku kyseliny fosforečné, z cukru (konkrétně z ribózy u RNA či deoxyribózy u DNA) a z nukleové báze (viz obrázek 1). Tyto nukleotidy jsou na sebe navázány přes zbytky kyseliny fosforečné (neboli fosfáty) a pentózoové cykly cukrů (viz obrázek 2). Fosfátová skupina je v oblasti fyziologicky relevantních pH plně disociovaná ( $pK_a \sim 1$ , (Saenger, 1984)), nese záporný náboj a je odpovědná za kyselý polyanionický charakter nukleových kyselin. Vlákna vytvořená z nukleotidů vzájemně propojených fosfátovými skupinami mezi 3' a 5' pozicemi sousedních cukrů jsou tedy orientována a mají směr. Označujeme je jako polynukleotidy. V případě kratších sekvencí se jednotlivé vlákno označuje jako oligonukleotid. Dle konvence se pak pořadí nukleotidů zapisuje ve směru 5'→3'; obvykle se tento směr značí pouze jako 5'→3'. Struktura takto propojených cukrů a fosfátů označujeme jako cukr-fosfátovou kostru DNA (Saenger, 1984).

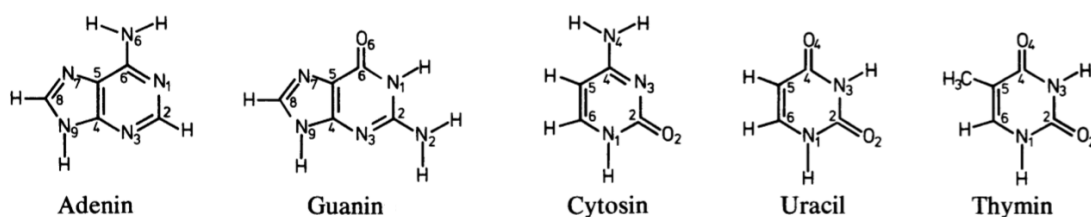


Obrázek 1: Guaninový nukleotid.  
Převzato z (Parkinson, 2006) a  
upraveno.



Obrázek 2: Navázání nukleotidů  
do vlákna nukleové kyseliny.  
Převzato z (Saenger, 1984) a upraveno.

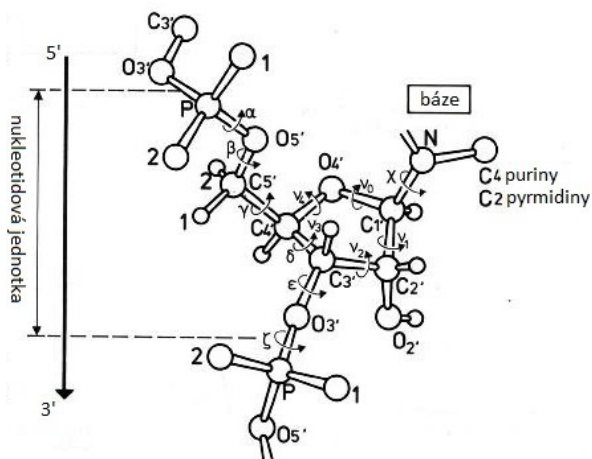
Na cukr-fosfátovou kostru jsou navázané nukleové báze, u nichž lze rozlišit dvě odlišné chemické skupiny: purinové báze (adenin a guanin) a pyrimidinové báze (cytosin a thymin u DNA, cytosin a uracil u RNA). Pořadí bází v řetězci kóduje pořadí aminokyselin v proteinech nebo má regulační funkci při expresi genetické informace (Saenger, 1984). Chemická struktura konkrétních bází je znázorněna na obrázku 3. V různých organizmech se však mohou v malém množství přirozeně nacházet i některé další, tzv. minoritní báze, například hypoxantin, 2-amino-adenin, a stejně tak je možné v DNA nalézt uracil nebo v RNA thymin (Palacký, 2012).



Obrázek 3: Nejobvyklejší báze v nukleových kyselinách. Převzato z (Saenger, 1984).

## 1.2. Prostorová struktura nukleotidu

Aromatické heterocykly nukleových bází lze považovat v prvním přiblížení za planární struktury, což ovšem neplatí o cyklickém cukru ribózy či deoxyribózy, vazbách v cukr-fosfátové kostře ani o vazbě mezi bází a cukrem. Pro popis konformace nukleotidu v prostoru se tak užívají takzvané torzní úhly (viz obrázek 4 a tabulka 1), přičemž pro každý takový úhel platí určitá omezení jeho velikosti daná primární strukturou DNA a ostatními torzními úhly, více viz (Saenger, 1984). Velikost jednotlivých úhlů má pak významný vliv na strukturu zaujímanou vláknem i na její stabilitu, kdy nejstabilnější jsou struktury s minimální energií potřebnou k udržení struktury (Parkinson, 2006).



Obrázek 4: Torzňí úhly v nukleotidu.  
Převzato z (Saenger, 1984) a  
upraveno.

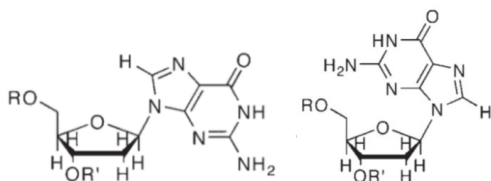
Torzňí úhel	Atomy vymezující úhel
$\alpha$	$_{(n-1)}O_3' - P - O_5' - C_5'$
$\beta$	$P - O_5' - C_5' - C_4'$
$\gamma$	$O_5' - C_5' - C_4' - C_3'$
$\delta$	$C_5' - C_4' - C_3' - O_3'$
$\epsilon$	$C_4' - C_3' - O_3' - P$
$\xi$	$C_3' - O_3' - P - O_{5'(n-1)}$
$\chi$	$O_4' - C_1' - N_1 - C_2$ pyrimidiny $O_4' - C_1' - N_9 - C_4$ puriny
$\nu_0$	$C_4' - O_4' - C_1' - C_2'$
$\nu_1$	$O_4' - C_1' - C_2' - C_3'$
$\nu_2$	$C_1' - C_2' - C_3' - C_4'$
$\nu_3$	$C_2' - C_3' - C_4' - O_4'$
$\nu_4$	$C_3' - C_4' - O_4' - C_1'$

Tabulka 1: Vymezení torzňích úhlů  
v nukleotidu. Převzato z (Saenger,  
1984) a upraveno.

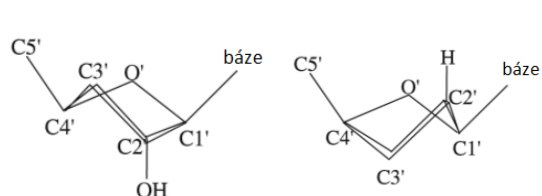
Pro snazší orientaci lze rozdělit prostorové uspořádání nukleotidu do tří složek, které jsou těmito torzňími úhly určeny. Lze tak zvlášt' zkoumat konformaci cukru, glykosidický torzňí úhel určující orientaci vazby mezi bázi a cukrem a torzňí úhly cukr-fosfátové kostry.

Torzňí úhly cukr-fosfátové kostry bývají vzhledem k orientaci bází omezené a nabývají pouze některých hodnot. Zvláště při spojení více vláken do duplexu nebo složitějších struktur (viz dále) je jejich rozmezí značně omezeno (Parkinson, 2006). Protože se v naší práci těmito úhly nebudeme významněji zabývat, pro více informací odkazujeme na literaturu, např. (Saenger, 1984).

U glykosidického torzňího úhlu jsou konformační možnosti také omezeny okolím a v nukleových kyselinách se tak obvykle vyskytují pouze dvě preferované orientace – syn ( $0^\circ < \chi < 90^\circ$ ) a anti ( $120^\circ < \chi < 180^\circ$ ), kde  $\chi$  značí torzňí úhel z obrázku 4. Ilustraci těchto preferovaných úhlů poskytuje obrázek 5.



Obrázek 5: Glykosidické torzňí úhly,  
uspořádání anti (vlevo) a syn (vpravo).  
Převzato z (Palacký, 2012), původ  
obrázku viz citace tam.



Obrázek 6: Konformace cukru  
C3'-endo v ribóze (vlevo) a C2'-endo  
v deoxyribóze (vpravo).  
Převzato a upraveno z (Parkinson, 2006).

Konformace cyklického cukru (v anglické literatuře označovány jako „sugar puckering“) je možné odlišit podle polohy určitých atomů vzhledem k rovině, v níž se nachází ostatní atomy tvořící 5-členný cyklus cukru (tj. atomy C1', C2', C3', C4' a O4'; viz obrázek 1). U atomů, které leží mimo tuto rovinu (určenou ostatními třemi nebo čtyřmi atomy cukru), následně určíme, nachází-li se v polorovině, v níž leží i nukleová báze (endo polorovina) či mimo ni (exo polorovina). Podle atomů ležících mimo takto vytyčenou rovinu cukru (označme takový atom nyní X) pak konformaci cukru označujeme jako X-endo nebo X-exo. V případě dvou atomů ležících mimo rovinu (určenou zbylými třemi atomy) pak nazýváme konformaci podle obou dvou těchto atomů, X-endo/Y-exo.

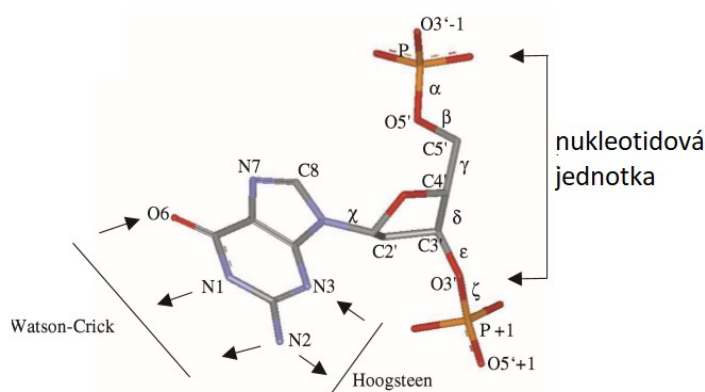
Teoretická konformační flexibilita cukrů v nukleotidech (a zejména vyšších strukturách) je ovšem kvůli navázaným bázím opět významně omezena. V duplexech se cukry obvykle vyskytují pouze v jedné ze dvou možných konformací, konkrétně C2'-endo a C3'-endo (Saenger, 1984), viz obrázek 6.

Na závěr tohoto oddílu poznamenejme, že mezi konformacemi cukrů C2'-endo, resp. C3'-endo, a glykosidickým torzním úhlem  $\chi$  existuje spojitost, kdy C2'-endo puckering se nejčastěji pojí s konformací syn a C3'-endo puckering se obvykle objevuje v kombinaci s konformací anti, viz citace v (Palacký, 2012).

### 1.3. Nekovalentní interakce mezi bázemi

Ve vodných roztocích zaujímá vlákno DNA či RNA prostorovou konfiguraci, která závisí na okolním prostředí, zejména na interakci s okolními molekulami vody a různými ionty, kde velký vliv hraje záporný náboj na cukr-fosfátové kostře (coulombická interakce). Ve vodných roztocích se hydrofobní báze řetězců orientují k sobě a vodnému okolí vystavují hydrofilní cukr-fosfátovou kostrou. Přírozené odpuzování záporně nabitých řetězců je stíněno hydratační obálkou a kationty z okolního prostředí. Při zaujímání této konfigurace dochází k nekovalentním interakcím mezi bázemi, realizovanými vodíkovými můstky (Parkinson, 2006). Tyto interakce jsou sice poměrně slabé (v porovnání s kovalentními vazbami), nicméně je-li vodíkovými můstky spojeno více bází, je vzniklá struktura stabilní. Kromě stabilizace duplexu jsou tyto tzv. slabé interakce mezi bázemi stěžejním mechanismem pro přenos a čtení genetické informace (Palacký, 2012).

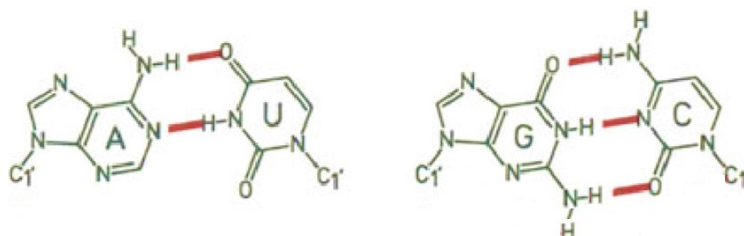
Na každé bázi se nachází několik vhodných vodíků a několik vhodných atomů s ne vazebným elektronovým párem, k potenciálně vhodných k vytvoření vodíkového můstku. Jedná se o takové vodíky, které jsou navázány na dostatečně elektronegativní prvek (například kyslík nebo dusík, konkrétní příklady na guaninu viz obrázek 7), který vodíkový elektron silně přitahuje a na vodíku tak vzniká parciální kladný náboj. Takto částečně nabitý vodík je pak přitahován k ne vazebným elektronovým párům jiných atomů. Podle toho, které atomy jsou nakonec k vodíkovým můstkům využity, většinou rozlišujeme Hoogsteenovo a Watsonovo-Crickovo párování bází (Parkinson, 2006).



Obrázek 7: Možná vazebná místa pro vodíkové můstky na guaninu. Převzato z (Parkinson, 2006) a upraveno.

### 1.3.1. Watsonovo-Crickovo párování bází

Nejobvyklejší je standardní, tzv. Watsonovo-Crickovo párování, které je realizováno dvěma vodíkovými můstky mezi adeninem a thyminem (resp. uracilem v RNA) a třemi můstky mezi guaninem a cytosinem, viz obrázek 8. Vlákna vytvořená z těchto dvojic bází s pak označují jako komplementární (Saenger, 1984).



Obrázek 8: Watsonovo-Crickovo párování bází v DNA. Interakce vodíkových můstků jsou vyznačeny hnědě. Převzato z (Saenger, 1984) a upraveno.

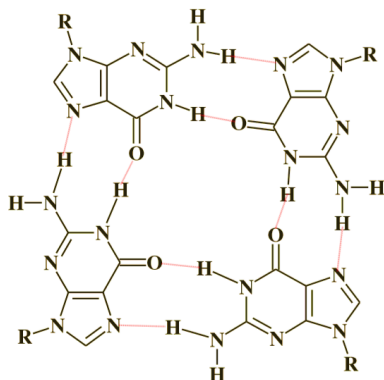
Nejobvyklejším uspořádáním, které DNA při tomto typu interakce přirozeně zaujímá, je helikální struktura (šroubovice). Pokud je tvořena ze dvou vláken, jedná se o dvoušroubovici, duplex. Vlákna jsou obtočena kolem společné osy a jsou vůči sobě opačně (antiparalelně) orientována (jedno vlákno tedy vede ve směru 5'→3', druhé naopak ve směru 3'→5'). Tento typ uspořádání lze dále charakterizovat podle parametrů jednotlivých závitů (stoupání, počet párů bazí na závit, jejich sklon či umístění vzhledem k ose duplexu) a levo- či pravotočivé orientace závitů, více viz například (Saenger, 1984). Příkladem takové šroubovice je nejobvyklejší pravotočivý duplex B-DNA, jehož prostřednictvím je uchovávána genetická informace většiny živých organismů, přičemž vzhledem ke komplementaritě vláken nese každé z nich stejnou informaci (Saenger, 1984).

Dvoušroubovice B-DNA však není jediné možné uspořádání vláken DNA (resp. RNA). V přirozených i umělých podmínkách lze nalézt samostatná vlákna, vlásenky, tři a více vláken spojených dohromady, případně je možné najít i helikální struktury tvořené DNA a RNA zároveň a různé další komplikovanější struktury kombinující předešlé (například v t-RNA nebo ribosomální RNA); více viz citace v (Palacký, 2012).

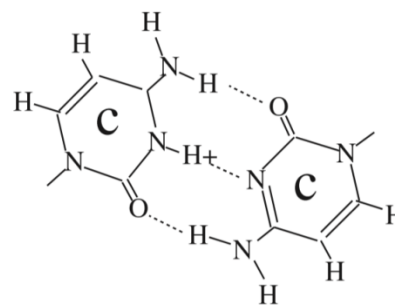
### *1.3.2. Hoogsteenovo párování a guaninové tetrády*

Kromě standardního Watsonova-Crickova párování jsou možné také další spojení nukleotidů pomocí Hoogsteenových vodíkových můstků, v důsledku čehož pak vznikají některé tzv. nekanonické struktury. Příkladem takových struktur jsou guaninové tetrády (viz obrázek 9), které vznikají při dostatečné koncentraci guanosin-monofosfátu v roztocích za přítomnosti určitých kationtů zcela samovolně. Poskládá-li se na sebe několik G-tetrád v důsledku slabých hydrofobních interakcí a propojí-li se nukleotidy do řetězců, vytvoří se stabilní struktura označovaná jako kvadruplex (Parkinson, 2006). Takové uspořádání je možné i v oligonukleotidech a polynukleotidech obsahujících opakující se sekvence guaninu (alespoň dvou, obvykle tří) oddělené krátkými úseky jiného složení, většinou sekvencemi adeninu a thyminu (TTA, TT) (Palacký, 2012). Pro tvorbu a stabilitu G-tetrád a kvadruplexů je nutné, aby se do volného prostoru mezi guaniny včlenily kationty menšího kovového prvku (například Na<sup>+</sup> či K<sup>+</sup>) a kompenzovali elektrostatickou repulzi atomů kyslíku (nesoucích parciální záporný náboj) orientovaných to středu G-tetrády (Parkinson, 2006). Bez jejich přítomnosti je, v porovnání s Watsonovým-Crickovým párováním,

tvorba kvadruplexové struktury pomalejší. S přidáním vhodných iontů se kinetika tohoto procesu zrychluje, bez ní však při nízkých koncentracích nukleotidů může tvorba kvadruplexů trvat v některých případech i léta (Palacký, 2012).



Obrázek 9: Guaninová tetráda; Hoogsteenovy vodíkové můstky jsou vyznačeny červeně. Převzato z (Riou, Gomez, Morjani, & Trentesaux, 2006).



Obrázek 10: Struktura i-Motivu vytvořená mezi cytosiny; vodíkové můstky jsou vyznačeny tečkovaně. Převzato z (Parkinson, 2006).

### 1.3.3. *i*-Motiv a další nekanonické struktury

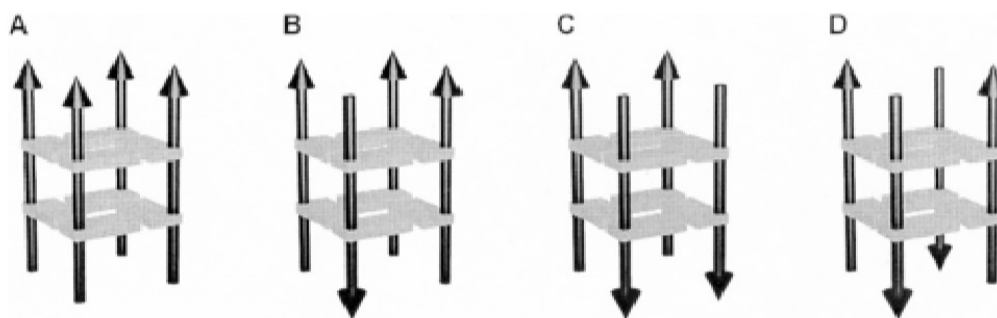
Jiné než Watsonovo-Crickovo párování lze pozorovat i u cytosinu, kde je nejčastěji takto vzniklou strukturou *i*-Motiv (obrázek 10). Tato struktura se může tvořit ve vláknech komplementárních k vláknům vhodným pro tvorbu G-kvadruplexů. *i*-Motivy se mohou také stohovat (vertikální stacking interakce) a tvořit komplexnější struktury, jsou však mnohem méně obvyklé a méně stabilní než guaninové kvadruplexy. Jejich stabilita roste se snižujícím se pH, protože ke vzniku struktury je třeba navíc, aby jeden z cytosinů byl protonovaný. Konformace cytosinů v *i*-Motivu je pak obvykle C3'-endo/anti (Parkinson, 2006).

V současnosti je už známo, že tetrády, a následně vícevláknové nekanonické struktury DNA, mohou tvořit i jiné báze než guanin; pozorovány byly dokonce i pentády, hexády, atd., případně tetrády kombinující párování různých bází, například G:C:G:C, G:T:G:T, nebo A:T:A:T (Tran, et al., 2013). Nejobvyklejší a nejčastěji studované jsou však kvadruplexy tvořené G-tetrádami v DNA a RNA (Parkinson, 2006).

#### 1.4. G-kvadruplexy a jejich druhy

Guaninové kvadruplexy mohou být rozděleny na základě různých kritérií do několika podtypů. Na to, jaký typ (neboli topologii) kvadruplexu daný úsek nukleové kyseliny nejpravděpodobněji zaujme, mohou mít vliv různé faktory. Předně je to konkrétní sekvence oligonukleotidu, tedy pořadí bází v řetězci, nicméně i pro stejnou sekvenci mohou existovat různé topologie. Vliv na strukturu mají dále koncentrace nukleové kyseliny v roztoku, přítomnost a typ stabilizujících iontů nebo vnější fyzikální podmínky jako například teplota (Parkinson, 2006).

Nejprve se zaměříme na samotné možné topologie. Prvním z možných dělení kvadruplexů je rozlišení na základě polarit jednotlivých vláken, vytvářejících kvadruplex. Snadno lze nahlédnout, že teoreticky mohou vznikat čtyři kombinace polarit (viz obrázek 11).



Obrázek 11: Možné polarity vláken v kvadruplexech (cukr-fosfátová kostra značena šipkou, guaniny v kvadruplexech značeny čtyřúhelníky).

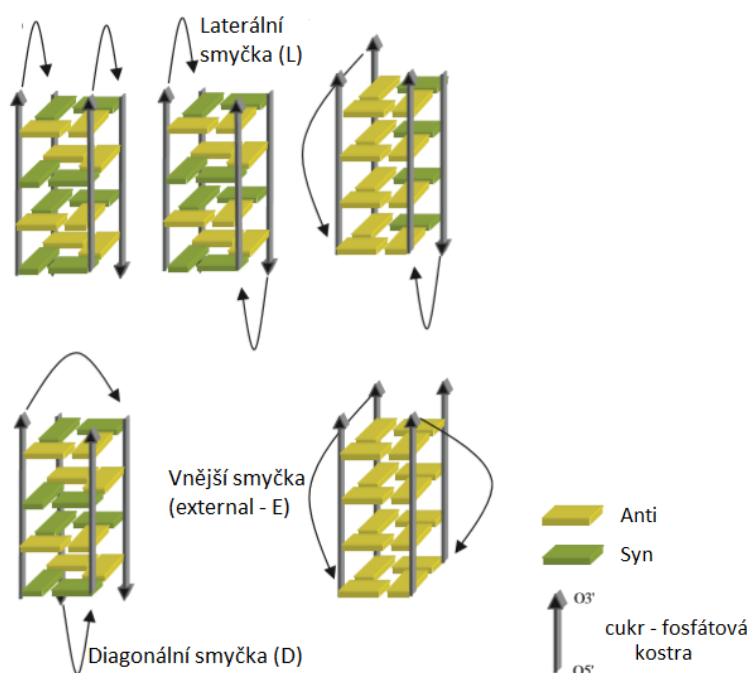
A - paralelní uspořádání, B - 3+1 uspořádání, C a D – dvě možnosti antiparalelního uspořádání. Převzato z (Palacký, 2012), originál viz citace tam.

Dalším triviálním rozlišovacím kritériem může být množství G-tetrád spojených stohovací interakcí dohromady. Minimální počet jsou dvě tetrády (např. v TBA aptaméru), ale často jsou to tři a více G-tetrád za sebou. Každý z účastnících se úseků oligonukleotidu musí obsahovat alespoň tolik guaninů, kolik je G-tetrád (Parkinson, 2006). Podobně je možné třídit kvadruplexy dle počtu vláken, z nichž se skládají. Nachází-li se v sekvenci právě jeden úsek s repetitivním guaninem, je třeba k vytvoření kvadruplexu čtyři taková vlákna. Tento typ kvadruplexu, který předpokládá spojení čtyř samostatných vláken, se vyskytuje v paralelní formě s převážnou konformací guanosinu C2'-endo/anti, a bývá



označován jako intermolekulární (nebo tetramolekulární) kvadruplex (Parkinson, 2006).

Nalézají-li se v sekvenci alespoň dva dostatečně dlouhé úseky s repetitivním guaninem, vzniká s vyšší pravděpodobností dimerický (bimolekulární) kvadruplex, složený ze dvou vláken. Možných topologií je v tomto případě více, viz například obrázek 12. Aby bylo možné strukturu kvadruplexu vytvořit, musí dojít k ohybu vláken. Tyto ohyby v podobě smyček (překlad z anglického označení *loops*, jejich základní typy viz obrázek 12) se liší podle délky a sekvence smyčky; vliv může mít i orientace vláken v kvadruplexu a další faktory. (Parkinson, 2006).



Obrázek 12: Příklady bimolekulárních kvadruplexů s různými typy smyček a s ukázkou možných glykosidických torzních úhlů u jednotlivých guaninů (znázorněno čtyřúhelníky). Převzato z (Parkinson, 2006) a upraveno.

Při přítomnosti čtyř repetitivních G sekvencí v jednom oligonukleotidu může vzniknout takzvaný intramolekulární kvadruplex pouze z jednoho vlákna. Vzhledem k vyššímu počtu smyček se zvyšuje různorodost možných uspořádání vláken. V praxi jsou pozorovány ale jen některé z nich, pro příklady viz obrázek 13 (Parkinson, 2006).



Obrázek 13: Příklady možných intramolekulárních kvadruplexů. Cukr-fosfátová kostra značena šipkou, guaniny v kvadruplexech jsou značeny čtyřúhelníky, zbylé báze ve smyčkách nejsou vyznačeny. Převzato z (Palacký, 2012), originál viz citace tam.

Kromě zmiňovaných kvadruplexů složených z jednoho, dvou případně čtyř oligonukleotidů jsou možné i další, méně obvyklé struktury. Například u oligonukleotidů obsahujících repetitivní guaniny na svých koncích byly pozorovány případy, kdy se na tvorbě kvadruplexů podílelo až osm vláken. Obdobně pak byly pozorovány případy, kdy byly dvě G-tetrády kvadruplexu tvořeny kompletně z jednoho vlákna, ale jeden guanin v třetí tetrádě pocházel z vlákna jiného. Topologie a orientace vláken těchto uspořádání pak může a často také odpovídá situacím popsaným výše (Parkinson, 2006).

## 1.5. Stabilita a konformace kvadruplexů v závislosti na prostředí a sekvenci oligonukleotidu

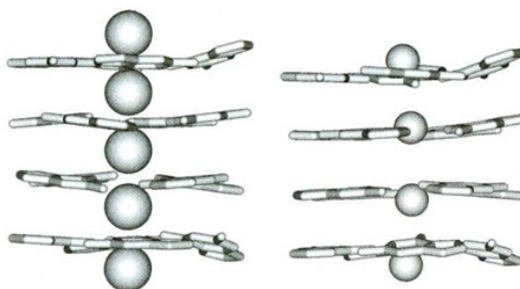
Na stabilitu kvadruplexů mají vliv různé faktory, nejvýznamnější pak přítomnost a typ kationtů, koncentrace oligonukleotidu, teplota a další fyzikálně chemické faktory, které v tomto oddílu podrobněji rozebereme.

### 1.5.1. Stabilizující kationty

Pro strukturu kvadruplexů, a zejména pro jejich stabilitu, jsou klíčové malé kovové kationty. Zmíněná stabilizace probíhá dvěma způsoby – skrze obsazování dutin uvnitř G-kvartetů a skrze stabilizaci cukr-fosfátové kostry. Při interakci s cukr-fosfátovou kóstrou dochází ke stínění záporného náboje na fosfátových skupinách, zatímco při obsazování vnitřní dutiny se kationty koordinují na exocyklické keto-skupiny, kde kyslíky O6' nesou parciální záporný náboj (Parkinson, 2006).

Kvadruplexy mohou pomoci vytvořit a stabilizovat nejrůznější kationty, některé ionty jsou však příliš malé a jejich vliv je tak minimální (např.  $\text{Li}^+$ ), nebo

jsou naopak příliš velké a strukturu tak spíše narušují (Largy, et al., 2016). Velikost iontů se kromě prostorového omezení projevuje i ve způsobu jejich lokalizace. Podíváme-li se například na fyziologicky významné jednomocné kationty  $\text{Na}^+$  a  $\text{K}^+$ , tak zatímco malé sodné ionty přímo pasují do otvoru v G-tetrádě, větší draselné ionty jsou lokalizované mezi tetrádami, viz obrázek 14 (Palacký, 2012).

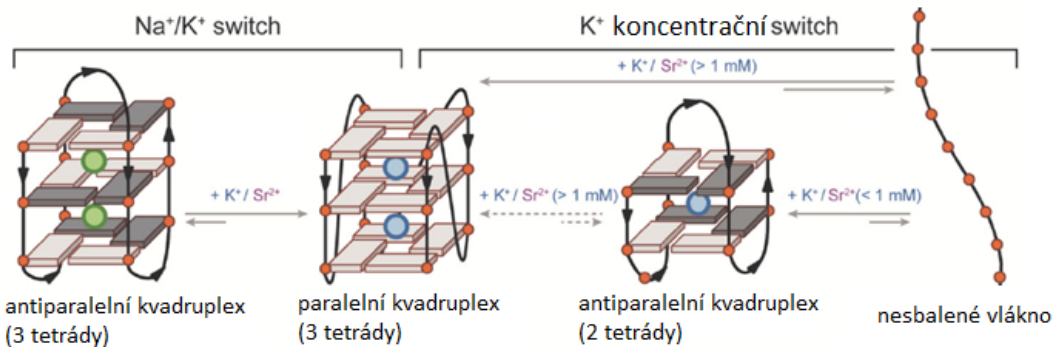


Obrázek 14: Schematické znázornění stabilizace kvadruplexů  $\text{K}^+$  ionty (vlevo) a  $\text{Na}^+$  ionty (vpravo). Převzato z (Palacký, 2012), originál viz citace tam.

Seřadíme-li pak různé ionty dle jejich stabilizačních účinků na kvadruplexy, získáváme pořadí, viz zdroje v práci (Largy, et al., 2016):

$$\text{Sr}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{K}^+ > \text{Ca}^{2+} > \text{Na}^+/\text{NH}_4^+/\text{Rb}^+ > \text{Mg}^{2+} \gg \text{Li}^+ \geq \text{Cs}^+ \quad (1)$$

Ukazuje se také, že některé ionty mají různé stabilizační účinky pro různé konformace kvadruplexů, přičemž změna iontů může dokonce vyvolat u některých oligonukleotidů změnu konformace. Tato změna, tzv. „interquadruplex switch“ (viz obrázek 15), se v případě fyziologicky významných iontů  $\text{Na}^+$  a  $\text{K}^+$  vyskytuje ve dvou typech. Prvním z nich je rychlé nahrazení  $\text{Na}^+$  iontů  $\text{K}^+$  ionty (za pokojové teploty se odehrává v řádu několika sekund), přičemž stačí pouze nízká koncentrace dodaného  $\text{K}^+$ . Druhým typem je pak změna struktury způsobená dodáním malého množství kationtů ( $\text{K}^+$ , případně i  $\text{Sr}^{2+}$ ), kdy při koncentracích nižších než 1 mM dochází k preferenci antiparalelního G-kvadruplexu vážícího pouze jeden kation (a který je pak tvořen pravděpodobně pouze dvěma tetrády), a pro koncentrace nad 1 mM pak začíná převažovat paralelní struktura. Tyto kationty řízené „switch“ mohou mít v živých systémech (*in vivo*) fyziologický význam – uvnitř buněk je výrazně vyšší koncentrace  $\text{K}^+$  iontů a v extracelulárním prostoru zase převažují  $\text{Na}^+$  ionty. Využití mohou mít také v nanotechnologických aplikacích (Largy et al., 2016).



Obrázek 15: Možné konformační přepínání (switch) kvadruplexů způsobené změnou typu iontů, případně jejich koncentrací v roztoku. Převzato z (Largy et al., 2016) a upraveno.

### 1.5.2. Vliv dalších látek v roztoku

Pro stabilitu a konformaci kvadruplexů jsou kromě malých kationtů podstatné i další látky, vyskytující se v okolním prostředí (v případě *in vitro* studií v roztoku). V této sekci se zaměříme na vliv ligandů snadno interagujících s kvadruplexy, jiných nukleových kyselin, koncentrace samotných nukleotidů, molekul vody, látek vyvolávajících oxidativní stres a také vliv dalších biomolekul přítomných zejména *in vivo* v živých systémech.

Jak již bylo zmíněno, ovlivňování stability kvadruplexů může probíhat navazováním specifických, snadno se vážících molekul (tzv. ligandů) na kvadruplexy. Molekuly s touto vlastností jsou poměrně různorodé, více se jim věnuje například práce (Palacký, 2012). Obecně může interakce takovýchto ligandů s G-kvadruplexy nastat v oblasti smyček, vnějších žlábků nebo v oblasti koncových tetrád – ve všech těchto případech se pak obvykle jedná o stabilizační procesy. Schopnost ligandů navázat se na kvadruplexy je samozřejmě také ovlivněna fyzikálně-chemickými podmínkami v roztoku (Giancola & Pagano, 2013).

Stěžejní jsou také další oligonukleotidy přítomné v roztoku. Nachází-li se v roztoku s G-kvadruplexy vlákna bohatá na cytosin, jsou preferovány struktury s Watsonovými-Crickovými vodíkovými můstky na úkor Hoogsteenových můstků a struktura kvadruplexů prakticky nevzniká nebo, byla-li před přidáním nukleotidů přítomná, dokonce zaniká. Výjimkou jsou některé draslíkem silně stabilizované kvadruplexy (například v telomerních sekvencích *Tetrahymena* či v promotoru

*c-myc*), které ani při vysoké koncentraci komplementárních vláken nezanikají. Dokonce může dojít i k tomu, že za nižších hodnot pH (méně než 4,5) či za výrazně vysokých teplot dojde k rozdělení Watsonovy-Crickovy šroubovice a v úsecích bohatých na guanin se utvoří G-kvadruplexy (komplementární vlákno vytvoří i-Motiv struktury), více o tomto tématu lze nalézt v textu (Parkinson, 2006).

Koncentrace samotného zkoumaného oligonukleotidu může mít na stabilitu také vliv. Ukazuje se, že při užití různých metod výzkumu kvadruplexů jsou někdy získávány rozdílné výsledky, přičemž vysvětlením by mohla být právě zmíněná rozdílná koncentrace oligonuklotidů použitá v experimentech (Palacký, et al., 2013). Výjimkou jsou intramolekulární kvadruplexy, pro které by koncentrace neměla mít vliv na jejich stabilitu a tedy ani na jejich teplotu tání. Této skutečnosti je možné využít při určování molekularity kvadruplexu (tj. počtu interagujících vláken). Obvykle se k tomu využívá porovnání termálních průběhů při ohřívání a ochlazování, resp. přítomnost nebo absence hystereze (Palacký, 2012).

Vliv na stabilitu kvadruplexů má i stupeň hydratace, tj. dostupnost molekul vody z okolního prostředí pro tvorbu vodní obálky, ovlivňující mimo jiné stohování jednotlivých G-tetrád do kvadruplexu, při kterém se hydrofobní báze schovávají dovnitř struktury a minimalizují tak svůj povrch interagující s okolím, a tedy i kontakt s vodou. Obecně se jedná o důsledek kombinace elektrostatických, hydrofobních a slabých van der Waalsových sil. U paralelních kvadruplexů je vliv vody ještě výraznější, neboť molekuly vody vyplňují čtyři široké žlábků vznikající na vnější straně kvadruplexů. Oproti tomu u antiparalelních kvadruplexů jsou žlábků užší, s komplikovanější strukturou, a není v nich tolik místa pro větší množství molekul vody ovlivňujících stabilitu kvadruplexu (Parkinson, 2006).

Kromě stabilizujících vlivů existují i jiné jevy, působící naopak destabilizaci kvadruplexů. Příkladem takového jevu je oxidační stres, kdy se při zkoumání sekvencí přítomných v lidských telomerách (více o telomerách viz dále) prokázalo, že oxidace guaninu pomocí reaktivních forem kyslíku (*reactive oxygen species*, ROS) na pozici C8 guaninu v kvadruplexu snižují ve většině případů schopnost guaninu tvořit vodíkové můstky a tedy i stabilitu kvadruplexu. Při navázání na některé konkrétní nukleotidy v této telomerní sekvenci k destabilizaci sice nedochází, je však přítomný vliv na konformaci kvadruplexu, kdy je u C8-oxidovaných guanosinů významně preferována konformace C2'-endo/syn (Bielskute, et al., 2019).

V neposlední řadě mají na stabilitu kvadruplexů vliv i různé biomolekuly. Pokud je v roztoku velké množství jiných molekul (například v systémech *in vivo* se v cytosolu, v jádru i mezibuněčném prostoru nachází různé bílkoviny, další nukleové kyseliny, atd. – jen samotné biomolekuly tvoří 20-40% obsahu buňky), dochází k efektu tzv. „*molecular crowding*“, kde toto velké množství jiných biomolekul mechanicky omezuje volný prostor pro kvadruplex, čímž ovlivňuje stabilitu jeho různých forem. Stabilizace, případně selektivní destabilizace různých kvadruplexových struktur v DNA v důsledku tohoto efektu, může být významná například pro řízení genové exprese. Konkrétní mechanismy tohoto jevu však nejsou zatím plně popsány. Je známo, že v důsledku „*molecular crowding*“ může být také ovlivněna schopnost kvadruplexů vázat ligandy a obecně i jejich schopnost interagovat s okolím. Existují i konkrétní biomolekuly, které kvadruplexy stabilizují či destabilizují, příkladem mohou být různé enzymy přítomné v buňkách (Miyoshi, et al., 2013).

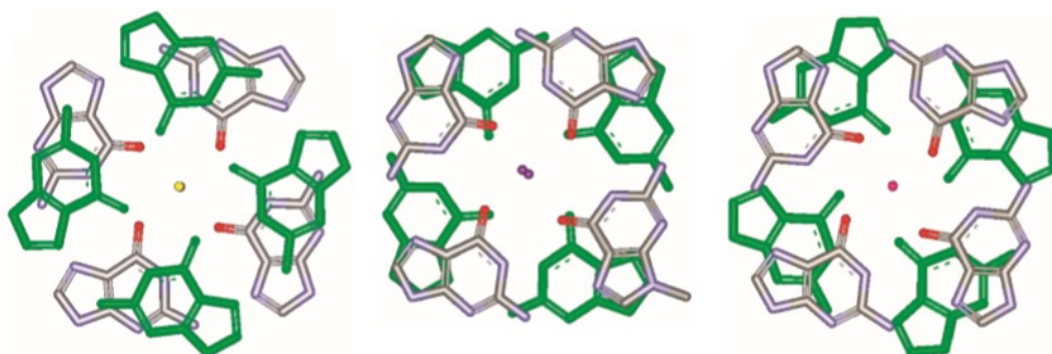
### 1.5.3. Vliv sekvence na stabilitu kvadruplexu

Na finální strukturu bimolekulárních či intramolekulárních kvadruplexů má mimo jiné vliv i délka sekvence ve smyčkách. Tento parametr teoreticky omezuje to, z kolika tetrád může být kvadruplex tvořen (například pro kvadruplex ze čtyř tetrád je třeba 2 a více nukleotidů ve smyčce), a omezen je stejně tak i možný výběr topologií. Například pro vznik diagonální smyčky se musí v dané části sekvence nacházet více než dva nukleotidy (Parkinson, 2006). Experimentálně bylo také zjištěno, že sekvence s jedno-nukleotidovými smyčkami mají obecně sklon k paralelnímu uspořádání vláken s externím protisměrným spojem typu „double-chain reversal“ (Largy, et al., 2016). Se dvěma nukleotidy ve smyčce pak může být uspořádání paralelní i antiparalelní a u tří nebo čtyř nukleotidů je již s vysokou pravděpodobností vždy antiparalelní (Parkinson, 2006). Zatímco výše uvedená závislost byla pozorována u DNA-kvadruplexů, u RNA se zdá, že obecně převažuje paralelní uspořádání (Petraccone, 2013).

Přestože vliv délky smyček na topologii kvadruplexů je solidně prozkoumán, přímá závislost jejich stability na této délce nalezena nebyla (Parkinson, 2006). Pro některé konkrétní situace však spojitost mezi nimi existuje, například v roztocích s vyšší koncentrací  $K^+$  je stabilita kvadruplexů obecně nepřímě úměrná délce smyčky (Largy, et al., 2016).

Ukazuje se také, že je stabilita ovlivněna i tím, o jakou nukleovou kyselinu se jedná. Například u tetramolekulárních kvadruplexů jsou kvadruplexy tvořené vlákny RNA stabilnější než ty z vláken DNA. I množství guaninu ve vláknech má vliv na kinematiku a stabilitu kvadruplexů, kdy při jejich vyšší četnosti probíhá tvorba kvadruplexů rychleji a jsou následně i stabilnější (Palacký, 2012).

Zajímavý je také vliv konformace syn a anti dílčích guanosinů v kvadruplexech v antiparalelním uspořádání, který způsobuje rozdílné stohování tetrad a může tak ovlivňovat tvar dutiny uprostřed kvadruplexu a tím i preference stabilizujících iontů jednotlivých kvadruplexů (Parkinson, 2006).



Obrázek 16: Proměnlivý tvar dutiny uprostřed G-kvadruplexu v závislosti na orientaci guaninů v jednotlivých tetradách. Převzato z (Parkinson, 2006), upraveno.

## 2. Kvadruplexy *in vivo*

Počet studií, potvrzují přítomnost G-kvadruplexů v živých systémech, v posledních letech stále roste. Sekvence schopné tvořit kvadruplexy se nachází v genomech různých druhů eukaryotních organismů, často v regulujících částech (promotory, telomery atd.) a ukazuje se, že zde tyto struktury skutečně mohou za fyziologických podmínek vznikat a pravděpodobně také vznikají (Sengar, et al., 2014). Stejně tak se kvadruplexy mohou vyskytovat i v nukleových kyselinách mimo jádro. Kvůli existenci vnitřního prostoru uprostřed G-tetrád (kanálku) vyplněného ionty a schopnosti intermolekulárních kvadruplexů za určitých podmínek transportovat tímto kanálkem ionty, se o nich například uvažuje také jako o možných iontových kanálcích (Tran, et al., 2013).

Díky svým vlastnostem a existenci *in vivo* jsou kvadruplexy a sekvence bohaté na guanin předmětem výzkumů nanomedicíny, racionálního vývoje nových léků, stejně tak je prováděn výzkum zaměřený na možnost jejich užití jako aptamerů (schopnost vysoce selektivní interakce s cílovou molekulou, např. proteinem, více například v práci (Palacký, 2012)), či výzkumu léčby rakovinných onemocnění a jiných poruch souvisejících se špatným fungováním regulačních oblastí genů (více například článek (Balasubramanian, et al., 2011) a také další oddíl).

V následující části se vzhledem k veliké šíři tématu kvadruplexů v živých systémech zaměříme pouze na část problematiky, která je nejbližší předmětu této práce, tedy zejména na kvadruplexy vznikajících v telomerních sekvencích DNA a jejich aktuální výzkum.

### 2.1. Telomerní sekvence a možný výskyt kvadruplexů

Telomery jsou koncové úseky chromosomů, chránící konce genetické informace uložené ve formě lineární DNA v jádru buňky. Telomery chrání řetězec DNA před nežádoucími interakcemi s okolím (např. interakcí s řetězcem DNA jiného chromosomu), zároveň také řeší tzv. *end replication problem*, tedy nemožnost zkopírovat genetickou informaci na úplném konci vlákna pomocí standardních replikačních systémů. Při replikaci DNA a dělení buněk se koncová část telomer postupně zkracuje (Palacký, 2012). V některých buňkách, jejichž funkce to vyžaduje, je však tomuto zkracování telomer možné zabránit zvláštním replikačním systémem. V kmenových či pohlavních buňkách, případně některých leukocytech nebo



nádorových buňkách (obecně nediferenciovaných či jen částečně diferencovaných a hodně se dělicích buňkách) se proto nachází enzym telomeráza, který při replikaci (a tedy i při každém buněčném dělení) zajišťuje prodloužení takto zkrácených telomer. Používá přitom RNA templátu, sloužícího jako předloha pro doplnění zkrácených sekvencí. V pohlavních a ve většině rakovinných buněk se tak DNA nezkracuje vůbec, v pluripotentních kmenových buňkách jen omezeně. V diferenciovaných buňkách (např. v klasických somatických buňkách) telomeráza obvykle chybí a zde tedy již ke zkracování DNA dochází. Z tohoto důvodu se v telomerech nachází velké množství jednoduchých repetitivních sekvencí, jejichž zkrácení není pro buňku tolik zatěžující jako ztráta samotných genů. Při zkrácení telomer pod určitou délku (tzv. Hayflickovou mez) dojde k řízené smrti buňky, tzv. apoptóze. Zrychlené zkracování telomer vysvětluje některé genetické poruchy, jejichž projevem je právě rychlé stárnutí a odumírání buněk (Palacký, 2012).

Telomery se obecně skládají ze tří navazujících částí: TAS DNA (*telomere associated sequences*), dvouvláknové telomerické DNA a jednovláknového na guanin bohatého převisu (viz obrázek 17). Jak již bylo zmíněno, na koncích telomer se vyskytují repetitivní sekvence, které jsou bohaté na guanin a naopak skoro neobsahující cytosin, což je činí potenciálně vhodnými ke tvorbě kvadruplexů. Předpokládá se, že jednovláknový převís není v buňce sbalen do nukleosomu a slouží jako vazebné místo pro některé telomerické proteiny. Některé z nich by teoreticky mohly přímo vyhledávat při navázání kvadruplexy, jiné by zase mohly usnadňovat tvorbu kvadruplexů nebo jejich narušení. Některé z těchto proteinů jsou společné pro telomerní sekvence i pro narušené části DNA, a to i přes významnou odlišnost těchto sekvencí a rozdílnou funkci daného proteinu (např. oprava poškozené DNA *versus* udržování telomerního převisu, u kterého doplnění komplementárního vlákna není žádoucí). Jakým způsobem je proteiny odlišují, není zatím plně objasněno (Palacký, 2012).

5' - TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG (TTAGGG)<sub>n</sub>TTAGGG -3'  
3' - AATCCCAATCCCAATCCCAATCCCAATCCCAATCCCAATCCCAATC -5'

Obrázek 17: Ukázka telomerní sekvence DNA s převísem bohatým na guanin (značen fialově). Převzato z (Riou, et al., 2006).

Přestože není doposud jasné, jaké všechny struktury doopravdy vznikají přímo v telomerech živých systémů (viz citace v (Palacký, et al., 2013)), současný výzkum

odhaluje mnoho možností pro vznik různých takových struktur. Telomerní sekvence, za fyziologických podmínek skutečně tvoří kvadruplexy a jejich topologie často závisí na typu a koncentraci kationtů, teplotě, atd., což je pro dynamické živé systémy žádoucí. Nejnovější studie pak poukazují na pravděpodobný výskyt kvadruplexových struktur i v lidské telomerní DNA *in vivo*, které obsahují paralelní a kombinaci paralelních a antiparalelních kvadruplexů (Manna, et al., 2018).

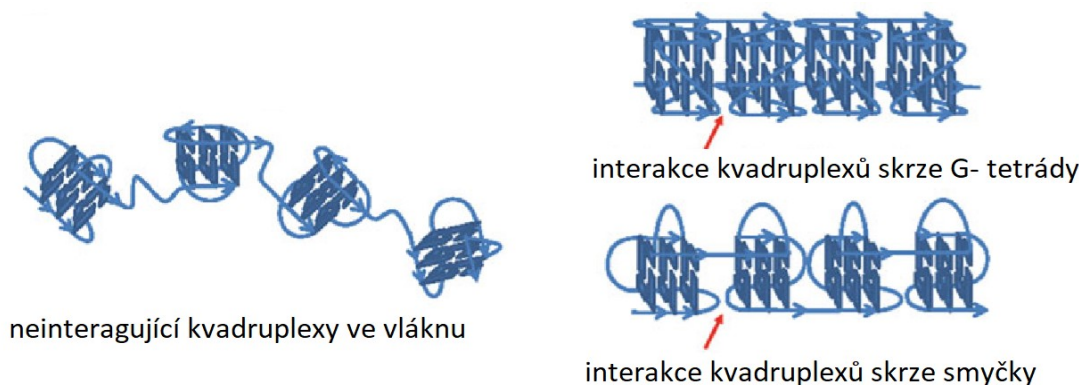
Co se týče konkrétních sekvencí v kvadruplexech telomerních úsecích DNA, typický je výskyt adeninu a thyminu ve smyčkách, přičemž thymin výrazně převažuje. Nejobvykleji se pak v telomerní oblasti vyskytují sekvence s guaninovými repeticemi o délce dvou až čtyř opakujících se guaninů, které jsou spojeny sekvencemi o dvou až čtyřech spojujících nukleotidů, z nichž nejvýše jeden je adenin a zbytek bývá thymin (Parkinson, 2006). V lidských telomerách je typickou repetitivní sekvencí na 3'-konci (tedy u G-bohatého převisu) TTAGGG, přičemž tato struktura také tvoří za dostatečné koncentrace oligonukleotidu i iontů kvadruplexové struktury, viz citace v práci (Palacký, et al., 2013).

Telomery a enzym telomerasa jsou díky výskytu a své aktivitě v rakovinných buňkách zajímavé z hlediska možných medicínských aplikací. Jedním z možných terapií by tak mohla být právě stabilizace potenciálních kvadruplexových struktur, jejichž přítomnost v telomerách by mohla zabránit přístupu telomerázy k DNA a narušit tak jejich prodlužování a prakticky neomezené přežívání nádorové buňky. Kromě stabilizace kvadruplexů by však taková látka musela splňovat ještě mnoho dalších požadavků, umožňující její užití v živých organismech (působení jen na požadované úseky, nepoškození zbylé DNA, průchodnost membránami atd.). Předmětem takového výzkumu jsou například porfyriny, které mimo stabilizaci kvadruplexů mají i vhodnou schopnost kumulovat se v nádorové tkáni, zajišťující cílenost takovéto potenciální léčby (Palacký, 2012).

## 2.2. Vyšší struktury tvořené kvadruplexy v telomerních sekvencích

Vzhledem k délce telomerních sekvencí, vyšší lokální koncentraci DNA v jádrech a molekulárnímu *crowdingu* je možná tvorba struktur vyššího řádu, složených z jednotlivých kvadruplexů (viz obrázek 18). Při *in vitro* experimentech k tvorbě takových struktur dochází, přičemž se ukazuje, že vazby mezi kvadruplexy jsou spíše slabé, pravděpodobně založené na interakcích mezi smyčkami. U RNA sekvencí vznikajících při transkripci telomerní DNA byla tvorba takových

kvadruplexových struktur *in vivo* dokonce potvrzena, přičemž se zdá, že způsoby uspořádání kvadruplexů v těchto strukturách kombinují více předpovídaných možností, převážně však zahrnující stohování tetrad; více viz (Petraccone, 2013) a zdroje uvedené v této práci.



Obrázek 18: Možné vyšší struktury tvořené z jednotlivých kvadruplexů na repetitivních telomerních sekvencích skrze různé interakce. Převzato z (Petraccone, 2013).

### 2.3. Moderní výzkum v telomerách *in vivo*

Problémem studia tvorby kvadruplexů v telomerních sekvencích *in vivo* i *in vitro* je obecně přílišná délka potřebných oligonukleotidů, kde mnoho metod (krystalografie, NMR, některé spektroskopické metody a další) má s takovými měřeními problém. Metody věnující se tomuto výzkumu (ať už *in vivo* nebo *in vitro*) tak musí být složitější a výsledky jsou i složitěji interpretovatelné. Příkladem je měření přístupnosti ligandů k adeninu ve smyčkách a další spíše nepřímé přístupy, více viz (Petraccone, 2013). Jednou z nových přímých metod umožňující tento výzkum je také *in-cell* NMR, nicméně tato metoda má zatím technická omezení (omezení platnosti výsledků jen pro konkrétní buňku v konkrétní fázi svého cyklu při konkrétním chemické složení cytosolu, dále zaměření pouze na malé úseky DNA v buňkách a nízké rozlišení (Hänsel, et al., 2013)). Výkonnost této metody je však možné zvýšit v kombinaci s jinými technikami. Pro zkoumání struktur kvadruplexů v živých buňkách se tak v posledních letech začínají vyvíjet fluorescenční značení, která využívají specifické afinity některých ligandů ke kvadruplexům, a která tak v kombinaci s *in-cell* NMR může vnést nový, přímější pohled na tuto problematiku, viz například práce (Manna, et al., 2018). S vhodným fluorescenčním značením lze

pak například provádět sledování změn množství kvadruplexů na konkrétních místech v buňce v reálném čase (Zhang, et al., 2018), a to i v případě studia RNA, jejíž kvadruplexy se ukazují také jako možné součásti podstatných biologických procesů (Bao & Xu, 2018).

### 3. Experimentální metody studia kvadruplexů

K výzkumu kvadruplexů se užívají různé experimentální metody, založené jak na chemických, tak fyzikálních principech. Mezi nejčastěji využívané patří UV-vis absorpční spektroskopie, cirkulární dichroismus, gelová elektroforéza (PAGE - polyacrilamide gel electrophoresis), nukleární magnetická resonance (NMR), rentgenová krystalografie, fluorescenční spektroskopie, mikrokolorimetrie, teoretické molekulární modelování a mnoho dalších, včetně prozatím méně využívané Ramanovy spektroskopie; více viz (Palacký, 2012) nebo (Parkinson, 2006).

Z hlediska stanovení struktury různých kvadruplexů mají největší význam NMR a rentgenová (RTG) krystalografie, které obě umožňují, alespoň v principu, přímé určení absolutní struktury kvadruplexu. Další metody, i když méně strukturně explicitní a názorné, umožňují zkoumání konformačních přechodů, termální stability a interakcí kvadruplexů s jinými látkami. I když NMR již pomohla vyřešit mnoho struktur různých kvadruplexů ve vodném prostředí, selhává v případech koexistence více struktur najednou nebo dynamických přechodů mezi nimi, kdy jsou výsledky obtížně interpretovatelné. V případě RTG krystalografie je navíc třeba kvadruplex vykrytalizovat, přičemž jeho struktura v krystalu a v roztoku se samozřejmě může lišit. Z tohoto důvodu je NMR často upřednostňována i přes vyšší přesnost RTG krystalografie (Palacký, 2012). Nicméně kvůli přirozeným omezením NMR i RTG je ve výzkumu běžné také uplatnění jiných metod.

V této sekci se zaměříme na některé vybrané a často využívané metody, které jsou pro výzkum kvadruplexů přínosné a které byly v této práci užívány, přičemž všechny tyto metody jsou metody spektroskopické.

#### 3.1. Absorpční spektroskopie

Absorpční spektroskopie je optická metoda, při které se zkoumaný vzorek prosvěcuje světelným paprskem a zaznamenává se intenzita prošlého záření v závislosti na jeho vlnové délce. Snadno lze pak určit podíl světla absorbovaného vzorkem, což je kvantitativně určeno veličinou absorbance  $A$ , definovanou jako

$$A = -\log_{10} \frac{I}{I_0} \quad (2)$$

Kde  $I$  značí intenzitu prošlého světla a  $I_0$  intenzitu vstupujícího světla o dané vlnové délce (Clark, 2019).

Provedeme-li měření absorbance na různých vlnových délkách, získáme absorpční spektrum dané látky. Při studiu G-kvadruplexů se využívá spíše UV (*ultra violet*) oblasti spektra, kde absorbují báze nukleových kyselin. V některých případech – například při interakcích s některými barevnými ligandy – však může být výhodnější využít i viditelnou část spektra (Palacký, 2012). Vzorek pro absorpční spektroskopii musí být průsvitný (tj. nesmí absorbovat veškerou dopadající intenzitu), obvykle se proto používají roztoky jen do určitých koncentrací, u kterých jsou intenzity prošlých paprsků ještě dostatečně vysoké pro určení absorbance s přijatelnou přesností (Clark, 2019). Kombinováním koncentrace a tloušťky absorpční kyvety (obvykle standardní 1.0 cm; nejtenší dostupná rozebírací kyveta má tloušťku 0.01 mm) lze při uvážení obvyklých molárních extinkčních koeficientů nukleových kyselin teoreticky měřit až do koncentrací ~ 200 mM (vyjádřeno v bazích NK), což pro oligonukleotid s délkou 20 bazí představuje koncentraci 10 mM. Jedná se však o měření v extrémně tenkých rozebíracích kyvetách, které nejsou vhodné pro teplotní měření (kvůli odparu a vysychání vzorku), a které tak neposkytují dostatečnou přesnost.

V naší práci bylo absorpční spektroskopie užito pro stanovení koncentrací zásobních roztoků oligonukleotidů. Absorbance se k tomuto účelu užívá často, neboť je její určení experimentálně snadné a koncentrace na ní přímo závisí. Je třeba znát pouze tloušťku prosvěcovaného vzorku  $l$  a molární extinkční koeficient dané látky  $\varepsilon$  pro konkrétní vlnovou délku (v případě NK se jako charakteristická vlnová délka obvykle používá 260 nm, případně okolní hodnoty, pro které mají nukleové kyseliny obecně vysokou absorbanci (Palacký, 2012)). Z Lambert-Beerova zákona plyne (Clark, 2019):

$$I(\lambda) = I_0(\lambda) \cdot 10^{-\varepsilon(\lambda)cl} \quad (3)$$

A tedy lze srovnáním vztahů 2 a 3 zavést vztah

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (4)$$

Odsud je již snadné určit koncentraci  $c$ .

Z hlediska zkoumání kvadruplexů lze provést měření absorpčních spekter při různých teplotách, pro něž je možné nalézt změny charakteristické pro tání kvadruplexů (a tedy důkaz, že se zde struktura kvadruplexu skutečně nacházela). Nejvýznamnější změny se nachází v UV oblasti spektra. Charakteristické je zvýšení

absorbance (hyperchromismus) v oblasti 240 - 245 nm a 270 - 275 nm se současným snížením (hypochromismus) v oblasti kolem 295 nm. Pro nukleové kyseliny bez kvadruplexové struktury se pak nejvýznamnější změny vyskytují v okolí 260 nm.

I vlnové délky ve viditelné části spektra je možné využít ke studiu kvadruplexů, zejména se využívají při zkoumání jejich interakcí s aromatickými ligandy absorbujícími i ve viditelném spektru, kdy při tvorbě komplexů s kvadruplexy dochází ke změnám jejich absorpčních spekter právě v této oblasti. Důsledky tvorby komplexu pak možno sledovat najednou jak na straně kvadruplexu (UV oblast) tak barevného ligandu (viditelná oblast).

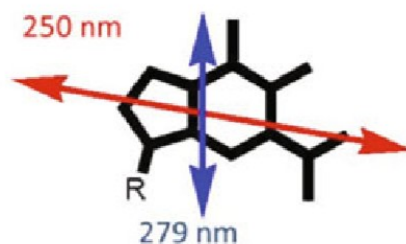
### 3.2. Cirkulární dichroismus (CD spektroskopie)

CD spektroskopie poskytuje možnost zkoumat biologické makromolekuly na základě jejich schopnosti rozdílně pohlcovat kruhově polarizované světlo opačné orientace. Proto je mimo jiné vhodná ke zkoumání chirálních molekul (existence dvou enantiomerů, kde jeden je zrcadlovým obrazem druhého), u nichž je pro svou citlivost vhodná například ke zkoumání subtilních konformačních změn. Dá se použít i pro studium interakcí chirálních biomolekul s achirálními ligandy, které mohou po navázání na chirální molekulu vykazovat indukovanou chiralitu v oblasti jejich absorpce, která je výraznější než signál získaný ze standardní absorpční spektroskopie. Hodí se pro studium vzájemné interakce různých biomolekul včetně kvadruplexů (Palacký, 2012), a obecně pro studium ovlivňování chirálních makromolekul okolním prostředím a podmínkami (Randazzo, et al., 2013).

Opět se jedná o metodu, při níž dochází k prosvěcování vzorku světlem o různých vlnových délkách. Zde se ale porovnává intenzita prošlého levotočivého a pravotočivého cirkulárně polarizovaného světla. Pokud je vzorek achirální, obě polarizace absorbují se stejnou absorpční. V případě chirálních vzorků dochází na různých vlnových délkách k preferované absorpci jedné nebo druhé polarizace a výsledkem je diferenciální absorpční křivka s kladnými a zápornými pásy.

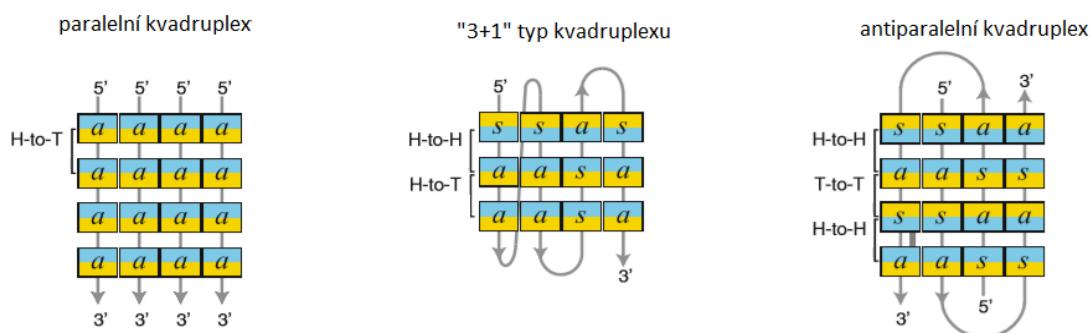
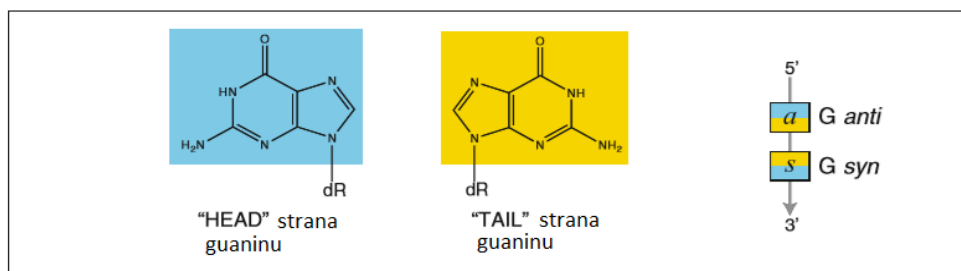
V případě G-kvadruplexů jsou za rozdílnou absorpci kruhově polarizovaného světla zodpovědné dva nejvýznamnější elektrické momenty  $\pi$ - $\pi^*$  přechodů guaninu, související s nerovnoměrným rozložením náboje na molekule (viz obrázek 19). Jeden je polarizovaný zhruba podél delší osy molekuly (absorpční pás 279 nm), druhý podél kratší osy (absorpční pás 250 nm). Přechodové momenty guaninů v G-tetrádách ležících nad sebou vzájemně interagují. I lehké rozdíly ve vzájemném pootočení tetrád způsobují rozdílné spřažení (coupling) těchto momentů, které se pak projeví v chiralitě měřitelné CD spektrometrem. Pootočení G-tetrád významně závisí na konformaci kvadruplexu, která je určena syn/anti konformacemi jednotlivých guanosinů (Randazzo, et al., 2013).



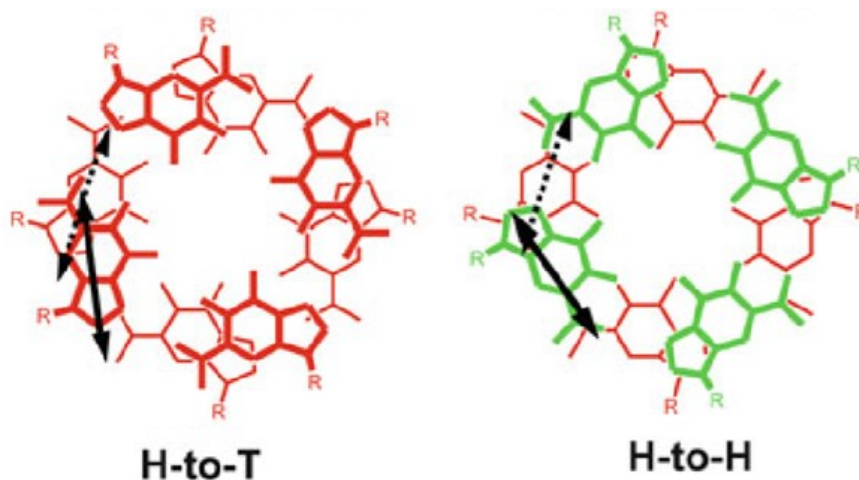


Obrázek 19: Nejvýznamnější elektrické momenty přechodu v molekule guaninu, vyvolávající CD signál při uvedených vlnových délkách. Převzato z (Randazzo, et al., 2013).

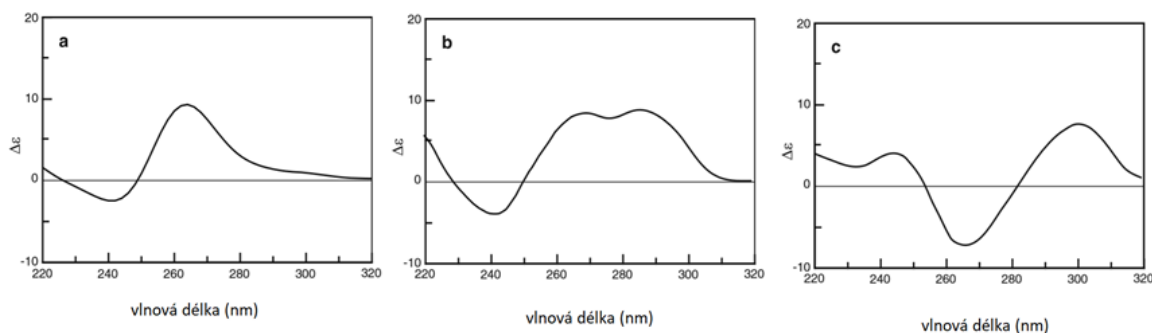
Abychom tuto situaci názorněji popsali, budeme rozlišovat tzv. „HEAD“ stranu, z níž pozorujeme guanin a „TAIL“ stranu (viz obrázek 20). Označení stran je převzato z angličtiny a pro představu lze tyto strany rozlišit tím, díváme-li se na jednu molekulu guaninu shora nebo zespoda. V závislosti na konformaci guanosinu (syn nebo anti), jsou guaniny ve stejném řetězci orientované s pohledu HEAD nebo TAIL různě. V různých typech kvadruplexu jsou tak na sobě guaniny sousedních tetrad z hlediska kontaktních stran naskládány různými způsoby. Z anglické terminologie opět přejímáme uspořádání H-to-H, T-to-T a H-to-T podle kontaktů HEAD a TAIL sousedních stran guaninů v tetradách – rozdíl mezi nimi názorně ukazuje obrázek 21. Rozdílným seskládáním se pak samozřejmě liší výsledně vzniklé dipólové momenty a tedy i vzniklý CD signál (Randazzo, et al., 2013). Příklad typických CD spekter pro případy základních konformací kvadruplexů v obrázku 20 jsou potom ukázány v grafu 1. Lze si povšimnout, že minima a maxima u CD spektra antiparalelních kvadruplexů jsou si velice podobná s diferenčními absorpčními spektry kvadruplexů (uspořádaný kvadruplex bez rozlišení konkrétní konformace *versus* neuspořádaný oligonukleotid, viz například graf 7), více zdroje v práci (Palacký, 2012).



Obrázek 20: „HEAD“ a „TAIL“ strana guaninu, orientace pro guanosin v anti a syn konformaci a různé orientace guaninů v základních typech kvadruplexů. Převzato z (Randazzo, et al., 2013) a upraveno.



Obrázek 21: Rozdíly plynoucí ze stohování G-tetrád v orientaci guaninů H-to-T a T-to-H. Červeně je značena při pohledu seshora „HEAD“ strana guaninu, zeleně „TAIL“. Vrchní tetráda je vykreslena tlustší čarou. Převzato z (Randazzo, et al., 2013).



Grafy 1: Příklady typických CD spekter pro a) paralelní kvadruplexy b) konformace 3+1 c) antiparalelní kvadruplexy. Převzato z (Randazzo, et al., 2013).

Co se týče rozmezí v praxi užívaných vlnových délek, ultrafialová část spektra charakterizuje zejména konformaci samotné nukleové kyseliny (kvadruplexu), zatímco viditelná část spektra je spojena s indukovanou chiralitou při navázání barevného ligandu na kvadruplex, podobně jako u absorpční spektroskopie.

Tyto CD charakteristiky (graf 1) nemusí být ale automaticky platné za všech okolností. U některých konkrétních sekvencí (často nějak netriviálně modifikovaných) se tak může objevit tvar CD spektra, který pro danou topologii neodpovídá výše napsaným pravidlům. CD spektroskopii je proto vhodné kombinovat i s dalšími metodami (Palacký, 2012).

### 3.3. Ramanova spektroskopie

Ramanova spektroskopie je v některých ohledech ještě citlivějším nástrojem studia G-kvadruplexů než absorpční nebo CD spektroskopie, i když je prozatím méně využívána. Vychází z poznatků kvantové teorie, kdy při interakci monochromatického záření s molekulou dochází k nepružnému rozptylu excitačních fotonů a přechodům mezi vibračními stavy molekuly. Neelasticky rozptýlené fotony nesou informaci o vibračních stavech molekuly, které lze snadno určit z tzv. ramanovských posunů vlnových délek (vlnočtů) rozptýlených fotonů (Palacký, 2012).

Nelineární molekula složená obecně z  $n$  atomů má  $3n-6$  vibračních stupňů volnosti, při kterých dochází ke změnám délek vazeb mezi atomy a úhlů mezi těmito vazbami. Každý atom se může pohybovat podél tří kartézských souřadnic, čímž je poloha v prostoru plně popsána. U molekuly, kde jsou atomy propojené vazbami a kde pro ně existují rovnovážné polohy, tři stupně volnosti ubývají, jestliže nás

nezajímá translační pohyb celé molekuly v prostoru a další tři, jestliže nás nezajímá ani její rotační pohyb.

Vezmeme-li si pro ilustraci dvouatomovou molekulu, můžeme ji považovat za lineární, nikoli prostorový objekt a počet jejích vibračních stupňů volnosti je tedy roven pouze  $3n-5$ , tedy je pouze jediný. Tato molekula tak může vykonávat pouze takový vibrační pohyb, kdy se mění délka vazby. Jako model si lze představit dvě kuličky spojené nehmotnou pružinou určité tuhosti. Pro frekvenci vibračních kmitů lze pak odvodit vztah (Schrader, et al., 1995):

$$f = \frac{1}{2\pi} \sqrt{k \left( \frac{1}{m_1} + \frac{1}{m_2} \right)} \quad (5)$$

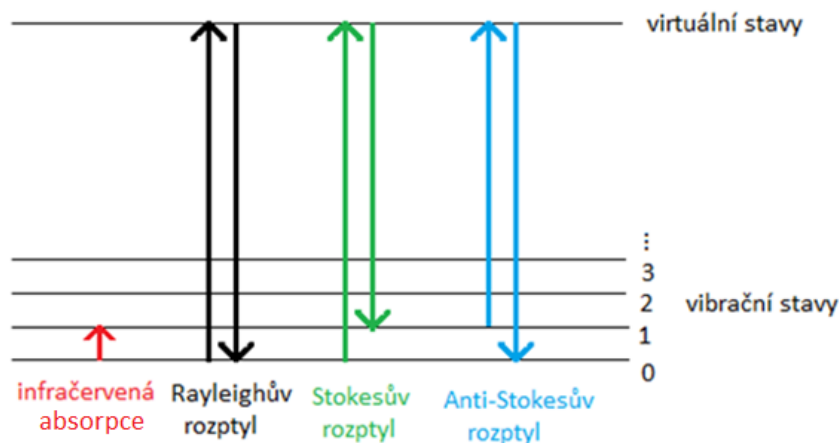
kde  $m_1$  a  $m_2$  jsou hmotnosti atomů,  $k$  je tuhost pružiny (tj. silová konstanta charakteristická pro danou vazbu) a  $f$  je frekvence vibračních kmitů. Dosazujeme-li  $k$  v jednotkách  $\text{N} \cdot \text{cm}^{-1}$  a hmotnosti molekul v relativní molekulové hmotnosti, platí vztah (Schrader, et al., 1995):

$$f [\text{cm}^{-1}] = 1303 \cdot \sqrt{k \left( \frac{1}{m_1} + \frac{1}{m_2} \right)} \quad (6)$$

Pro víceatomovou molekulu je takovýto vztah mezi frekvencí a parametry molekuly obecně složitější, neboť jde o složení pohybu více atomů zároveň. Nicméně jakýkoli složitý vibrační pohyb atomů v molekule je možné rozložit na superpozici harmonických kmitů lineárně nezávislých oscilátorů, z nichž každý kmitá vlastní frekvencí. I v tomto případě jsou teoretické výpočty frekvencí možné, jsou však náročnější a pro potřeby této práce nejsou podstatné, více viz (Schrader, et al., 1995).

Vrátíme-li se k analogii s kuličkami na pružince a harmonickým oscilátorem, lze energetický rozdíl  $E$  mezi sousedními vibračními stavy oscilátoru spojit s frekvencí jeho kmitů  $f_v$  dle vztahu  $E=hf_v$  (kde  $h$  je Planckova konstanta). Při interakci s fotonem se pak molekula může dostat na vyšší vibrační stav absorpcí pouze za předpokladu, že energie fotonu je přesně stejná jako energie vibračního přechodu. Jedná se pak o přímou absorpci a frekvence kmitů oscilátoru lehce určíme z frekvence (vlnové délky) absorbovaných fotonů. Stejně tak může nastat s určitou pravděpodobností jiná situace, kdy při dopadu excitačního fotonu o frekvenci  $f_0$  podstatně vyšší než je frekvence vibrací molekuly  $f_v$  (nebo energetický rozdíl  $E=hf_v$  mezi sousedními vibračními stavy), molekula krátce přejde na tzv. virtuální hladinu a následně se vrátí na nižší či vyšší energetickou hladinu než byla původně. Může se

vrátit i na stejnou, potom se jedná o elastický Rayleighův rozptyl, který je sice nejobvyklejší, ale z hlediska studia vibračních stavů molekuly nezajímavý. Při rozptylu dopadajícího fotonu na vibracích molekuly tak může dojít k výměně energie a změně frekvence  $f_s$  takto rozptýleného fotonu, která pak je  $f_s = f_0 \pm f_v$  (Schradler, et al., 1995).



Obrázek 22: Ilustrace možných přechodů mezi vibračními stavy molekuly a tím působených možností rozptylů (elastický Rayleighův, neelastický Ramanův Stokesův a anti-Stokesův), resp. absorpce.

Takových přechodů mezi různými vibračními stavy je možných více – dle toho pak vznikají konkrétní pásy charakteristické pro dané molekuly. K jejich pozorování se užívají dvě metody. Prvním je infračervená (IČ) absorpční spektroskopie, kde se zkoumá, které vlnové délky (z blízké až střední IČ oblasti) jsou látkou absorbovány a způsobují přechody mezi vibračními stavy (tedy užívá prvního případu, kdy dodáváme fotony předávající potřebné kvantum energie k přeskoku z jednoho vibračního stavu do druhého). Druhým je pak právě Ramanova spektroskopie, která využívá optických fotonů o podstatně vyšší energii než je energie potřebná k přímým vibračním přeskokům, ale obvykle nižší, než je energie elektronových přechodů. Přesto k výměně energie mezi interagujícím fotonem a vibrující molekulou dochází, a to rozptylovým mechanismem. Při zachování celkové energie soustavy může být energie rozptýleného fotonu nižší nebo vyšší než původního, a to o energii vibračního přechodu molekuly. Pokud je nižší, přechází molekula na vyšší vibrační hladinu. Pokud se před interakcí nacházela na vyšší vibrační hladině a po rozptulí skončí na nižší, tak o příslušný rozdíl energií vzroste energie rozptýleného fotonu. Při přeskoku na nižší vibrační hladinu se jedná o tzv. anti-Stokesův rozptyl, při přeskoku

na vyšší hladinu jde o Stokesův rozptyl a vzhledem k původu tohoto jevu je zřejmé, že oba nesou stejnou informaci o dané molekule (tj. rozdíl mezi sousedními vibračními hladinami příslušného harmonického oscilátoru) a můžeme k měření využít libovolný z nich (Schrader, et al., 1995). Ilustraci o zmíněných přechodech molekuly mezi vibračními stavy pak poskytuje obrázek 22.

Problémem Ramanovy spektroskopie je fakt že Ramanův rozptyl je velmi slabý jev, tedy je třeba odfiltrovat obrovské množství fotonů s původní vlnovou délkou pocházejících z pružného Rayleighova rozptylu. Slabost jevu je také spojena s požadavkem na dostatečně vysokou koncentraci vzorku (pro požadovanou přesnost měření). Tento požadavek může být v některých případech i výhodou – například absorpční metody studia nukleových kyselin jsou v oblasti vysokých koncentrací problematické, a tak je Ramanovská spektroskopie vhodná právě k tomuto zkoumání. Protože zde není žádný požadavek na průhlednost vzorku, rozptýlené fotony lze detekovat se stejnou informací v libovolném směru. Velkou výhodou této metody je pak její nedestruktivnost, nízké požadavky na formu vzorku a také vysoká rychlost získávání informací o vzorku – je tedy vhodná i k pozorování dynamických biologických procesů. Při studiu G-kvadruplexů je pak právě možné zkoumat například vysoké koncentrace DNA, nacházející se přirozeně v buňkách, kde může být zkoumání jinými metodami problematické (Palacký, et al., 2013).

K rozšíření možností této metody je možné spojit Ramanovou spektroskopii s konfokální optickou mikroskopií do Ramanovy mikroskopie a studovat vibrační spektra mikroskopických objektů, například organel buněk nebo mikrokrytalů, které jsou příliš malé pro měření na klasickém makroskopickém spektrometru. Excitující laserový paprsek lze mikroskopickým objektivem fokusovat na přesně vybrané místo vzorku a získat tak informaci o složení i velmi malých oblastí. Taková měření jsou pak mnohdy jinými metodami těžko nahraditelná a mohou mít veliké využití v biologickém i v medicínském výzkumu (Evans & Xie, 2008).

### *3.3.1. Markery ve spektrech kvadruplexů a bází DNA*

Ramanova spektra složitějších molekul obsahují velké množství vibračních pásů, které je obecně obtížné interpretovat v pojmech vibračních pohybů konkrétních atomů. V mnoha případech to ani není potřeba, pokud jsou už známé souvislosti mezi frekvencemi (vlnočty) určitých pásů a strukturními nebo konformačními vlastnostmi příslušných molekul. V případě nukleových kyselin jsou již známé pásy

charakterizující jednotlivé báze (i jejich části nebo skupiny), konformace cukr-fosfátového řetězce nebo konformace nukleotidů. Jsou to tzv. Ramanovy značky, markery. Při zkoumání Ramanových spekter kvadruplexů se kriticky opíráme o různé význačné markery navržené v předchozích studiích, které charakterizují vlastnosti dané kvadruplexové struktury. Při konformačních přechodech pak pozorujeme intenzitní a frekvenční změny těchto markerů. Přestože jde o poměrně slabé změny, lze je při správném zpracování dat považovat za průkazné (Palacký, et al., 2013). V tabulce 2 jsou shrnuty nejdůležitější markery charakteristické pro přítomnost paralelních a antiparalelních kvadruplexů v roztoku DNA, nebo pro neuspořádanou strukturu. Tato data byla převzata z práce (Palacký, et al., 2013), kde lze nalézt více informací o konkrétním původu a interpretaci těchto pásů.

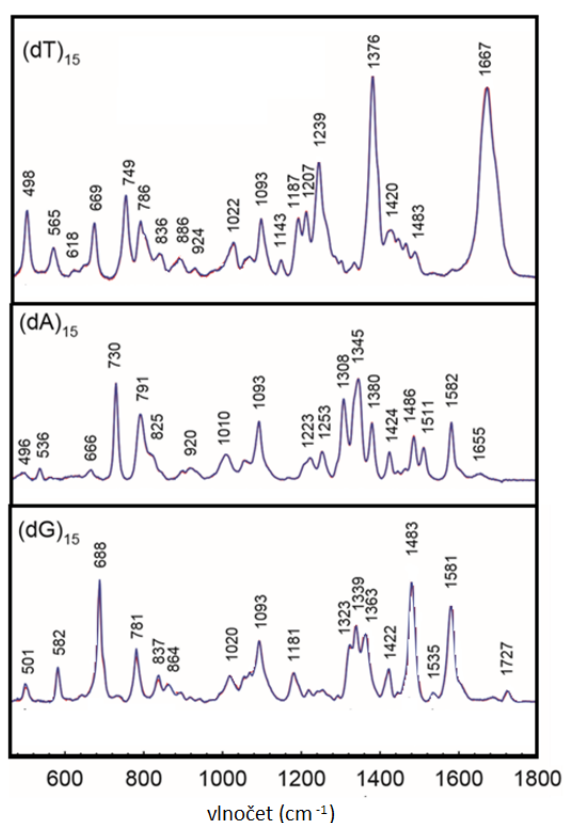
marker (cm <sup>-1</sup> )	spíše paralelní(P-Q)/ antiparalelní (AP-Q) kvadruplex	poznámky
499	AP-Q	
581	P-Q	
611	AP-Q	laterální/diagonální smyčky u AP-Q
671	AP-Q	C2'-endo/syn konformace
686	P-Q	C2'-endo/anti konformace
781	P-Q	
837	P-Q/AP-Q	při tání Q rozšíření
1093	P-Q/AP-Q/-	neměnná intenzita, přísluší fosfátové skupině
1322	-	C2'-endo/syn
1326	AP-Q	C2'-endo/syn
1338	P-Q	C2'-endo/anti
1371	AP-Q	
1483	P-Q/AP-Q	
1578	-	
1581	P-Q/AP-Q	při tání Q posun k nižším hodnotám (u intramolekulárních kvadruplexů ne tolik výrazný)
1688	-	
1719	P-Q/AP-Q	

Tabulka 2: Markery v Ramanových spektrech charakteristické pro přítomnost či nepřítomnost kvadruplexů v roztocích DNA.

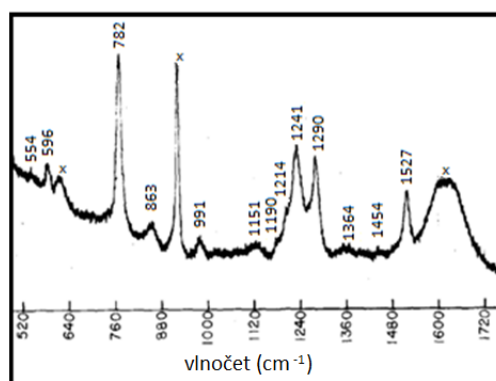
Při studiu kvadruplexů budeme také potřebovat znát polohu pásů v Ramanových spektrech příslušících základním bázím nebo nukleotidům. Modelová spektra uvedená níže pak sloužila pro identifikaci nejvýraznějších znaků příslušných

bazí, nicméně jemnější charakteristiky jsou závislé i na konkrétní struktuře těchto modelových nukleotidů a nejsou pro nás tedy dostatečně průkazné.

Pro účely tohoto porovnání jsme v naší práci využili spektra oligonukleotidů s 15 adeniny, guaniny či thyminy v řadě (značeno (dX)<sub>15</sub>), převzatá z práce (Palacký, et al., 2013), viz graf 2. Pro charakterizaci cytosinu jsme využily publikované spektrum cytidinu naměřené při neutrálním pH nebo mírně kyselém pH. Cytidin je nukleosidem cytosinu, bez přítomnosti zbytku kyseliny fosforečné, proto se v spektru nenachází charakteristický pás fosfátové skupiny v okolí 1093 cm<sup>-1</sup>. Spektrum přítomné v grafu 3 bylo převzato z práce (O'Connor, et al., 1976).



Graf 2: Ramanova spektra oligonukleotidů s 15 stejnými bázemi (odshora T, A, G) v pufru K<sup>+</sup>-PBS. Převzato z (Palacký, et al., 2013) a upraveno.



Graf 3: Spektrum cytidinu při mírně kyselém pH (symbol × značí pásy pufru nebo vody a netýkají se spektra samotného cytidinu).

Převzato z (O'Connor, et al., 1976) a upraveno.



## 4. Postupy přípravy vzorků, měření a zpracování dat

### 4.1. Zkoumané vzorky a jejich příprava

V naší práci byly k měření použity vzorky syntetizované na zakázku firmou atdbio<sup>2</sup>, přičemž se jednalo o krátké sekvence DNA bohaté na guanin. Pro přehled vzorků slouží tabulka 3, shrnující i další charakteristiky teoreticky určené kalkulátorem na stránkách atdbio pro dané sekvence. Báze jsou standardně značené jako A, G, T a C. Symbol S potom značí nukleotid bez nukleové báze, jde tedy pouze o ribózu se zbytkem kyseliny fosforečné, pojící sousední báze. Thyminy na okrajích sekvence jsou zde proto, aby se zabránilo spojování několika struktur kvadruplexů dohromady.

Označení vzorku	Sekvence (ve směru 5'-3')	Teplota tání (°C) <sup>3</sup>	Teoretická teplota tání (°C) <sup>4</sup>	Extinkční koeficient (mol <sup>-1</sup> ·cm <sup>-1</sup> )	Relativní molekulová hmotnost
A-G15	TTGGGAGGGAGGGAGGGT	60,3	71,1	191 400	5741
C-G15	TTGGGCGGGCGGGCGGGT	75,6	77,9	169 500	5669
G-G15	TTGGGGGGGGGGGGGGGT	66	77,9	180 700	5789
S-G15	TTGGGSGGGSGGGSGGGT	>79,5	67,2	149 300	5341
T-G15	TTGGGTGGGTGGGTGGGT	75,6	71,1	173 100	5714

Tabulka 3: Informace o zkoumaných oligonukleotidech.

Jedná se o stejné oligonukleotidy, které byly zkoumány i v článku (Sengar, et al., 2014), přičemž v citované práci byla experimentálně určena i teplota tání struktury v závislosti na typu nukleotidů ve smyčkách (opět shrnuto v tabulce 3). V rámci této práce byla pomocí NMR měření také určena struktura kvadruplexu G-G15 ve vodním prostředí (viz obrázky 23 a 24) a stejně tak byla předpovězena její podobnost s kvadruplexy ostatních společně studovaných oligonukleotidů s rozdílnými nukleotidy ve smyčkách (viz obrázek 25). Obecně se tak předpokládá paralelní uspořádání kvadruplexů u všech těchto sekvencí. Na stránkách NDB<sup>5</sup>

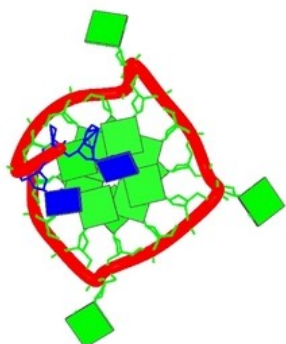
<sup>2</sup> <https://www.atdbio.com/>

<sup>3</sup> Dle (Sengar, et al., 2014), teplota tání kvadruplexové struktury

<sup>4</sup> Dle atdbio, teoreticky vypočtené pro námi měřené koncentrace oligonukleotidů a solí, teplota tání sekvence obecně (nikoli pro konkrétní kvadruplexové struktury)

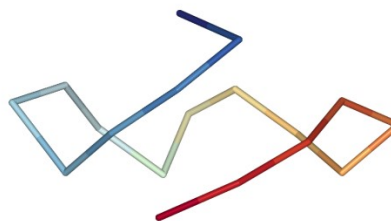
<sup>5</sup> <http://ndbserver.rutgers.edu/>

(*Nucleic Acid Database*) se jiné NMR struktury námi studovaných oligonukleotidů mimo G-G15 nevyskytují; obrázky struktur určených pomocí RTG z krystalů příslušných oligonukleotidů se zde v době psaní této práce nevyskytovaly vůbec.



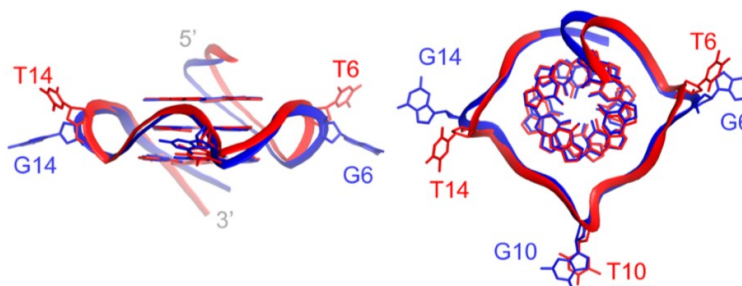
Obrázek 23: Struktura G-G15 určená z NMR měření (guaniny značeny jako zelené čtverce, thyminy jako modré čtverce, cukr-fosfátová kostra červeně).

Převzato z <http://ndbserver.rutgers.edu/>



Obrázek 24: Uspořádání cukr-fosfátové kostry G-G15 z NMR měření.

Převzato z <https://www.rcsb.org>



Obrázek 25: Porovnání struktury G-G15 (modrá) a T-G15 (červená) při pohledu ze strany a svrchu. Pásky značí cukr-fosfátovou kostru, guaniny a thyminy jsou značeny symbolicky dle své struktury, čísla pak značí pořadí báze v řetězci. Lze pozorovat rozdílnou orientaci nukleových bází ve smyčkách, jinak se struktury jeví velmi podobné. Převzato z (Sengar, et al., 2014).

V naší práci jsme se zaměřili na další výzkum těchto oligonukleotidů, a to především na jejich zkoumání pomocí Ramanovy spektroskopie, umožňující zkoumat vlastnosti pro vyšší koncentrace těchto nukleotidů, než byly užity v práci (Sengar, et al., 2014), kde byly užity koncentrace 4-6  $\mu\text{M}$  (koncentrace v oligonukleotidu).

Námi měřené vzorky byly syntetizované dodavatelem atdbio a posléze lyofilizovány. Byly tedy dodány ve vysušené, vysoce koncentrované podobě, s neznámým kationtem. Před samotným měřením bylo potřeba tyto vzorky charakterizovat dle instrukcí od výrobce a odsolit, resp. převést do dobře definovaného pufru.

Při samotné lyofilizaci mohly v roztoku oligonukleotidů zůstat zachyceny i přes čištění HPLC provedené výrobcem některé ionty použité při syntéze sekvencí či jiné nízkomolekulární látky. Tyto látky bylo třeba odstranit a nahradit je vlastním pufrem, zajišťujícím stálé pH vzorku a zároveň dodávajícím potřebné množství iontů  $K^+$  pro vznik stabilizovaných kvadruplexů. Množství  $K^+$  iontů připadající na jeden oligonukleotid bylo určeno tak, aby na každou fosfátovou skupinu cukr-fosfátové kostry připadal teoreticky jeden iont  $K^+$  (kvůli kompenzaci náboje), a uvnitř ve vnitřním kanálku kvadruplexů byla struktura těmito ionty dostatečně stabilizována (tj. přibližně jeden  $K^+$  na každou G-tetrádu). Lehce nadhodnocený odhad byl tedy 25 iontů  $K^+$  na jednu molekulu DNA délky 18 nukleotidů. Dle tohoto požadavku byl namíchan 50 mM fosfátový pufr s pH 7.0, do kterého byl přidán KCl tak, aby finální koncentrace  $K^+$  byla 240 mM. Pufr je zde označován jako  $K^+$ -PBS ( *$K^+$ -Phosphate buffered saline*).

K vyčištění našich vzorků, výměně pufru a jejich zpětnému zakoncentrování byl použit koncentrátor Amicon<sup>6</sup>, v němž dochází k odstranění vody z roztoku centrifugací. Ztrátě vzorku z filtračního zařízení je zabráněno membránou s vhodně velkými póry (rozlišeno dle propustnosti molekul dle jejich molekulové hmotnosti). V našem případě byl užit filtr o nominálním molekulárním váhovém limitu (*NMWL*) 3 000 (Amicon 3k), přičemž výrobcem odhadované ztráty původního vzorku jsou nižší než 5%. Další ztráty se nicméně mohu vyskytnout při manipulaci se vzorkem a jeho rozpouštění; tyto ztráty jsme se ale pokoušeli minimalizovat. Filtr je třeba před užitím také opakovaně propláchnout deionizovanou vodou, neboť membrána obsahuje stopové množství glycerinu, který by tak mohl kontaminovat vzorek.

Samotná centrifugace probíhala dle doporučení výrobce po dobu 30 minut při zrychlení vyvolané otáčením 14 000  $\times g$ , úhel natočení rotoru je fixně 40°. Filtry byly promyty 3 $\times$  deionizovanou vodou, následně bylo přidáno 500  $\mu l$  vzorku rozpuštěného v deionizované vodě, byla provedena centrifugace, a poté byl vzorek

---

<sup>6</sup> <http://www.merckmillipore.com/CZ/cs>

dvakrát po sobě doplněn připraveným pufrem opět na objem 500  $\mu\text{l}$  a opakovaně zkoncentrován. Na závěr byl dle návodu roztok ve filtračním zařízení vytočen do zásobní kvyety se zrychlením 1000  $\times g$  po dobu dvou minut.

Vzhledem k tomu, že  $\text{K}^+$  ionty mají vysokou afinitu, původní ionty jimi byly při zředění pravděpodobně nahrazeny. Podle informací od výrobce je odhadovaný objem koncentrovaného roztoku po provedení jednoho výše popsaného vytočení 48  $\mu\text{l}$  a ve filtračním zařízení je tedy po centrifugaci pouze desetina původního objemu roztoku. Množství nechtěných příměsí se tak s každým propláchnutím snižuje 10 $\times$ . Naším postupem jsme se tak dostali na obsah příměsí nižší než 1/1000.

## 4.2. Měření Ramanových spekter a jejich vyhodnocování

### 4.2.1. Měření Ramanových spekter

K měření byla využita Ramanova aparatura na Fyzikálním ústavu MFF UK, na Oddělení fyziky biomolekul, skládající se ze zobrazovacího spektrografu Spex 270 M (Jobin-Yvon), do něhož bylo záření směřováno objektivem pod úhlem 90°, a CCD detektoru chlazeného kapalným dusíkem (Princeton Instruments, 1340  $\times$  100 pixelů). Spektrograf obsahuje mřížku pro rozklad analyzovaného záření (hustota vrypů 1200  $\text{mm}^{-1}$ ) a filtr pro potlačení záření vzniklého Rayleighovým rozptylem, umístěného za objektiv (Semrock).

Před každým měřením bylo ověřeno, že laserový paprsek prochází přímo středem vzorku a ne stěnami křemenné mikrokyvety, umístěné v termostatovaném držáku s nastavitelnou teplotou. Následně byla nastavením sběrného objektivu aparatura seřízena tak, aby byl získán signál co nejvyšší. Vložené vzorky byly kvůli fluorescenčnímu pozadí před měřením vysvěcovány laserem minimálně jednu hodinu. Vysvícení fluorescenčního pozadí umožnilo získání kvalitnějších spekter.

Pro excitaci byl využit pevnolátkový Nd:YVO<sub>4</sub> laser Verdi 2 (Coherent) s excitační vlnovou délkou 532,166 nm o použitém výkonu 360 mW, u některých vzorků až 400 mW (zvýšeno kvůli stále přítomnému fluorescenčnímu pozadí). Ze zásobních roztoků námi zkoumaných oligonukleotidů (viz předchozí sekce, konkrétní koncentrace viz dále) bylo do mikrokyvety odebráno 4,6  $\mu\text{l}$  tak, aby se dovnitř nedostal žádný vzduch a minimalizovalo se tak riziko vzniku bublinky během měření, která by ovlivnila výsledek.

Byly provedeny série teplotních měření pro každý vzorek od 5°C do 95°C a následně při ochlazování od 95°C k 5°C, s krokem 2°C. Měření každého jednotlivého spektra pro každou teplotu trvalo 3 min, s 5 s expozicí a s akumulací 36 expozic. Teplota se po ohřevu nechala stabilizovat po dobu 3 min pro dosažení termodynamické rovnováhy; při ochlazování probíhala stabilizace 4 minuty. Každé spektrum bylo naměřeno s vlastním kalibračním spektrem (známé emisní spektrum neonu; užitá neonová výbojka), použitým při následném vyhodnocování spekter.

#### 4.2.2. Měření na Ramanově mikroskopu

Během bakalářské práce byl pro studium krystalů objevených v roztoku A-G15 využit také konfokální Ramanův mikroskop alpha300 RSA (WITec), s excitací laserem 532 nm, olejovým imerzním objektivem 100× zvětšujícím, NA 1.3. Zkoumaná suspenze mikroskopických krystalků byla nakápnutá mezi podložní a krycí skličko a následně zkoumána nejprve optickým mikroskopem. Po vybrání zajímavých objektů (v našem případě pravidelných krystalů) pak byla naměřena Ramanova spektra těchto objektů i okolního roztoku. Krystaly byly pozorovány prosvícené mezi zkříženými polarizátory v polarizačním módu pro případné zjištění optické aktivity.

Získaná spektra pro krystaly i pro jejich okolí byla naměřena víckrát a sloučena do jednoho výsledku pro minimalizaci vlivu náhodných nepřesností.

#### 4.2.3. Metody multivariantního statistického zpracování souborů experimentálních dat (faktorová analýza)

Zpracování naměřených Ramanových spekter bylo provedeno pomocí metody faktorové analýzy, takzvané SVD (*single value decomposition*), které se krátce budeme věnovat v této sekci. Jde o matematickou proceduru projektující naměřená spektra  $Y_i(x)$  do prostoru ortonormálních funkcí  $S_j(x)$  a tedy rozložením naměřených spekter do takzvaných subspekter. Pro tento rozklad platí vztah (Palacký, et al., 2011):

$$Y_i(x) = \sum_j W_j V_{ij} S_j(x) \quad (7)$$

Kde koeficient  $V_{ij}$  vyjadřuje relativní příspěvek subspektra  $S_j(x)$  do spektra  $Y_i(x)$ , a singulární hodnoty  $W_j$  jsou statistickou vahou subspekter  $S_j$ . Lze zavést parametr faktorová dimenze, což je minimální počet subspekter, jejichž kombinací získáme

původní spektrum  $Y_i(x)$  bez nadbytečného zašumění nebo naopak ztráty spektrální informace. U subspekter  $S_j$ , reprezentujících tento statistický šum, je  $W_j$  výrazně menší než u subspekter souvisejících s reálnými spektrálními rozdíly. Faktorovou dimenzi, tj. počet spektrálně odlišitelných lineárně nezávislých složek přítomných ve spektrech  $Y_i(x)$  lze odhadnout z průběhu hodnot  $W_j$  na  $j$ ; v grafu je obvykle vidět zlom, od kterého  $W_j$  už jenom lineárně klesá s rostoucím řádem  $j$  (Palacký, et al., 2011).

Provádíme-li nějaké úpravy subspekter (např. korekci jejich ne-Ramanova pozadí) a z upravených subspekter zpětně zrekonstruujeme jednotlivá spektra za použití původních koeficientů  $W_j$  a  $V_{ij}$ , promítne se tato úprava do všech spekter. Tyto úpravy subspekter zahrnují obvykle odstraňování ne-Ramanova pozadí v spektrech. Zpracování naměřených spekter obvykle probíhá následovně: nejprve je odečteno spektrum pufru, ve kterém byl vzorek rozpuštěný (měřené za stejných podmínek, za kterých je prováděno měření samotných oligonukleotidů), přičemž spektra jsou odečítána v poměru přibližně odpovídajícím poměrům použitého výkonu laseru u obou měření a zkorigována tak, aby na žádném spektru nebylo patrné „přeodečtení“, tedy aby se výrazné pásy spektra pufru neobjevovaly převráceně ve finálním spektru (Palacký, et al., 2011).

Následně se provádí korekce *baseline*, tedy dodatečný odečet zbylého pozadí (ne-Ramanovy příspěvky od mikrokyvety, zbylé fluorescence, atp.). Výhodou takového opravování metodou SVD je fakt, že tento postup lze aplikovat na velké množství spekter (měřených i za odlišných podmínek) najednou, a že není nijak komplikovaný. SVD rozklad totiž koncentruje příspěvky k ne-Ramanovu pozadí do subspekter s nejvyšším  $W_j$  a odečteme-li je tak v těchto subspektrech, zmizí i z původních spekter. Odstranění většinou probíhá proložením dostatečně hladké (tedy ne-Ramanovy) křivky podél průběhu spektra (po odmyšlení Ramanových pásů), většinou se k tomuto účelu užívají polynomy vyššího stupně nebo tzv. *spline*, kdy jsou jednotlivé body určené uživatelem proloženy křivkou, která je lokálně polynomiální a v daných bodech hladká. Ramanova informace takto zůstává nezměněna, stejně tak koeficienty  $W_j$  a  $V_{ij}$ , platí tak vztah (Palacký, et al., 2011):

$$Y_i^*(x) = \sum_j W_j V_{ij} (S_j(x) - P_j(x)) \quad (8)$$

Kde  $P_j(x)$  je zmiňované odečítané pozadí, reprezentované hladkou křivkou.

Další užívanou úpravou je intenzitní normalizace, kdy je upravována absolutní intenzita porovnávaných spekter podle požadavků na výsledná spektra. Obvykle je užívána jako norma velikost vhodně vybraného pásu vzorku nebo vnějšího standardu, u kterého se ví nebo předpokládá, že by měl být u všech porovnávaných spekter stejně intenzivní. Tím se kompenzují například intenzitní rozdíly způsobené odlišnými koncentracemi vzorků, rozdílnou intenzitou excitačního svazku nebo efektivitou sběru rozptýleného záření.

#### 4.2.4. Vyhodnocování naměřených Ramanových spekter

Získaná spektra byla pomocí počítačového softwaru *NeokalSpex3.exe* okalibrována ve vlnočtové škále a převedena do formátu zpracovatelného dalšími programy (autorem použitého softwaru je doc. Jiří Bok) a dále zpracována programem *Main2013.exe* vytvořeném v prostředí *Matlab* (autorem je Mgr. Jan Palacký). Nejprve byl proveden odečet příspěvek pufu a mikrokyvety (pro něž byla také provedena teplotní měření) a poté bylo odečteno zbylé pozadí pomocí programu *Background* ze softwarového balíčku *Main2013.exe*, který rozděluje výsledné spektrum na subspektra (viz výše).

Protože se u jednotlivých vzorků lišila koncentrace oligonukleotidů, byla všechna spektra intenzitně nanormována. Využito k tomu bylo poznatku, že všechny naše vzorky měly stejnou délku oligonukleotidu, tedy i stejné množství fosfátových skupin. Spektra tak byla nanormována podle Ramanova pásu fosfátové skupiny na  $1093\text{ cm}^{-1}$  (Palacký, et al., 2013) tak, aby byl tento pás stejný ve spektrech všech vzorků. V případě spekter měřených na Ramanově mikroskopu WITec bylo využito pásu C-H vibrací (hodnota okolo  $3000\text{ cm}^{-1}$ ), do něž nejvíce přispívá svými vibracemi deoxyribóza, jejíž množství by také mělo být u stejných koncentrací vzorků neměnné.

Pro nejnižší teplotu  $t=5^{\circ}\text{C}$  byla získána diferenční spektra oligonukleotidů s A, G, T nebo C ve smyčkách, a to odečtením spektra S-G15 obsahující místo báze pouze abazickou skupinu S. Tato diferenční spektra, která by měla obsahovat hlavně příspěvky od bází ve smyčkách, byla porovnána s Ramanovými spektry příslušných bází, viz grafy 2 a 3.

Teplotní měření byly dále využity k vytvoření diferenčních spekter, znázorňujících vývoj Ramanových spekter jednotlivých vzorků v závislosti na teplotě. Prozkoumány byly i závislosti koeficientů subspekter z faktorové analýzy

pro teplotně závislá spektra daného vzorku. Následně byly také zkoumány rozdíly spekter získaných pro konkrétní teploty při ohřívání vzorku a spekter získaných při jeho následném ochlazování.

U měření na Ramanově mikroskopu byla porovnána spektra krystalů A-G15 se spektrem roztoku A-G15 v okolí krystalu a bylo také vytvořeno diferenční spektrum těchto dvou spekter.

Přístrojová chyba měření Ramanových spekter je minimální – hlavní podíl na celkové chybě může spočívat ve špatné kalibraci vlnočtové škály spekter (nepřesně známá excitační délka laseru, pokud by laser v průběhu měření nebo v různých dnech měnil podélný mód), případně u širších pásů pak nepřesný odečet jeho polohy. U přesně provedeného měření a vyhodnocení je však taková chyba odhadována maximálně na  $0.05 \text{ cm}^{-1}$ . Polohy pásů uvádíme zaokrouhleně na celé  $\text{cm}^{-1}$ . Mezi další možné chyby patří také specifika aparatury (nefunkční pixely na CCD detektoru, etalonový efekt), z nichž některá se mohou objevit i ve výsledných spektrech, jedná se však o nevýrazné artefakty a výsledky to významněji neovlivňuje.



### 4.3. Měření absorpčních spekter a jejich vyhodnocování

Absorpční spektra byla naměřena v rozsahu vlnových délek 200 nm až 400 nm s krokem 1 nm s využitím dvoupraprskového absorpčního spektrofotometru Lambda 12 (Perkin Elmer). Vzorek byl pro tyto účely 2000× zředěn deionizovanou vodou, jako reference byl použit 2000× zředěný K<sup>+</sup>-PBS pufr. Spektra byla měřena v 1 cm křemenných kyvetách (Hellma). Nejprve byla naměřena absorpční spektra při teplotě 20°C, tj. pro vzorky s vytvořenou strukturou kvadruplexu, a poté při teplotě 95°C, tj. při teplotě významně vyšší než publikována teplota tání příslušných kvadruplexů (Sengar, et al., 2014). Byla provedena drobná úprava pozadí tak, aby spektrální oblasti, kde vzorky již neabsorbují, odpovídala nulová absorbance. Následně byla pro hodnotu vlnové délky, pro niž je od výrobce známý teoretický molární extinkční koeficient každého konkrétního oligonukleotidu (v našem případě pro 260 nm) určena hodnota absorbance a dle vztahu 4 spočtena koncentrace měřeného vzorku. Koncentrace neředěného zásobního roztoku byla určena jako 2000× vyšší.

Chyba tohoto určení koncentrace mohla být způsobena zejména nepřesně odebraným objemem koncentrovaného vzorku či odebrání některé více či méně koncentrované frakce roztoku obsahující případné mikrokrystalky. Tomuto jsme se pokoušeli zabránit předchozím promícháním vzorku, jeho ohřevem před ředěním a přesným určováním pipetovaných objemů. Přístrojová chyba určení absorbance je oproti tomuto možnému problému nevýznamná.

#### 4.4. Měření CD spekter a jejich vyhodnocování

CD spektra byla měřena na zařízení J-1500 (JASCO) vybaveného držákem vzorků s termoelektrickou regulací teploty (Peltier), umožňující přesné nastavení teploty měřených vzorků v rozmezí 0°C – 100°C. Spektra byla měřena v 1 cm křemenných kyvetách (Hellma), přičemž teplota byla měřena přímo v kyvetě. Při měření bylo zajištěno promíchávání vzorků drobným magnetem, rotujícím v regulovatelném magnetickém poli (cca 800 rotací za minutu). Při změně teploty se před samotným měřením alespoň 3 minuty počkalo na její ustálení a případné dosažení termodynamické rovnováhy přítomných struktur.

Postup měření byl následovný: nejprve byl odebrán objem 1  $\mu$ l ze zásobního roztoku a rozpuštěn ve 2 ml deionizované vody. Tímto bylo dosaženo naředění oligonukleotidu i pufru při zachování původního poměru  $K^+$  k oligonukleotidu. Pro takto získané vzorky byla změřena CD spektra v rozmezí 200 - 330 nm při 20°C, při 95°C a následně opět při 20°C po ochlazení předtím roztátého vzorku. Takto získaná spektra pak byla porovnávána.

Poté byly připraveny dva vzorky z 1  $\mu$ l zásobního roztoku T-G15, jednou ve 2 ml vody a druhé ve 2 ml pufru (240 mM  $K^+$  a 50 mM PBS), přičemž byly zkoumány rozdíly spekter těchto vzorků při různých teplotách (rozmezí opět 200 - 330 nm).

Následně byly připravené vzorky obsahující 3  $\mu$ M zkoumaných oligonukleotidů a to ředěním zásobního roztoku deionizovanou vodou, resp.  $K^+$ -PBS pufrům, a 3  $\mu$ M kationického porfyrinu CuTMPyP4. Interakce CuTMPyP4 s kvadruplexem TBA (thrombin binding aptamer) pro molární poměr 1:1 byl zkoumán za podobných koncentrací v práci (Palacký, 2012)). V našem měření byla spektra naměřena pouze pro 20°C. V práci (Palacký, 2012) byl při tvorbě komplexu pozorován výrazný indukovaný CD signál CuTMPyP4 v oblasti jeho absorpce, proto byla zkoumaná část spektra rozšířena na 200 - 480 nm, aby bylo možno současně pozorovat změny na kvadruplexu i ligandu.

Zkoumání CD spekter probíhalo skrze jejich vzájemná srovnávání a porovnáním s hodnotami charakteristickými pro různé konformace G-kvadruplexů (viz sekce 3.2.). Pro možnost porovnávat přímo i CD spektra vzorků o různých koncentracích a jiných molekulárních hmotnostech, byly v některých případech

naměřené jednotky v millidegree [ $m^\circ$ ] převedeny na jednotky molární elipticity dle vztahu <sup>7</sup>:

$$CD[\theta] = \frac{CD[m^\circ] * M[g \cdot mol^{-1}]}{10 * l[cm] * c[g \cdot l^{-1}]} \quad (9)$$

Kde  $CD$  značí CD signál měřený přístrojem,  $M$  průměrnou molární hmotnost molekul,  $l$  optickou dráhu ve vzorku a  $c$  koncentraci vzorku, v hranatých závorkách jsou uvedeny dosazované jednotky.

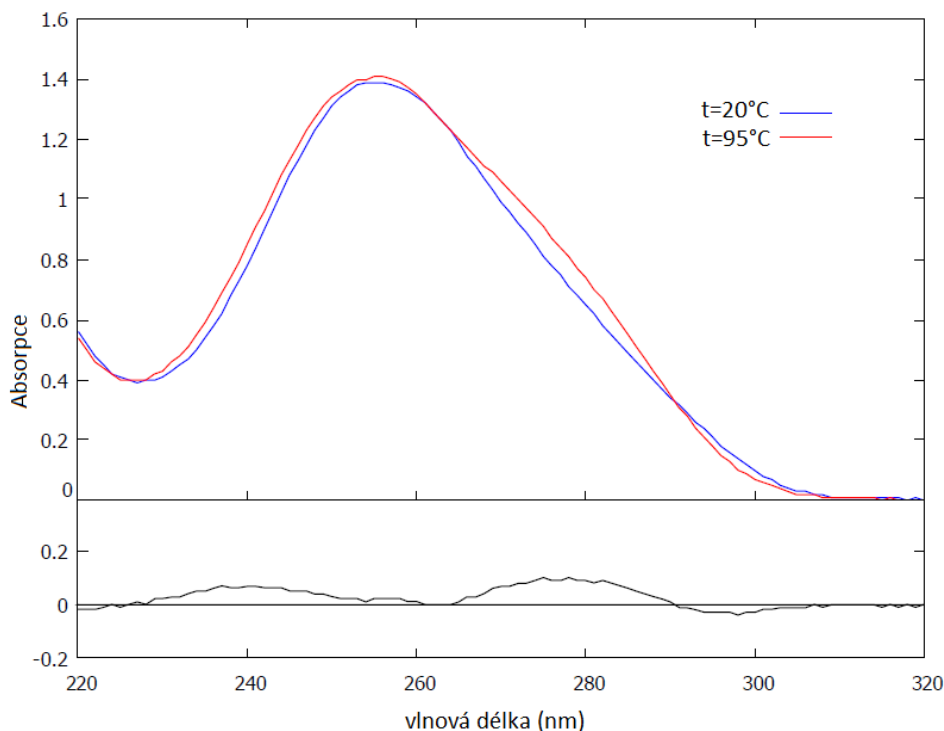
---

<sup>7</sup> <https://www.chem.uci.edu/~dmitryf/manuals/Fundamentals/CD%20practical%20guide.pdf>

## 5. Výsledky měření

### 5.1. Absorpční spektra a určení koncentrace zásobních vzorků

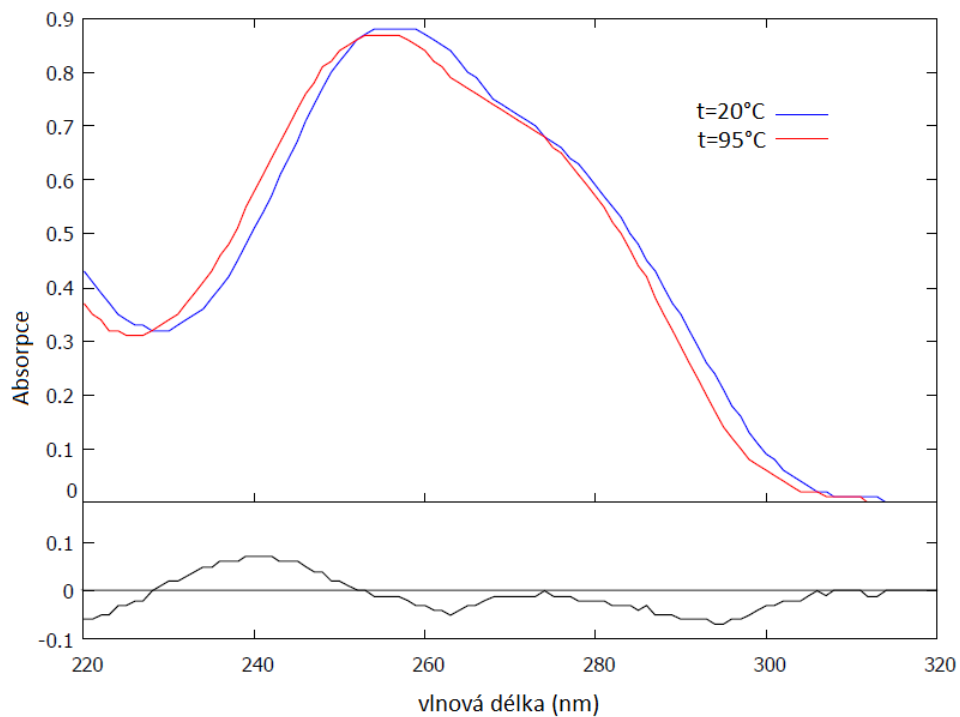
Naměřená absorpční spektra oligonukleotidů A-G15, C-G15, G-G15, S-G15 a T-G15 ukazují grafy 4 až 8, na nichž lze pozorovat změny v absorbanci po termální denaturaci struktur kvadruplexu. Byly měřené zásobní roztoky po 2000× ředění deionizovanou vodou, tj. koncentrace oligonukleotidu byla asi 4 – 7  $\mu\text{M}$ , v 25  $\mu\text{M}$   $\text{K}^+$ -PBS, s celkovou koncentrací  $\text{K}^+$  120  $\mu\text{M}$ . Pro lepší názornost byla vytvořena diferenční spektra umístěná pod grafy s naměřenými křivkami, na nichž na všech lze pozorovat očekávaný hyperchromismus v oblasti kolem 240 - 245 nm a 270-275 nm, a hypochromismus v oblasti kolem 295 nm.<sup>8</sup>



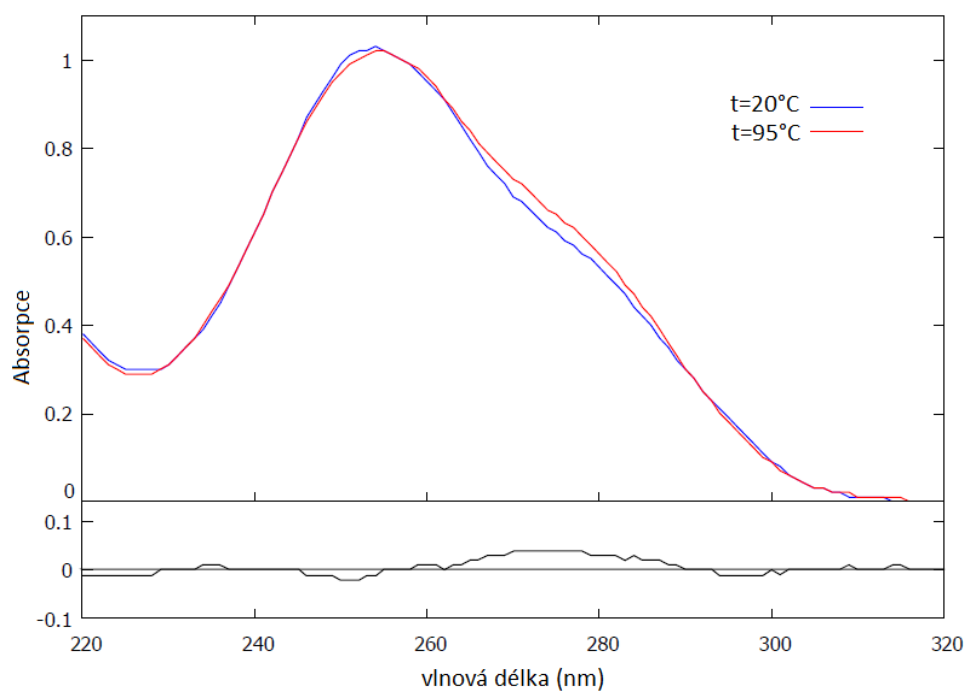
Graf 4: Absorpční spektra vzorku A-G15 pro teploty 20°C, 95°C a jejich rozdíl.

---

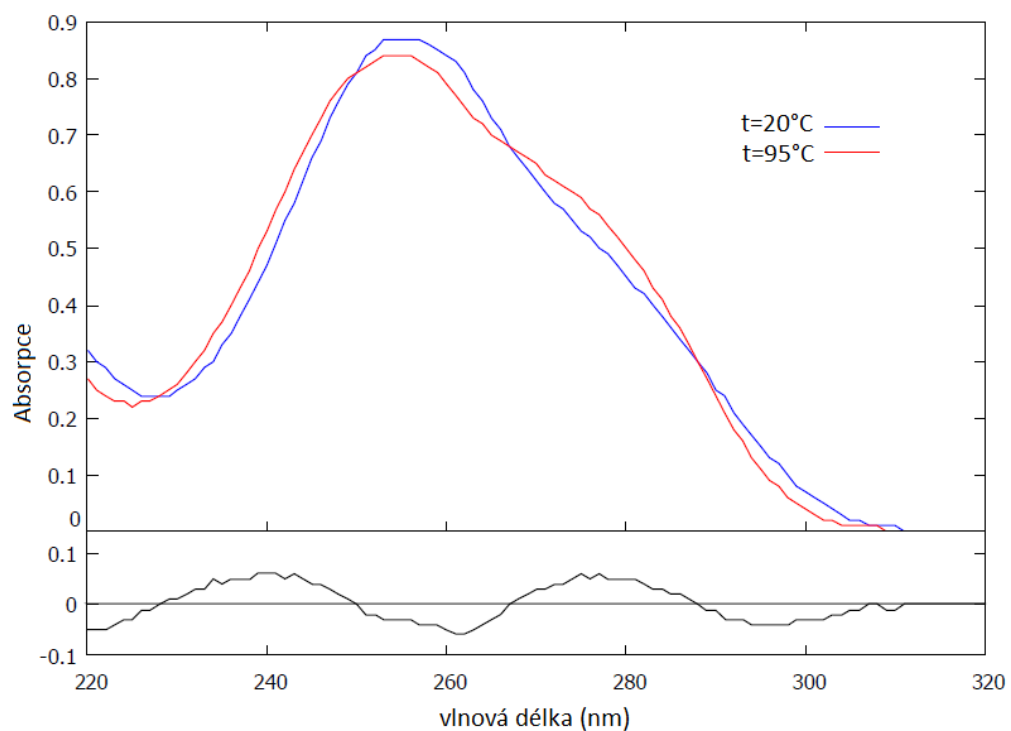
<sup>8</sup> S výjimkou C-G15, kde hyperchromismus v oblasti 270 - 275 nm není patrný a spíše jde o zvýšení oproti okolním nižším hodnotám. Ostatní markery jsou však i pro C-G15 dosti výrazné a ke změnám dané oblasti, požadovaným pro kvadruplexovou strukturu, evidentně dochází.



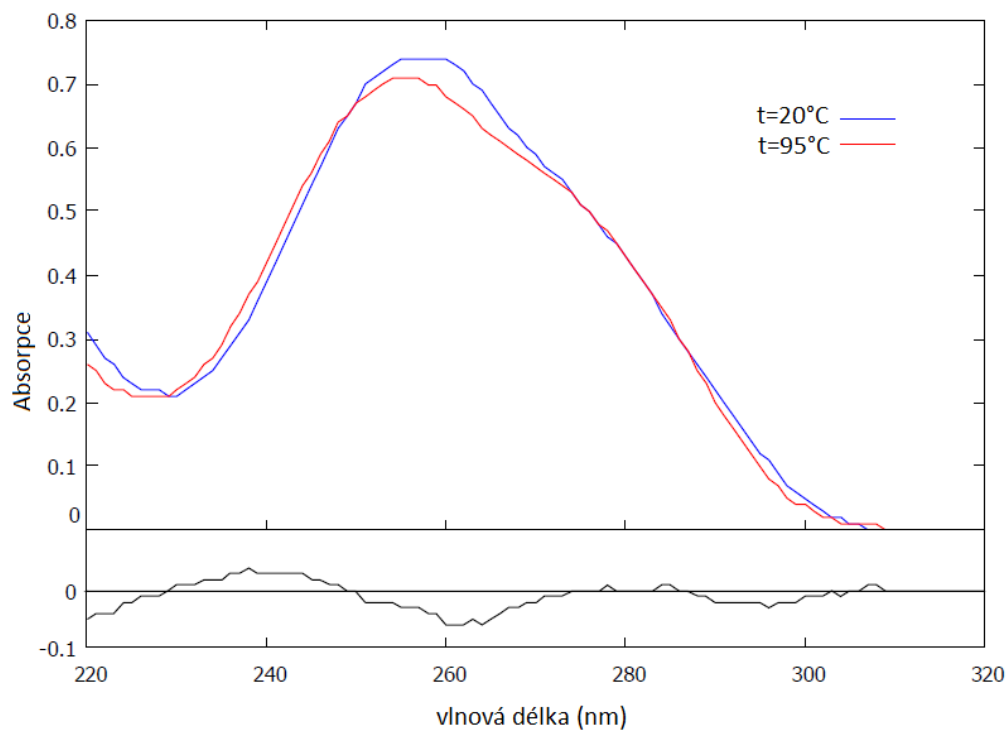
Graf 5: Absorpční spektra vzorku C-G15 pro teploty 20°C, 95°C a jejich rozdíl.



Graf 6: Absorpční spektra vzorku G-G15 pro teploty 20°C, 95°C a jejich rozdíl.



Graf 7: Absorpční spektra vzorku S-G15 pro teploty  $20^{\circ}\text{C}$ ,  $95^{\circ}\text{C}$  a jejich rozdíl.



Graf 8: Absorpční spektra vzorku T-G15 pro teploty  $20^{\circ}\text{C}$ ,  $95^{\circ}\text{C}$  a jejich rozdíl.

Podle vztahu 4 byly z absorbance při vlnové délce 260 nm vypočteny skutečné koncentrace zásobních roztoků pro obě teploty (s užitím hodnot  $\epsilon$  z tabulky 3), viz tabulka 4.

	koncentrace určená z absorbance měřené při 20°C (mM)	koncentrace určená z absorbance měřené při 95°C (mM)
A-G15	13,6	13,5 <sup>9</sup>
C-G15	10,3	9,9
G-G15	10,5	10,6
S-G16	11,3	10,6
T-G17	8,5	7,9

Tabulka 4: Koncentrace zásobních roztoků určené z absorbancí naměřených při rozdílných teplotách.

Z výsledků tabulky vyplývá, že koncentrace určená při 95°C je přibližně stejná nebo trochu nižší než hodnota spočtená pro 20°C. Skutečné koncentraci zásobního roztoku by měla odpovídat spíše hodnota při 95°C (tj. pro denaturovanou strukturu), protože absorpční spektra jsou vytvořením kvadruplexu ovlivněna intenzitně (viz grafy 4 – 8), a teoretické hodnoty extinkčních koeficientů poskytnutých výrobcem jsou počítané podle univerzálního postupu, který s tvorbou kvadruplexu (nebo jiné uspořádané struktury) nepočítá.

---

<sup>9</sup> Měření absorbance A-G15 bylo opakováno z důvodu tvorby krystalků (viz dále) a s tím souvisejícího podezření na odebrání koncentrovanějšího vzorku při prvním měření. Z opakovaného měření byla určena koncentrace při teplotě 20°C jako 13,6 mM, zatímco předtím byla určena jako 14,1. Pro 95°C měření opakováno nebylo, hodnota v tabulce je místo toho hodnota určená z naměřené absorbance z prvního měření, snižená o stejnou hodnotu jako se snížila koncentrace při 20°C.

## 5.2. Ramanova spektra

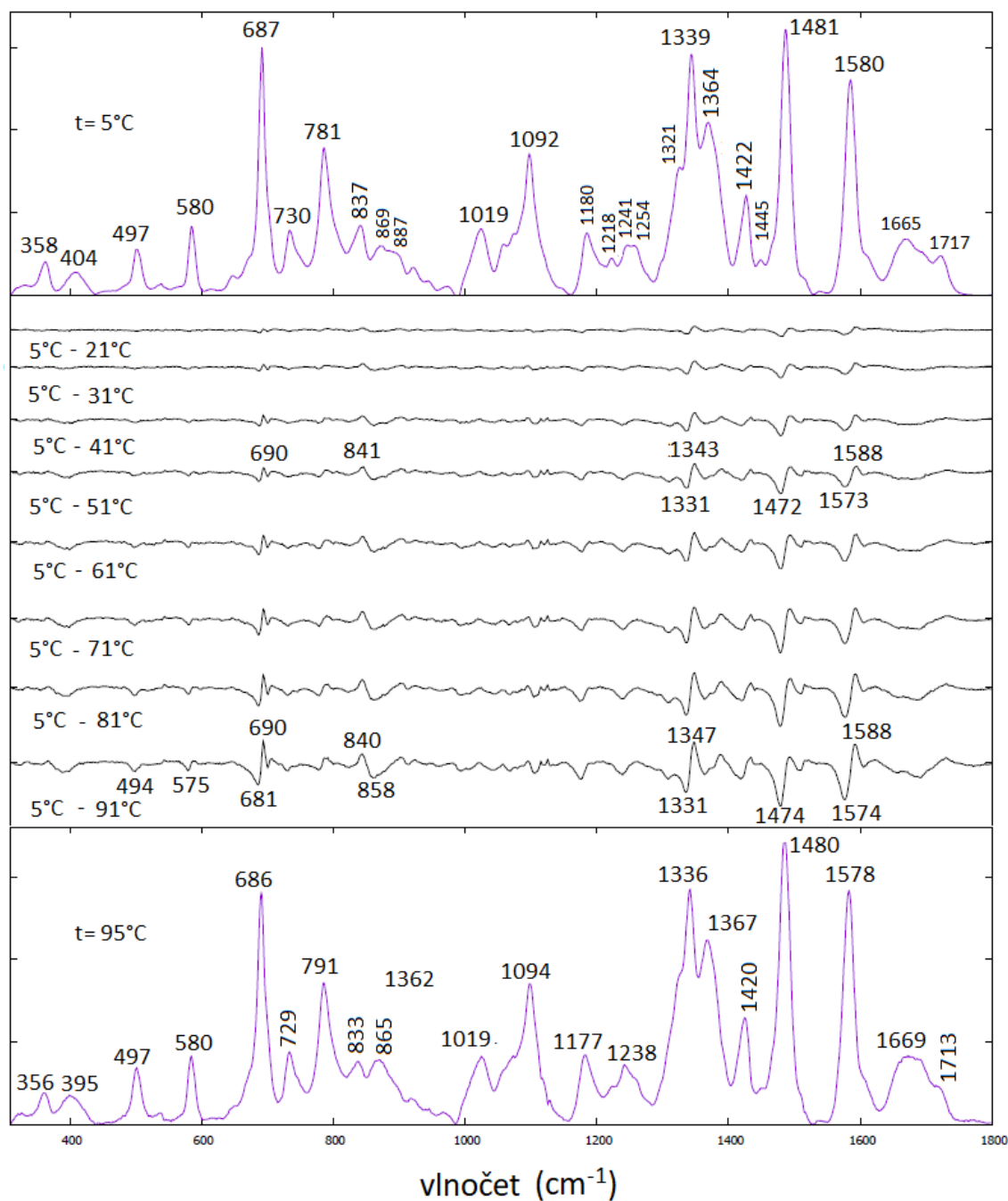
### 5.2.1. Změny Ramanových spekter s rostoucí teplotou

V rámci této práce byla změřena Ramanova spektra zasobních, tj. vysoce koncentrovaných roztoků oligonukleotidů v 50 mM  $K^+$ -PBS s celkovou koncentrací  $K^+$  240 mM. Postupný vývoj Ramanových spekter jednotlivých oligonukleotidů (koncentrace viz tabulka 4) s rostoucí teplotou shrnují grafy 9 až 13, kdy nahoře a dole je v každém obrázku spektrum naměřené pro 5°C a pro 95°C, mezi nimi jsou pak diferenční spektra jiných teplot a 5°C (viz grafy).

Podle tabulky 2 byly následně interpretovány pásy charakteristické pro vznik a konformaci kvadruplexové struktury. Pro všechny zkoumané oligonukleotidy je ze spekter naprosto a jednoznačně zřejmé, že za přítomnosti  $K^+$  iontů (o koncentraci 240 mM) a při teplotě 5°C vytvářejí paralelní kvadruplexy. Rostoucí teplota vyvolává určité změny struktury, ale vysoce pravidelné uspořádání paralelních kvadruplexů se nerozpadne ani při teplotě 95°C. Pro podrobnější přehled zkoumaných markerů viz tabulka 5, popisující i některé další viditelné změny, které se ve spektrech s měnící se teplotou objevily.

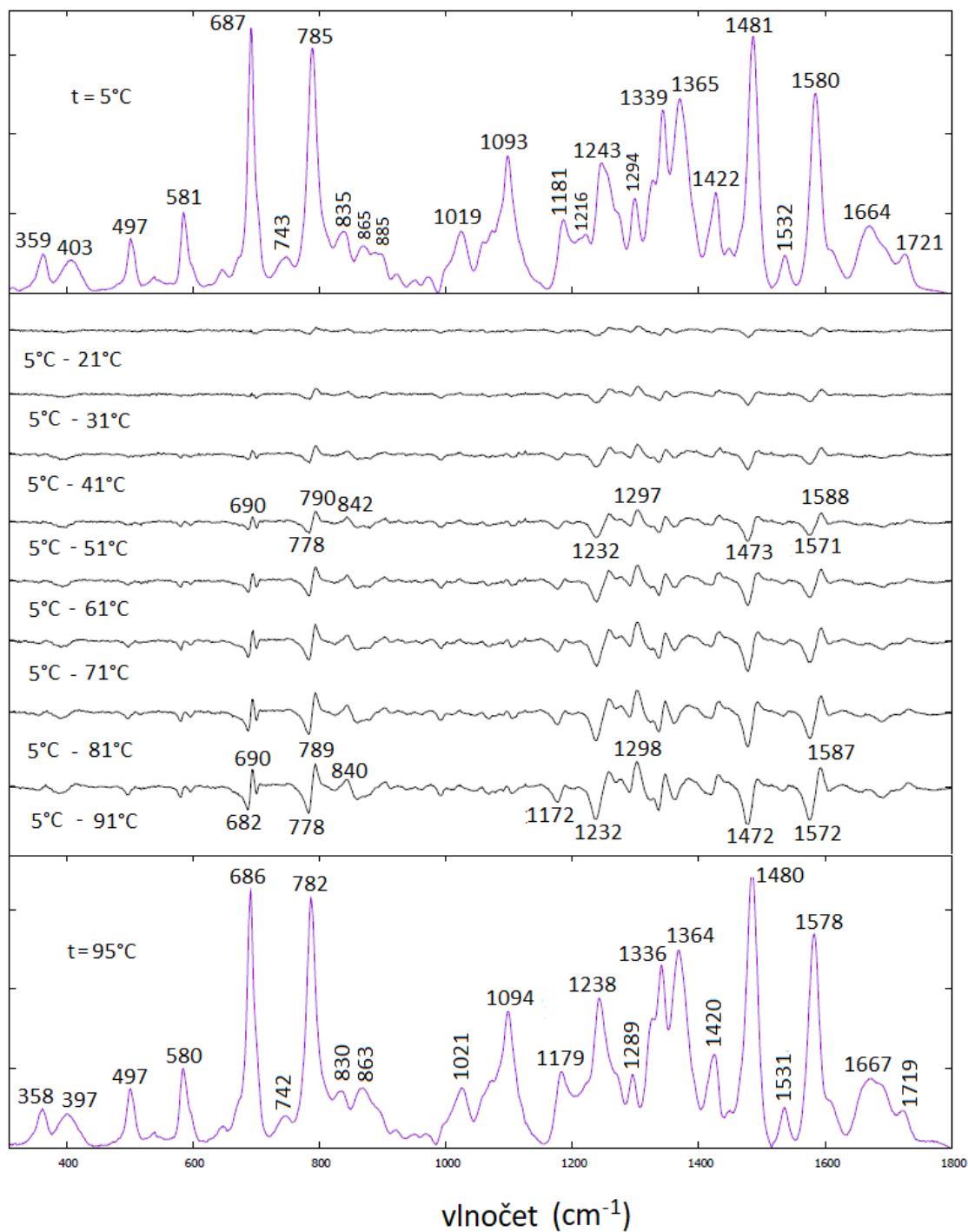


Ramanův signál



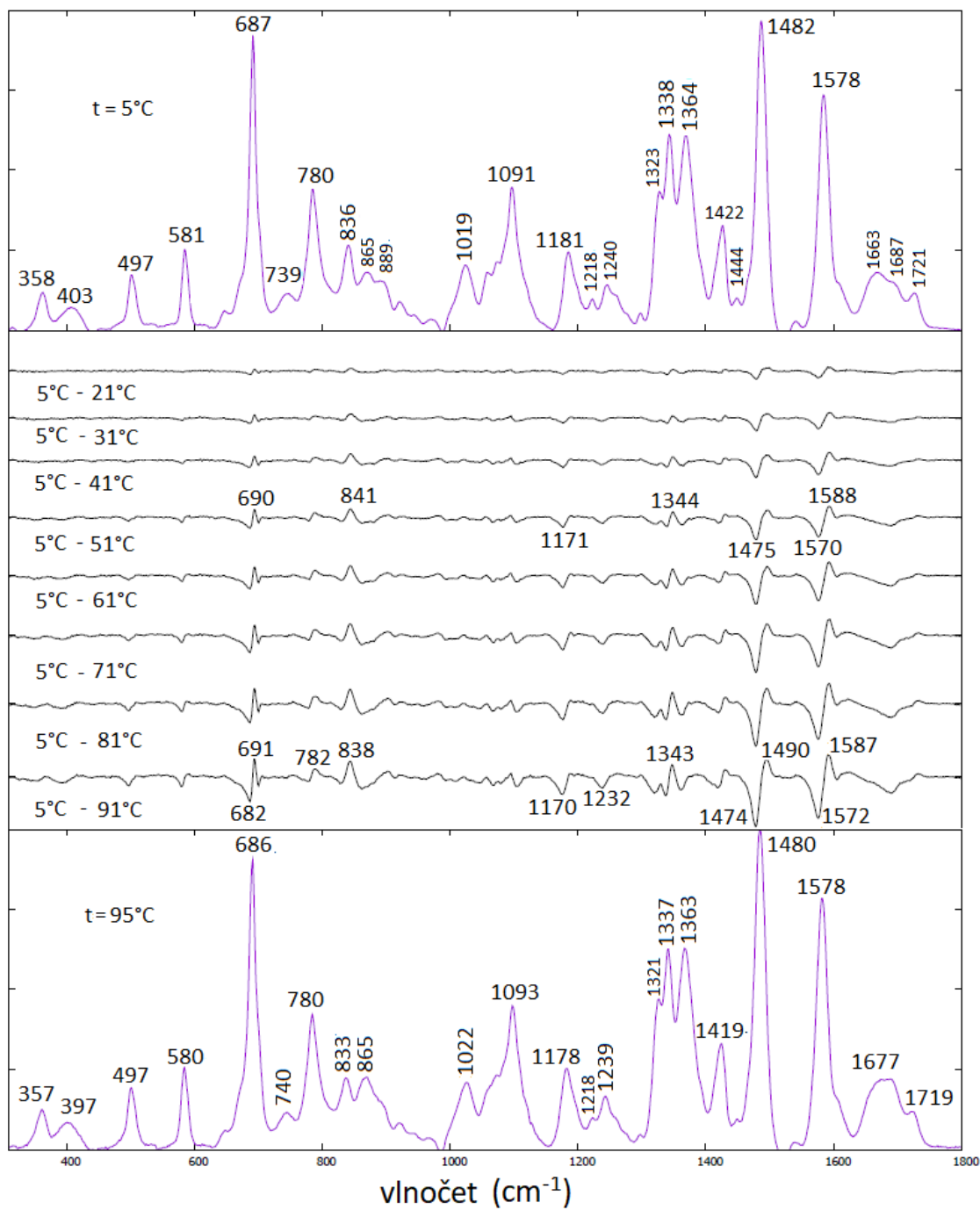
Graf 9: Změna Ramanových spekter A-G15 s rostoucí teplotou. Koncentrace A-G15 byla 13,5 mM, v 50 mM K<sup>+</sup>-PBS s celkovou koncentrací K<sup>+</sup> 240 mM.

Ramanův signál



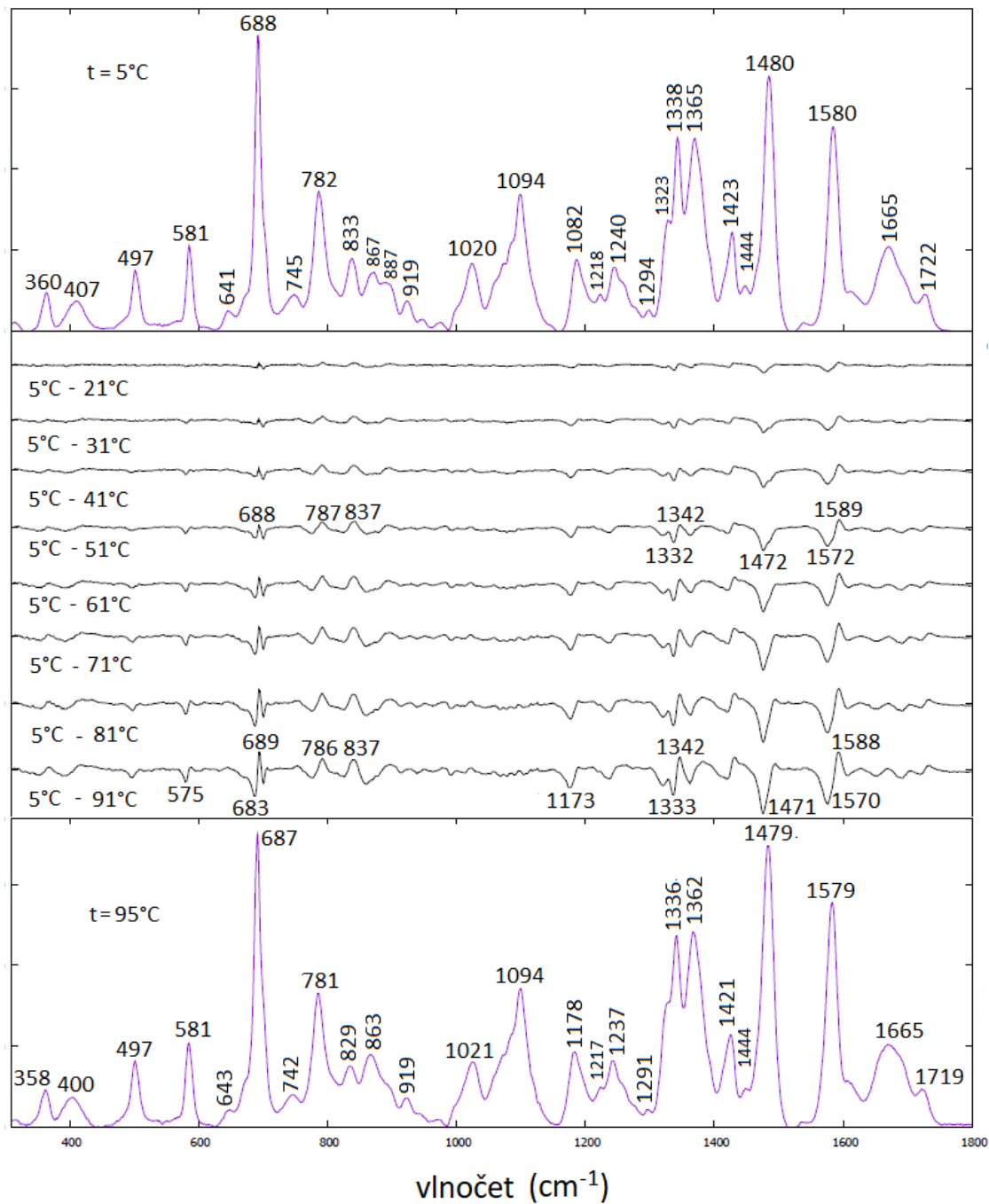
Graf 10: Změna Ramanových spekter C-G15 s rostoucí teplotou. Koncentrace C-G15 byla 9,9 mM, v 50 mM  $\text{K}^+$ -PBS s celkovou koncentrací  $\text{K}^+$  240 mM.

Ramanův signál



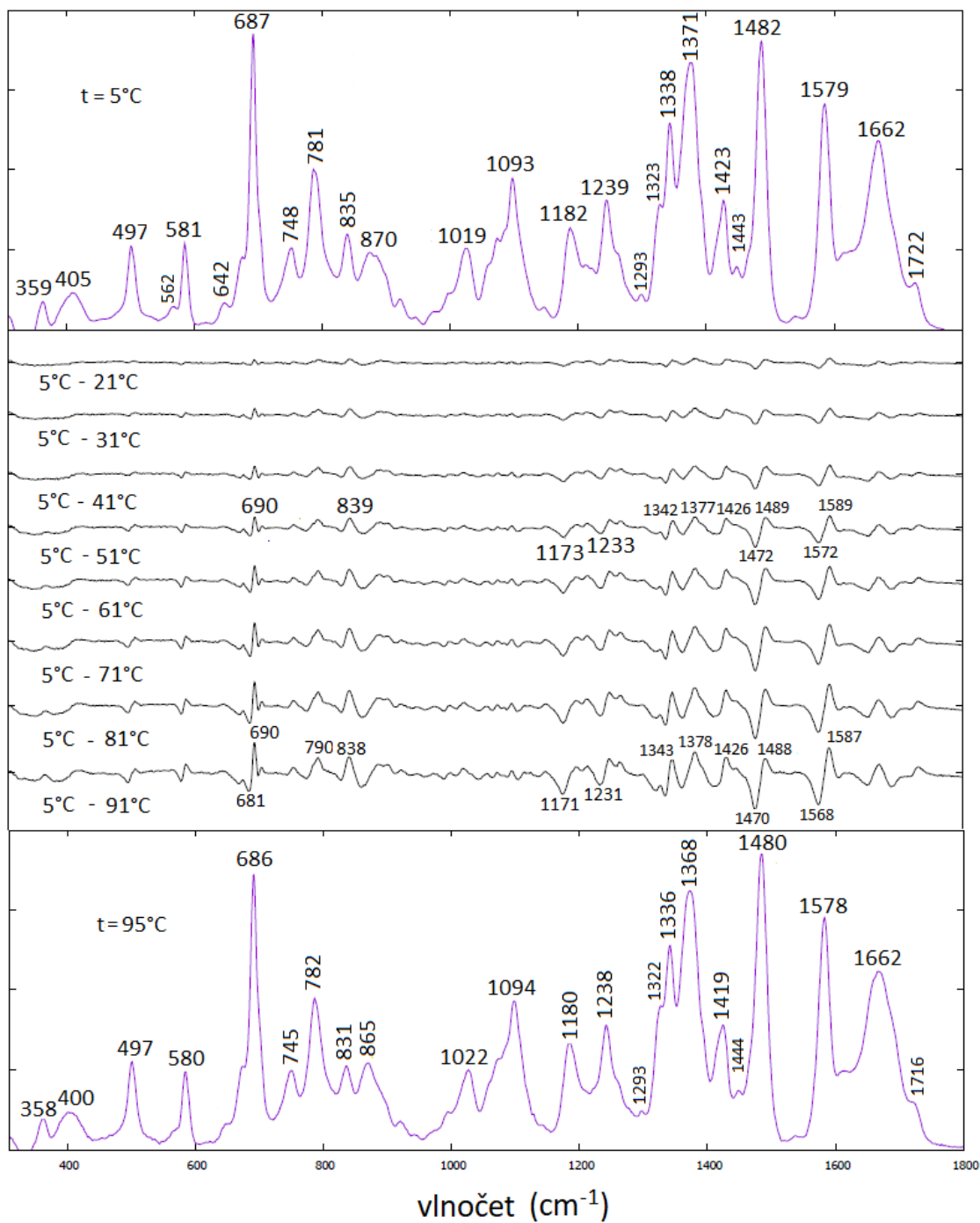
Graf 11: Změna Ramanových spekter G-G15 s rostoucí teplotou. Koncentrace G-G15 byla 10,6 mM, v 50 mM  $\text{K}^+$ -PBS s celkovou koncentrací  $\text{K}^+$  240 mM.

Ramanův signál



Graf 12: Změna Ramanových spekter S-G15 s rostoucí teplotou. Koncentrace S-G15 byla 10,6 mM, v 50 mM  $\text{K}^+$ -PBS s celkovou koncentrací  $\text{K}^+$  240 mM.

Ramanův signál



Graf 13: Změna Ramanových spekter T-G15 s rostoucí teplotou. Koncentrace T-G15 byla 7,9 mM, v 50 mM K<sup>+</sup>-PBS s celkovou koncentrací K<sup>+</sup> 240 mM.

marker (cm <sup>-1</sup> )	P-Q/ AP-Q	A-G15 (cm <sup>-1</sup> )	C-G15 (cm <sup>-1</sup> )	G-G15 (cm <sup>-1</sup> )	S-G15 (cm <sup>-1</sup> )	T-G15 (cm <sup>-1</sup> )
499	AP-Q	497 mz	497 mz	497 mz	497 mz	497 mz
581	P-Q	580 mz	581 mz	581 mz	581 mz	581 mz
611	AP-Q	-	-	-	-	-
671	AP-Q	mp	mp	mp	mp	mp
686	P-Q	687 z	687 z	687 z	688 z	687 z
781	P-Q	781 z	785 z	780 mz	782 mz	781 mz
837	P-Q/ AP-Q	837 z	835 z	836 z	833 z	835 z
1093	P-Q/ AP-Q	1092 n	1093 n	1091 nz	1094 nz	1093 nz
1322	-	mp	mp	mp	mp	mp
1326	AP-Q	1321 n	mp	1323 mz	mp	mp
1338	P-Q	1339 z	1339 z	1338 z	1338 z	1338 z
1371	AP-Q	1364 mz	-	mp	1365 nz	-
1483	P-Q/ AP-Q	1481 z	1481 z	1482 z	1480 z	1482 z
1578	-	-	mp	mp	-	-
1581	P-Q/ AP-Q	1580 z	1580 z	1578 z	1580 z	1579 z
1688	-	mp	mp	mp	mp	mp
1719	P-Q/ AP-Q	1717 z	1721 z	1721 z	1722 z	1722 z

další pozorované změny:	přesun pásu 404 na 395	přesun pásu 403 na 397	posun pásu 403 na 397	posun pásu 407 na 400	posun pásu 405 na 400
	865 z	865 z	865 z	865 z	870 z
	rozšíření 1669	rozšíření 1664	rozšíření kolem 1665	rozšíření kolem 1665	není vidět (okolo 1665 pás thyminu)
	marker okolo 1715, posun níže	marker okolo 1715, posun níže	marker okolo 1715, posun níže	marker okolo 1715, posun níže	marker okolo 1715, posun níže

Legenda zkratk z tabulky 5:

mz... malá změna s rostoucí teplotou

z... změna s rostoucí teplotou

n... nemění se s rostoucí teplotou

mp... možná malý příspěvek k širšímu pásu

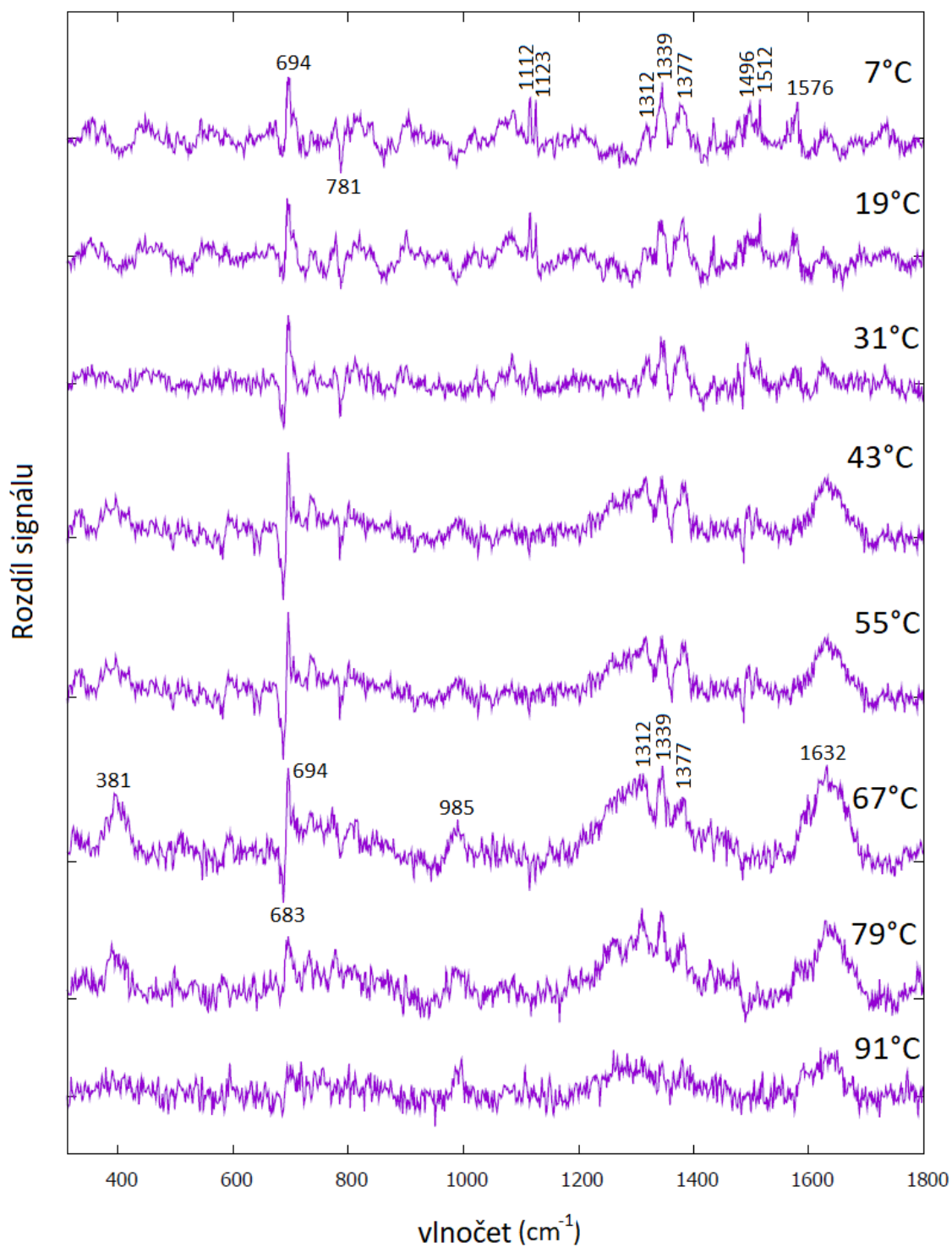
Tabulka 5: Přehled markerů indikujících přítomnost nebo strukturu s kvadruplexů (paralelní / antiparalelní / žádný) v grafech 9 až 13, a shrnutí dalších spektrálních změn pozorovaných v těchto spektrech

### 5.2.2. Rozdíly Ramanových spekter kvadruplexů při ochlazování a ohřívání

Grafy 14 až 18 obsahují diferenční spektra získaná z rozdílu spekter při ohřívání vzorku a následně při jeho ochlazování po dosažení maximální teploty, přičemž můžeme pozorovat jejich vývoj s měnící se teplotou.

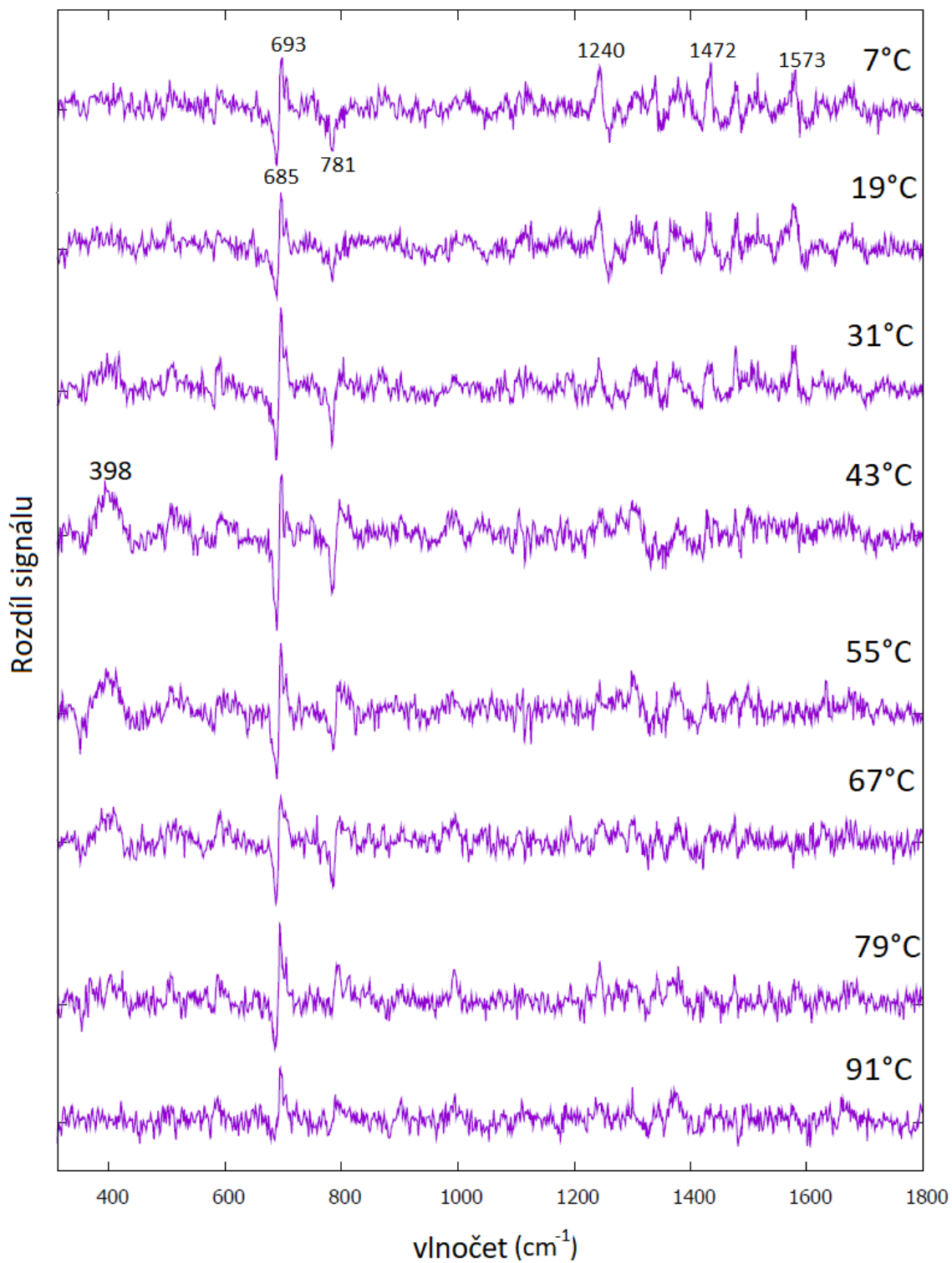
Tyto rozdíly jsou sice velmi slabé, přesto je možné, že se některé pásy po ohřátí a následném ochlazení opravdu změnilo. Významná část těchto změn se pak vyskytuje v okolí charakteristických pásů souvisejících s konformací kvadruplexů, viz tabulka 2. Některé kvadruplexy se tedy pravděpodobně po roztátí struktury (proces denaturace) následně sbalily (proces renaturace) trochu jinak, nicméně paralelní struktura zůstala sbalená stejně. Drobné rozdíly mohou souviset s tím, že vzorky po výměně zbytků solí původního pufru za  $K^+$ -PBS nebyly vystavené teplotnímu ohřevu a možnosti nabýt termodynamické rovnováhy (tzv. annealing; žíhání). Přestože výměna pufru „za studena“ při teplotě 20°C vedla jednoznačně k vytvoření paralelního kvadruplexu, mohly zůstat nezrelaxované úseky, které zrelaxovaly až při ohřevu a ochlazování. Další drobné změny mohou souviset například s teplotními změnami pufru nebo v nedokonale odečteném pozadí (týká se pravděpodobně spekter s A-G15 a T-G15).

Lze si také povšimnout, že u různých oligonukleotidů jsou významněji změněné různé pásy (například G-G15 například nemá tak významný pás kolem  $685\text{ cm}^{-1}$  jako zbylé vzorky a i zbylé změny jsou slabé, oproti tomu má silný pás okolo  $1485\text{ cm}^{-1}$ ).

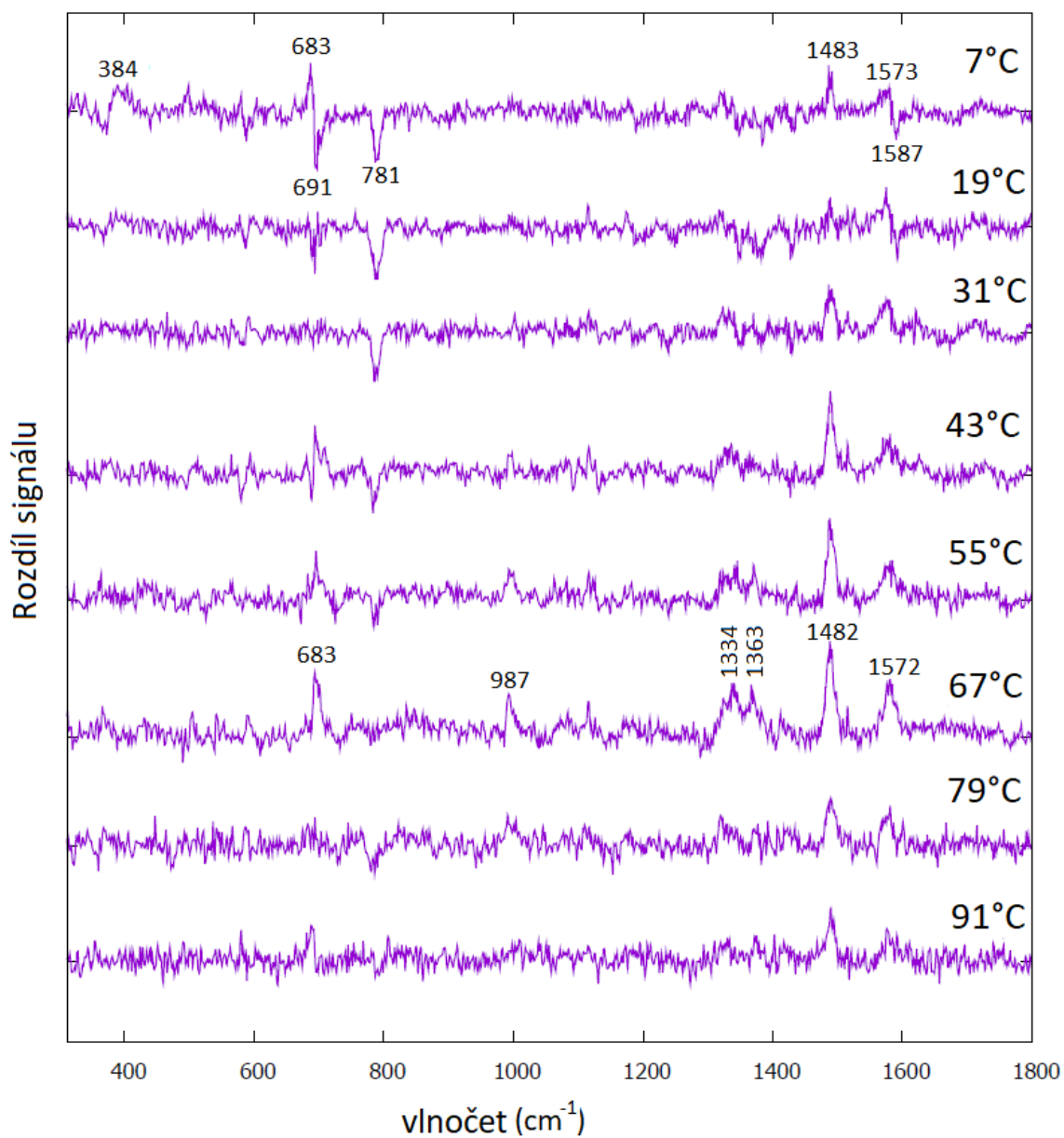


Graf 14: Rozdíl Ramanových spekter pro různé teploty, naměřených při zahřívání a následném ochlazování vzorku A-G15.

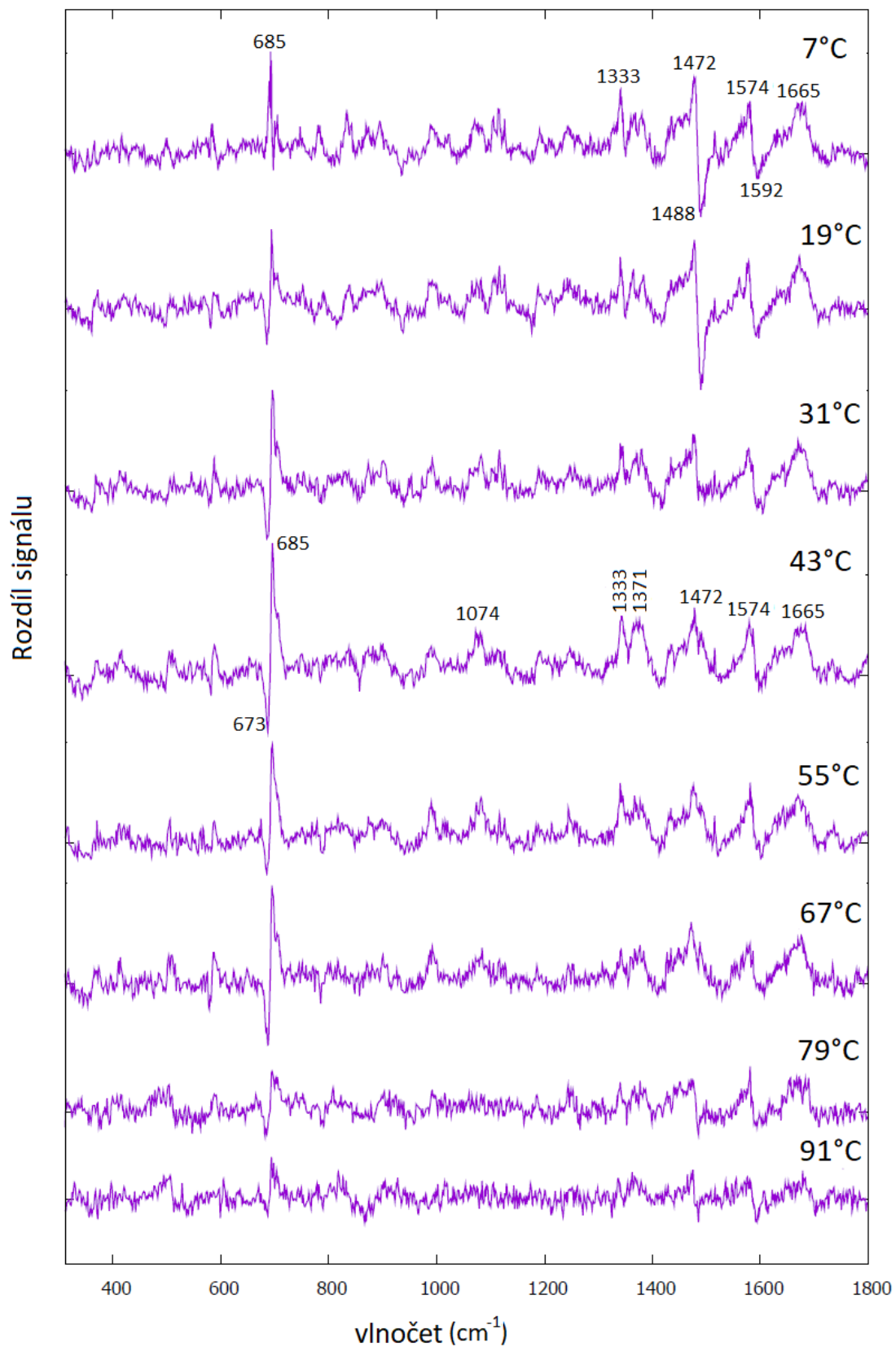




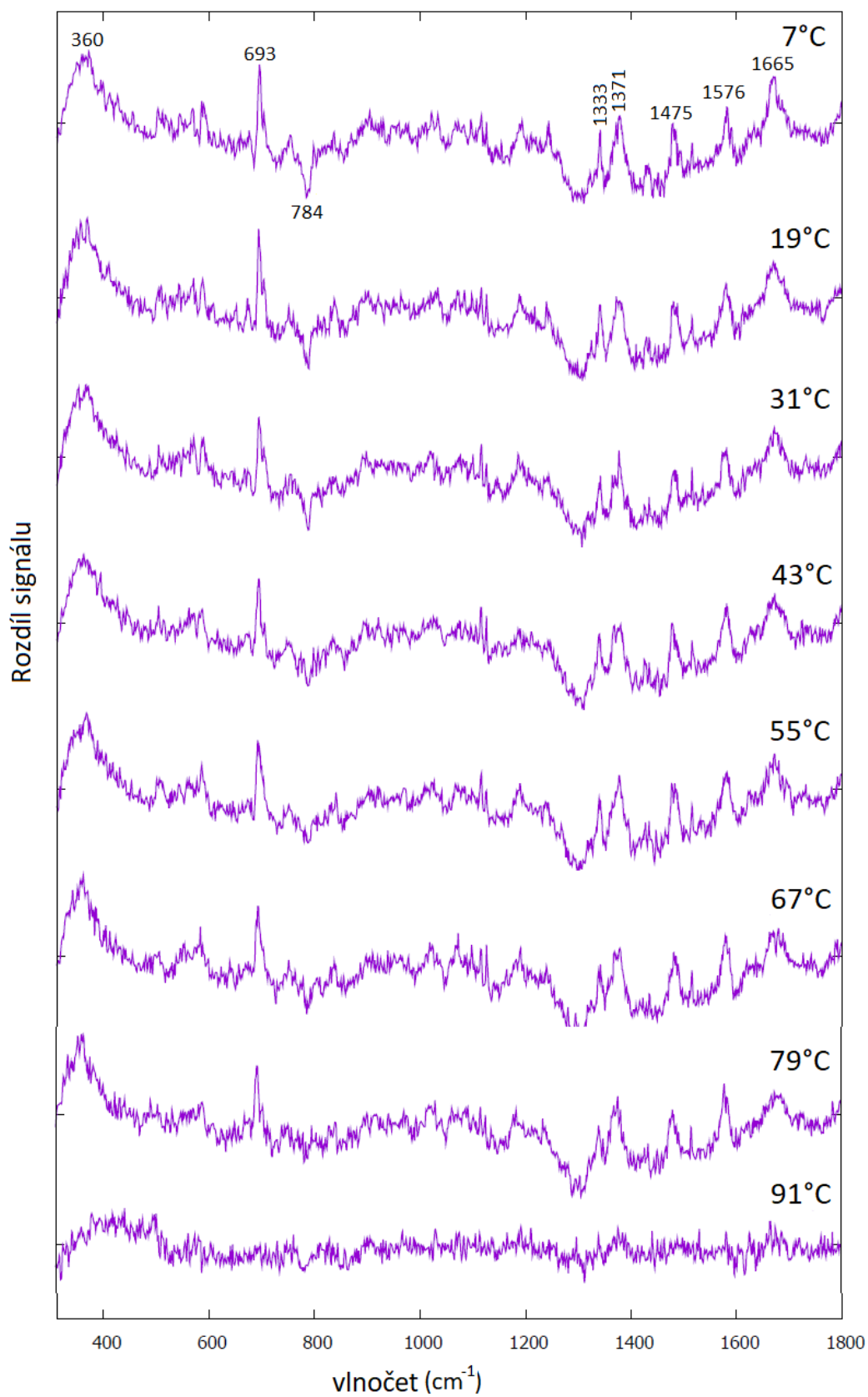
Graf 15: Rozdíl Ramanových spekter pro různé teploty, naměřených při zahřívání a následném ochlazení vzorku C-G15.



Graf 16: Rozdíl Ramanových spekter pro různé teploty, naměřených při zahřívání a následném ochlazení vzorku G-G15.



Graf 17: Rozdíl Ramanových spekter pro různé teploty, naměřených při zahřívání a následném ochlazení vzorku S-G15.



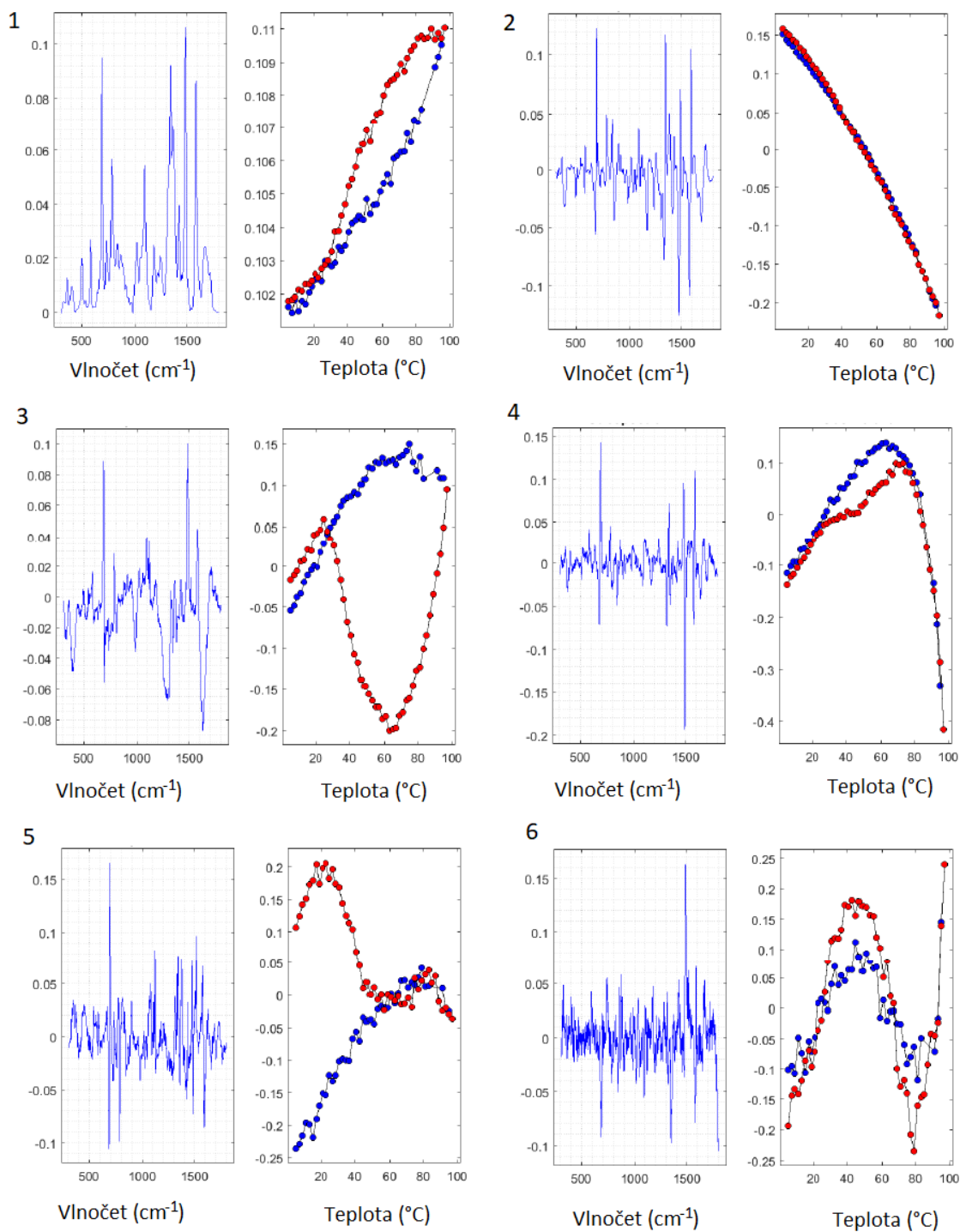
Graf 18: Rozdíl Ramanových spekter pro různé teploty, naměřených při zahřívání a následném ochlazení vzorku T-G15.

### 5.2.3. Faktorová analýza termálních křivek kvadruplexů

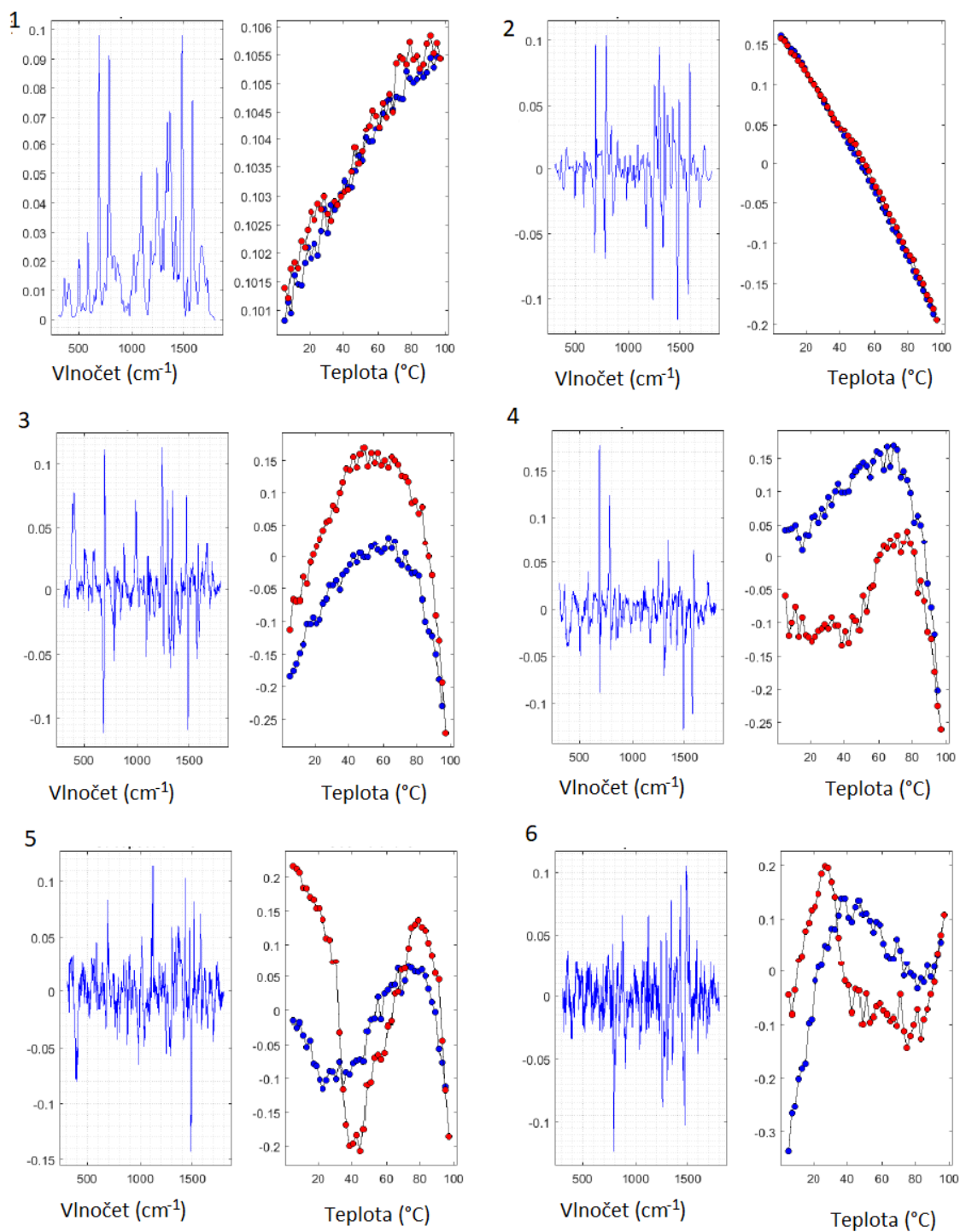
Na neúplnou reverzibilitu při ochlazování a ohřívání koncentrovaných roztoků všech zde studovaných kvadruplexů poukazují kromě výše ukázaných grafů 14 až 18 i výsledky faktorové analýzy. Vyneseme-li koeficienty  $V_{ij}$  v závislosti na teplotě do grafu, zjistíme, že pro některé z nich se křivka pro ohřívání a pro ochlazování liší svým průběhem, jiné se naopak skoro dokonale překrývají. Některé složky výsledných Ramanových spekter jsou tak závislé na tom, jakým způsobem se systém k dané teplotě dostal. Připomínáme, že ani v jednom případě nedošlo k významnější denuraci paralelní struktury kvadruplexu, který se při této koncentraci oligonukleotidu a přítomnosti 240 mM  $K^+$  udržel i při teplotě 95°C. Všechny pozorované změny jsou malé a v této míře pozorovatelné pouze za pomoci faktorové analýzy.

Grafy 19 až 23 obsahují přehled prvních 6 subspekter  $S_j$  a závislostí jejich koeficientů  $V_{ij}$  na teplotě; další subspektra již obsahují více šumu než spektrální informace, proto je neuvádíme. Z těchto grafů si lze všimnout, že druhý koeficient  $V_{i2}$  má reverzibilní průběh pro ohřívání i ochlazování u všech oligonukleotidů, jinak můžeme pro každý oligonukleotid pozorovat rozdílné příspěvky vyšších subspekter v závislosti na teplotě, převážně  $S_3$  a  $S_4$ .

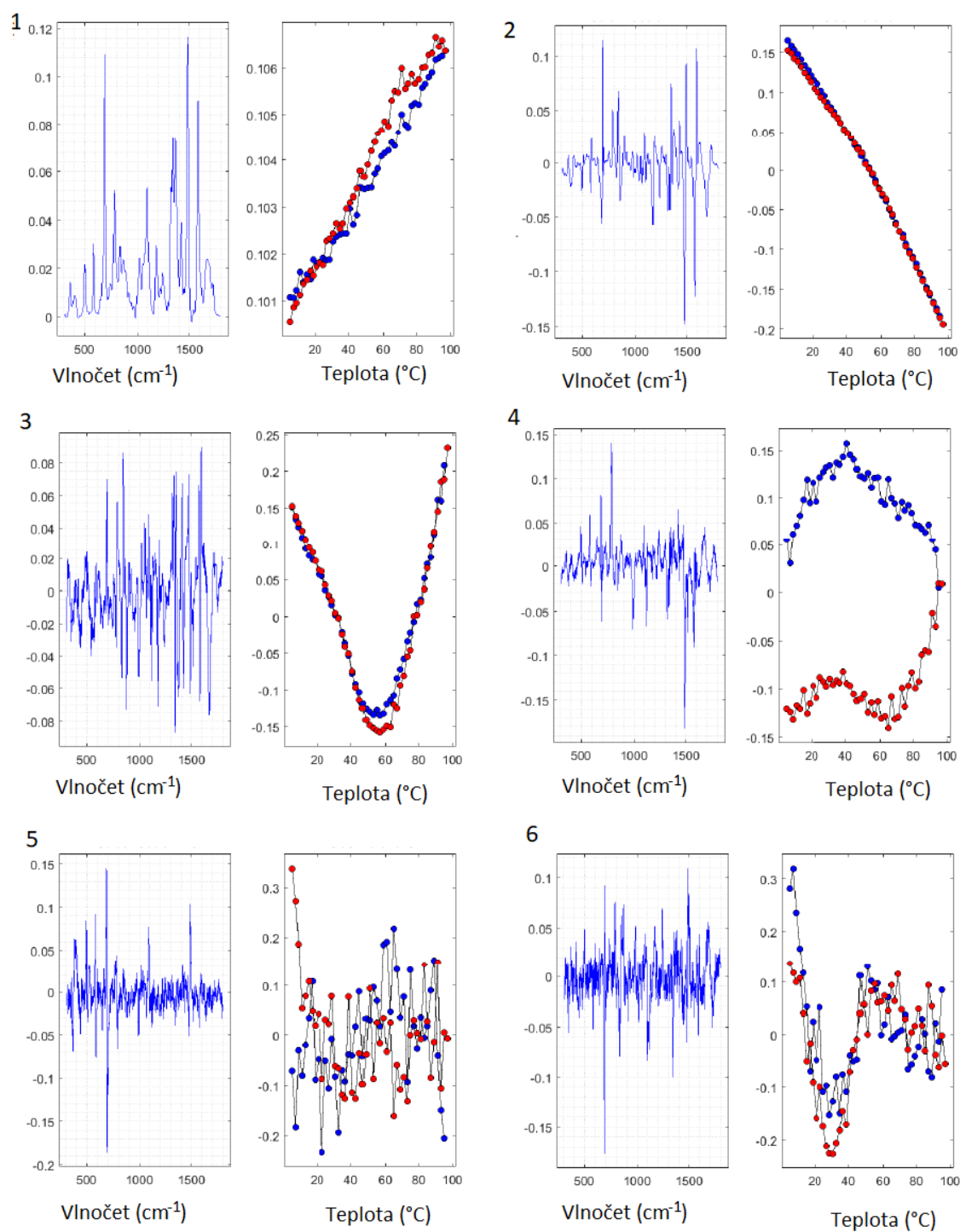
Reverzibilní průběhy koeficientů  $V_{i2}$  u subspektra  $S_2$  a odchylné průběhy koeficientů  $V_{i3}$  a/nebo  $V_{i4}$  možná naznačují, že i když se vysoké teplotě vystavený (ale v každém případě ještě nedenaturovaný) paralelní kvadruplex po ochlazení opět vrátí do původní rovnovážné konformace, v průběhu ochlazování možná prochází různými strukturními mezistavy, které možno identifikovat jen díky kombinaci Ramanovy spektroskopie a faktorové analýzy. Ověření reálného základu této hypotézy však vyžaduje opakování experimentů, aby se vyloučila možnost artefaktů.



Grafy 19: Subspektra  $S_1$  až  $S_6$  se svými teplotně závislými koeficienty  $V_{ij}$  pro A-G15. Modrá křivka v grafech pro koeficienty v závislosti na teplotě značí ohřívání, červená ochlazování.

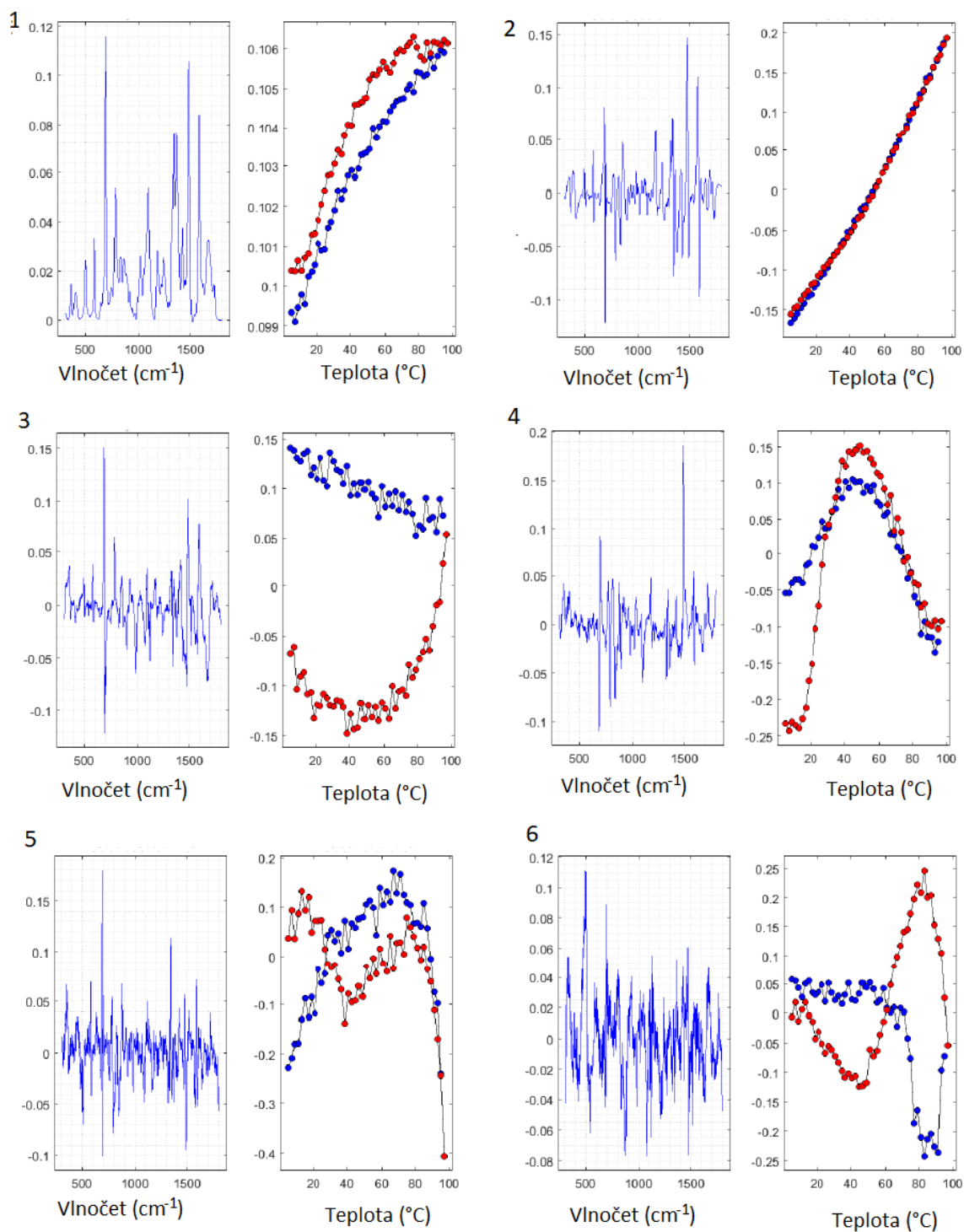


Grafy 20: Subspektra  $S_1$  až  $S_6$  se svými teplotně závislými koeficienty  $V_{ij}$  pro C-G15. Modrá křivka v grafech pro koeficienty v závislosti na teplotě značí ohřívání, červená ochlazování.

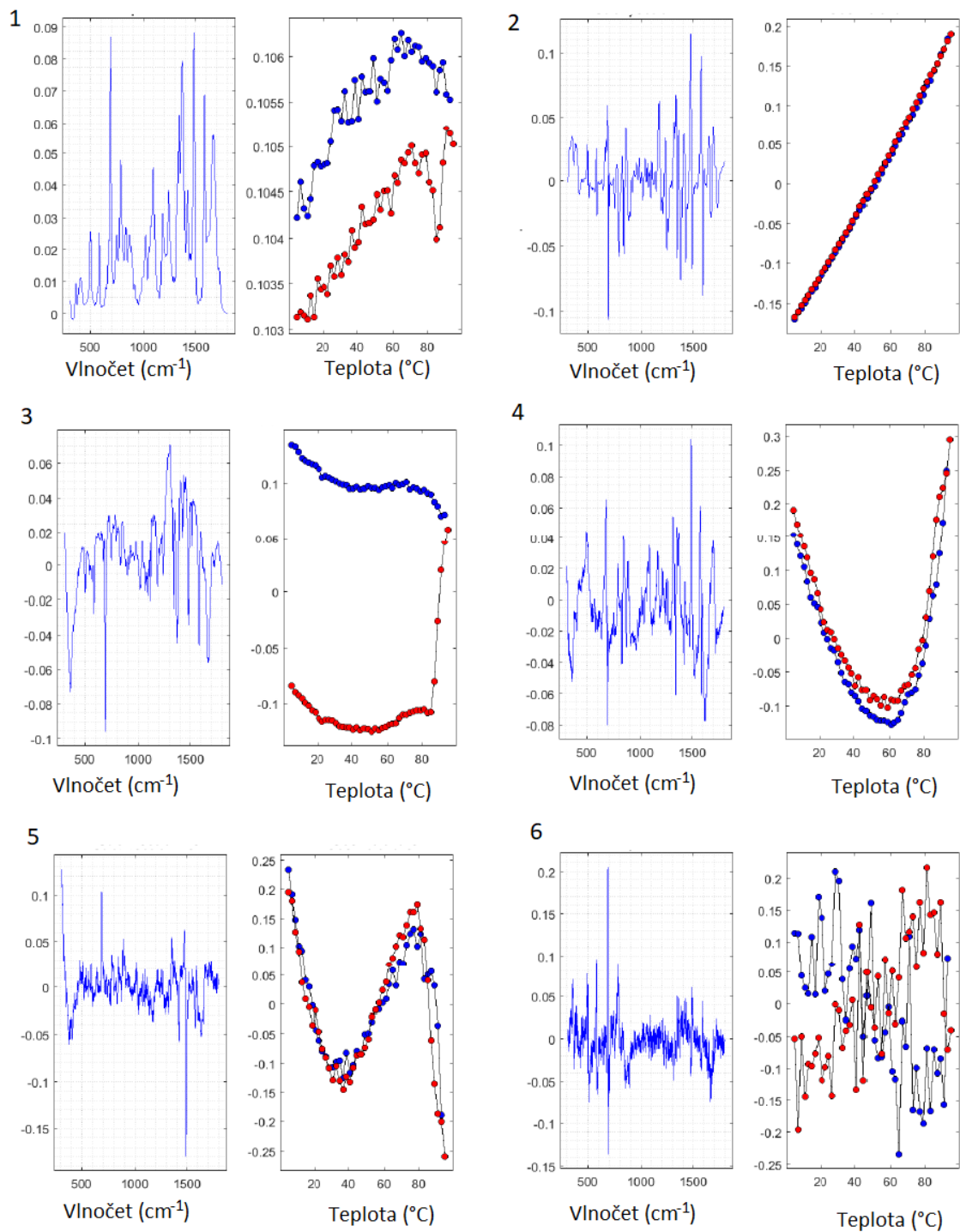


Grafy 21: Subspektra  $S_1$  až  $S_6$  se svými teplotně závislými koeficienty  $V_{ij}$  pro G-G15. Modrá křivka v grafech pro koeficienty v závislosti na teplotě značí ohřívání, červená ochlazování.





Grafy 22: Subspektra  $S_1$  až  $S_6$  se svými teplotně závislými koeficienty  $V_{ij}$  pro S-G15. Modrá křivka v grafech pro koeficienty v závislosti na teplotě značí ohřívání, červená ochlazování.



Grafy 23: Subspektra  $S_1$  až  $S_6$  se svými teplotně závislými koeficienty  $V_{ij}$  pro T-G15. Modrá křivka v grafech pro koeficienty v závislosti na teplotě značí ohřívání, červená ochlazování.

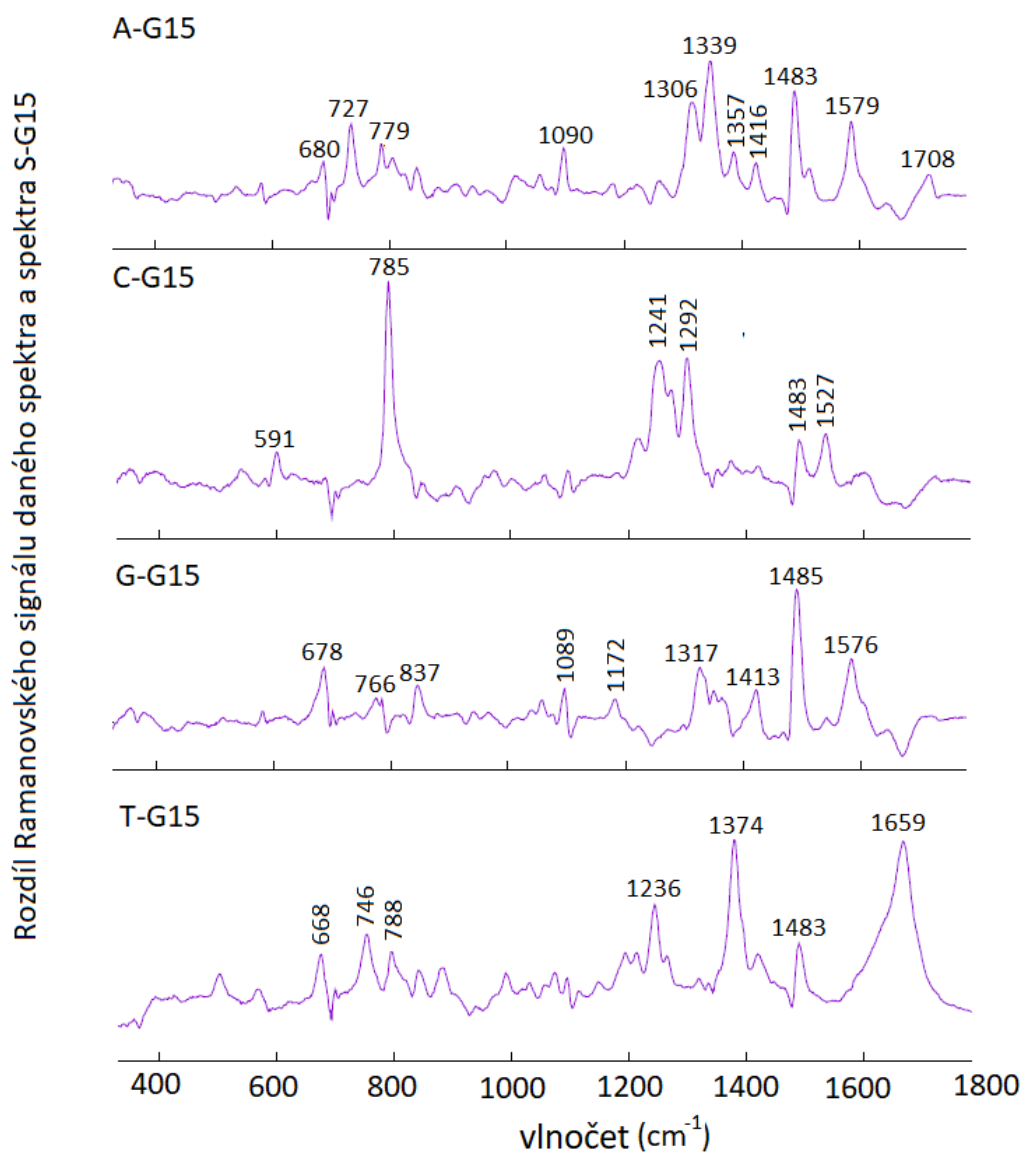
#### 5.2.4. Rozdíly spekter ostatních oligonukleotidů se spektrem S-G15

Graf 24 ukazuje spektra jednotlivých oligonukleotidů, od nichž je odečteno spektrum S-G15. Byla použita spektra naměřena při teplotě 5°C. Důvodem byla snaha identifikovat spektrální rozdíly plynoucí z přítomnosti různých bází ve smyčkách.

Porovnáním spekter (dA)<sub>15</sub>, (dG)<sub>15</sub>, (dT)<sub>15</sub> a cytidinu s těmito diferencemi jasně ukazuje, že většina rozdílů se dá snadno vysvětlit jako příspěvek nukleových bází, nadbytečných oproti abazickému S-G15. Poloha pásů se trochu liší kvůli odlišné struktuře referenčních spekter, viz tabulka 6. I z tohoto porovnání tak lze usuzovat, že všech pět oligonukleotidů zaujímá stejný typ paralelní kvadruplexové struktury.

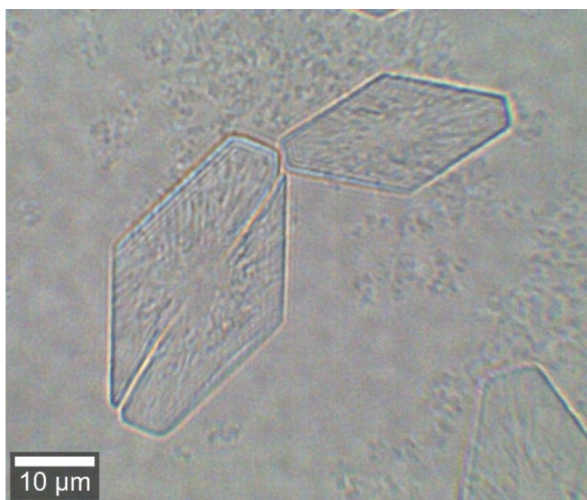
Markery bází (cm <sup>-1</sup> )	Naměřené markery (cm <sup>-1</sup> )	Markery bází (cm <sup>-1</sup> )	Naměřené markery (cm <sup>-1</sup> )	Markery bází (cm <sup>-1</sup> )	Naměřené markery (cm <sup>-1</sup> )	Markery bází (cm <sup>-1</sup> )	Naměřené markery (cm <sup>-1</sup> )
A-G15		C-G15		G-G15		T-G15	
?	680	782	785	688	678 (posunuté dolů)	498	-
730	727	1241	1241	781	Část širšího pásu	669	668
791	-	1290	1292	837	837	749	746
1093	1090	?	1483	1093	1089	786	788
1308	1306	1527	1527	1323 (3 pásy)	1317 (3 pásy - změna)	1239	1236
1345	1344			1422	1413 (posunuté dolů)	1376	1374
1380	-			1483	1485	1483	1483
1424	1421			1581	1576 (posunuté dolů)	1667	1659 (posunuté dolů)
1486	1483						
1584	1582						

Tabulka 6: Porovnání markerů bází přítomných v grafech 2 a 3 s pásy, vyskytujícími se v grafu 24.



Graf 24: Rozdíl Ramanových spekter kvadruplexů A-G15, C-G15, G-G15 a T-G15 po odečtení spektra vzorku S-G15, naměřených při teplotě  $5^{\circ}\text{C}$  a normalizovaných na pás fosfátové vibrace na  $\sim 1095 \text{ cm}^{-1}$ .

### 5.2.5. Zkoumání krystalků A-G15 na pomoci Ramanovy mikroskopie

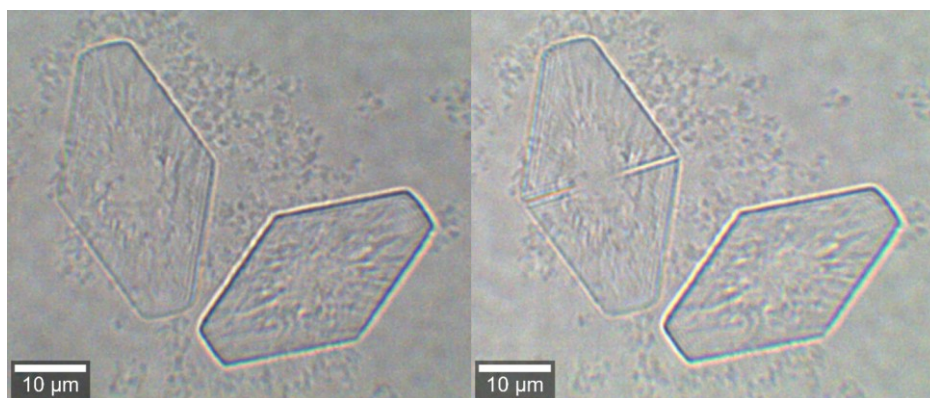


Obrázek 26: Krystalky pozorované v zásobním roztoku A-G15.

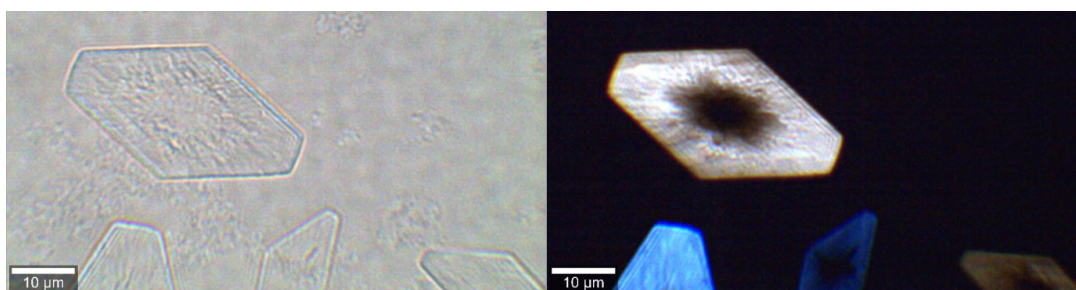
Při uchovávání zásobních roztoků oligonukleotidů v lednici (cca 5°C) se ve vzorku A-G15 během několika hodin vytvořily okem viditelné usazeniny. Koncentrace A-G15 byla přibližně 13 mM, v pufru 50 mM K<sup>+</sup>-PBS s 240 mM K<sup>+</sup>.

Při zkoumání těchto precipitátů na Ramanově mikroskopu WITec byly pozorovány pravidelné krystaly (podélný rozměr 20 – 40 μm, příčný rozměr 10 – 20 μm, tloušťka 2 – 3 μm), viz obrázek 26 a 27. Změřili jsme různé mapy a profily, pomocí kterých jsme identifikovali chemické složení krystalků a jejich tloušťku. Jednoznačně se jednalo o krystal složený z paralelních kvadruplexů A-G15. Po měření bylo v místě průchodu laserového paprsku pozorováno narušení struktury, pravděpodobně způsobené táním krystalu v daném místě (viz obrázek 27). Postupně se v průběhu měření ve středu krystalků začaly tvořit díry bez krystalické struktury, kterých zdánlivě s časem přibývalo, pravděpodobně v důsledku ohřevu vzorku na pokojovou teplotu, viz obrázky 29 a 30. Byla také pozorována optická aktivita krystalků struktury pomocí polarizačního mikroskopu; pravděpodobně se jedná o dvojlomný materiál, viz obrázek 28.

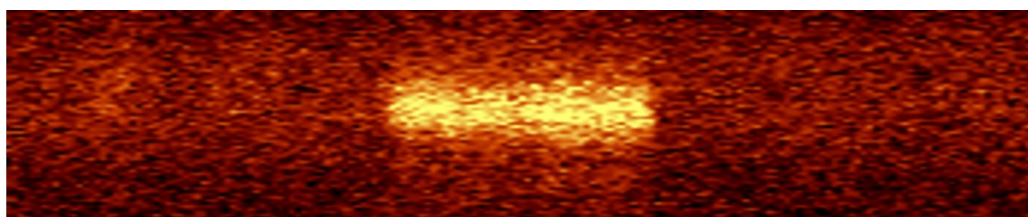
V zásobních roztocích ostatních zkoumaných oligonukleotidů se za uvedených podmínek žádná krystalická struktura neobjevila.



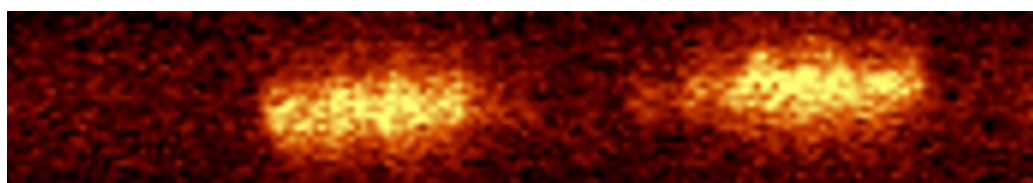
Obrázek 27: Krystal vlevo před a po měření hloubkového profilu. Je vidět rýhu, kterou zanechal fokusovaný paprsek v místě měření. Pravděpodobně jde o důsledek ohřátí a zvýšené rozpustnosti krystalu.



Obrázek 28: Krystaly A-G15 zobrazené standardně v procházejícím světle (vlevo) a mezi zkříženými polarizátory v polarizačním módu (vpravo). Krystaly jsou zjevně opticky aktivní (pravděpodobně dvojlomné – pozorovali jsme krystaly v několika různých barvách: bílé, modré, žluté). Tmavá místa uprostřed krystalů představují díry, tj. již rozpadlou krystalickou strukturu.



Obrázek 29: Hloubkový profil (axiální řez) krystalem A-G15. Tloušťka krystalu je ca 2 µm. Zobrazeno v intenzitě Ramanova pásu  $1340\text{ cm}^{-1}$ .

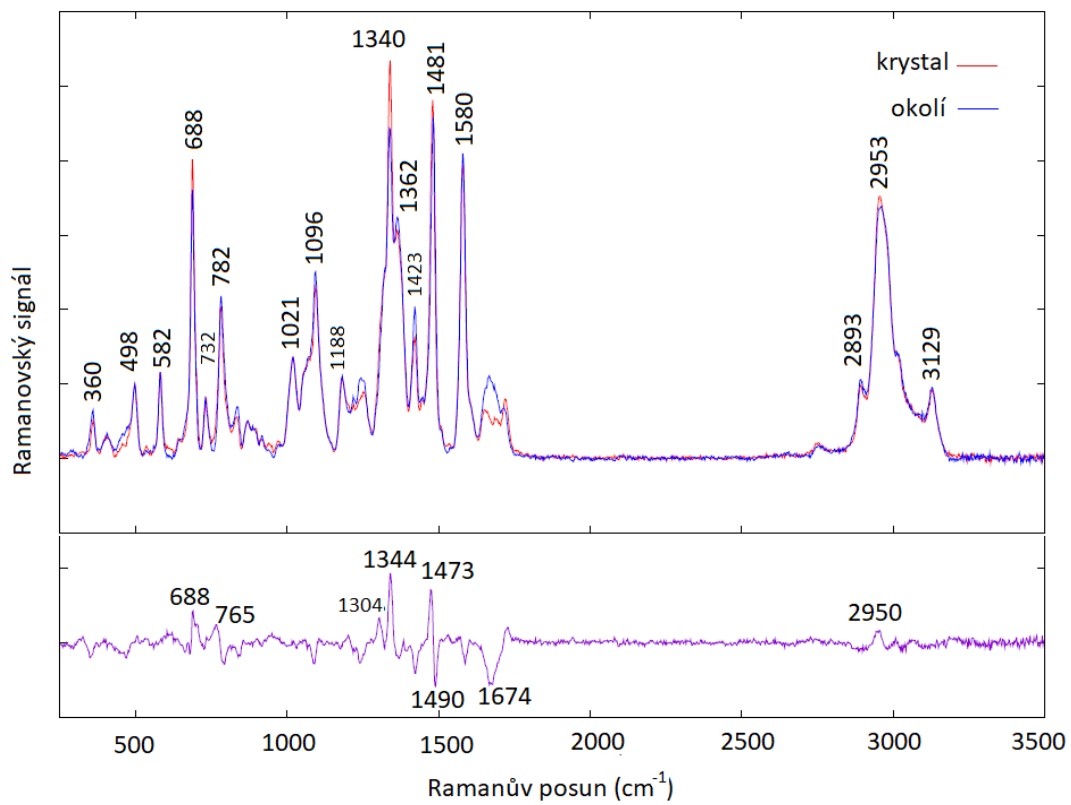


Obrázek 30: Hloubkový profil (axiální řez) jiného krystalu A-G15 v pozdější fázi měření, s viditelnou dírou uprostřed krystalu. Tloušťka krystalu je ca 2.5 µm. Zobrazeno v intenzitě Ramanova pásu  $1340\text{ cm}^{-1}$ .

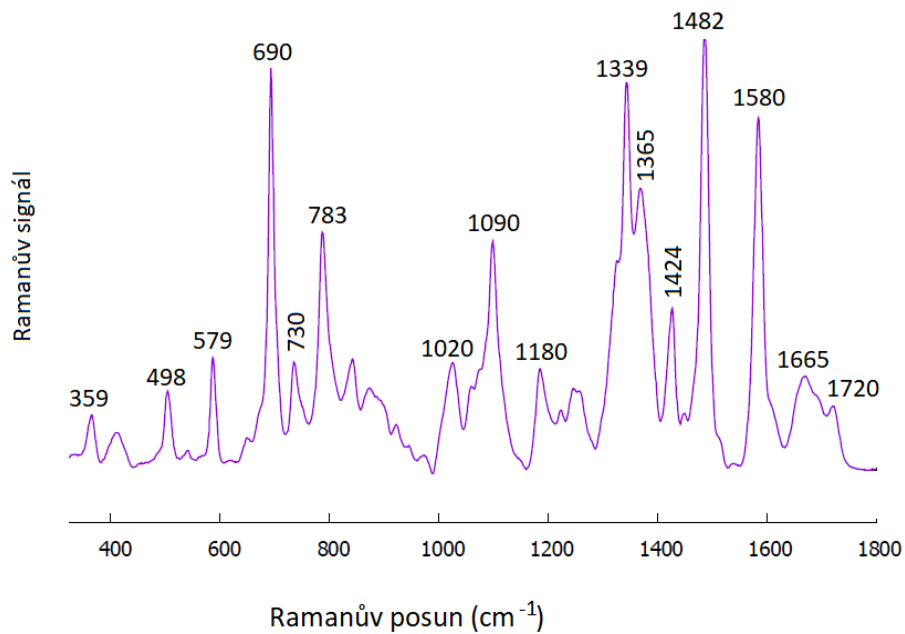
Následně byly provedeny axiální řezy krystalů a přitom naměřena Ramanova spektra hloubkového profilu. Naměřena byla i spektra okolního roztoku bez krystalické struktury; obě spektra pak byla porovnána a byla vytvořena jejich diferenční spektra, viz graf 25.

Ze spekter je patrné, že se prokazatelně jedná o krystaly kvadruplexu A-G15; viz významná podobnost s naměřeným spektrem A-G15 při 21°C v grafu 26 v rámci teplotních měření. V obou spektrech se nachází markery značící přítomnost kvadruplexu, přičemž se v obou případech jedná o strukturu paralelního kvadruplexu. Spektra krystalu a okolního roztoku jsou si velmi podobná, v některých ohledech se však přece jen trochu liší. Pro ilustraci konkrétních zvýrazněných detailů některých rozdílů viz detail grafu 25. Z porovnání diferenčních spekter s markery kvadruplexů a se spektrem adeninu (viz tabulka 7) se zdá, že pásy  $1304\text{ cm}^{-1}$  a  $1344\text{ cm}^{-1}$ , které lze poměrně dobře přiřadit dvěma vibracím adeninu, jsou v krystalické struktuře trochu intenzivnější než pro paralelní kvadruplex A-G15 v roztoku.

Další výraznější změna pásu na cca  $1481\text{ cm}^{-1}$  (malý posuv k nižším vlnočtům pro krystal) by naznačovala nárůstu markeru paralelních kvadruplexů v krystalu, stejně tak i změna intenzity pásu  $688\text{ cm}^{-1}$ . Je tak možné, že v krystalu je paralelní charakter kvadruplexu A-G15 ještě zesílen. Změny pozorované pro pás okolo  $1680\text{ cm}^{-1}$  (viz detail na obrázku 27), můžou být i důsledkem odečítání příspěvku vody v této oblasti (deformační vibrace vody na  $1640\text{ cm}^{-1}$ ).

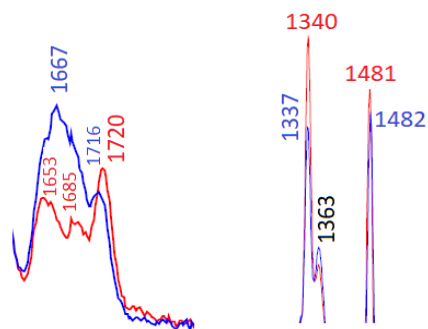


Graf 25: Ramanova spektra krystalu, okolního roztoku a jejich diference.



Graf 26. Detail charakteristické oblasti spektra roztoku A-G15 při 21°C, bez přítomných krystalků.





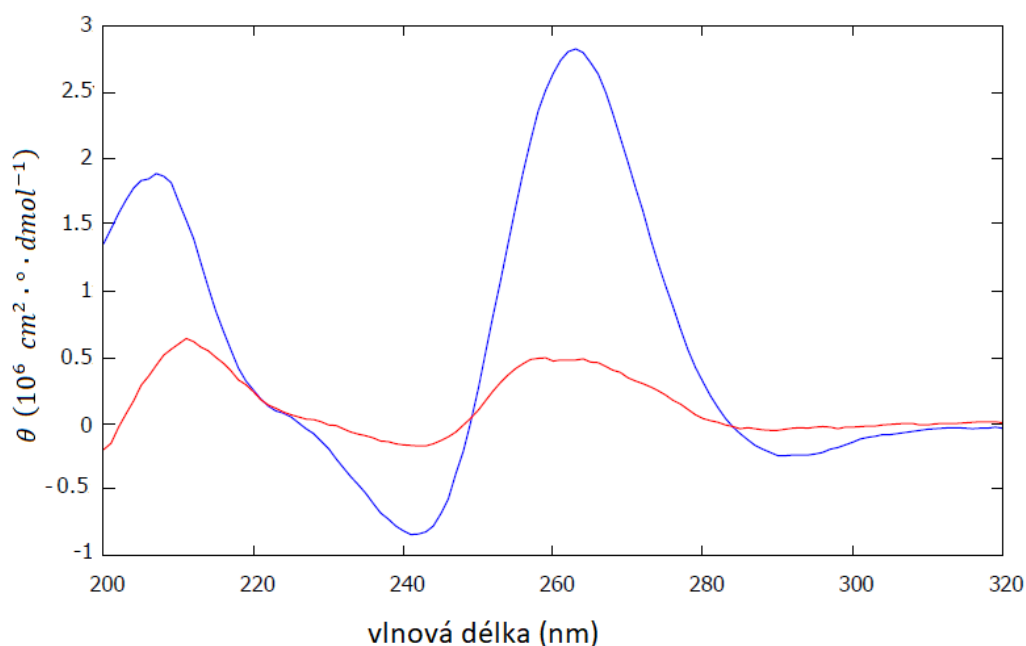
Detail grafu 25: Rozdíly spekter A-G15 v krystalu a v roztoku.

diferenční spektrum (cm <sup>-1</sup> )	(dA) <sub>15</sub> markery (cm <sup>-1</sup> )	Q-markery (cm <sup>-1</sup> )
688	-	686
765 (slabší)	-	-
1304	1308	-
1344	1345	1338 (?)
1473	-	1483
1490	-	
1674	-	-

Tabulka 7: Pásky v diferenčním spektru grafu 25 a jejich možná interpretace pomocí kvadruplexových markerů z grafu 2 a tabulky 3.

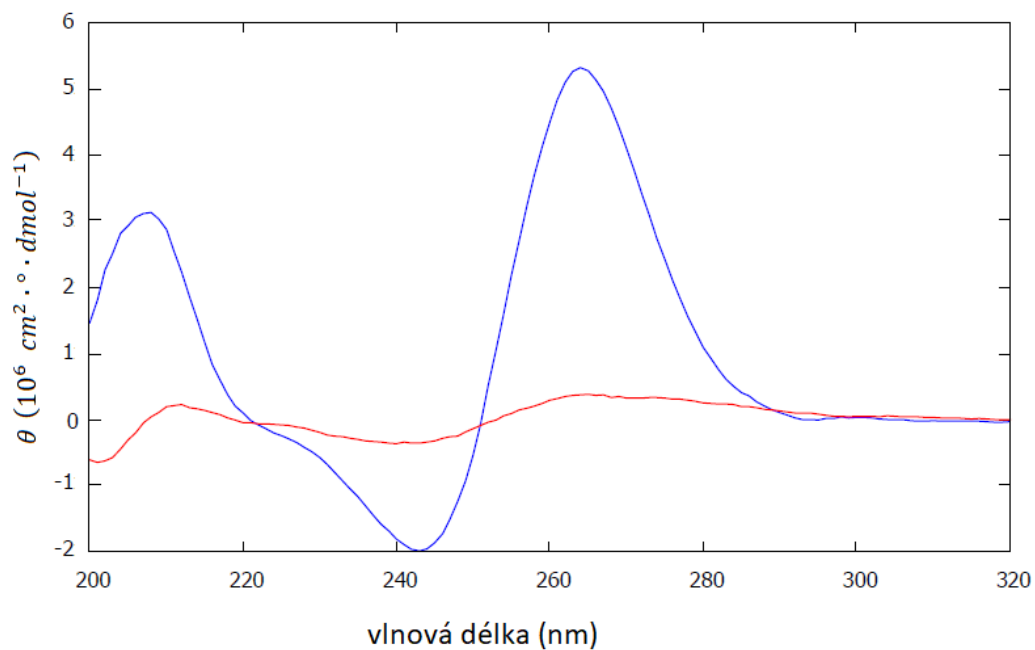
### 5.3. CD spektra

CD spektra naměřená při teplotě 20°C<sup>10</sup> vykazují pro všechny zkoumané oligonukleotidy jasné známky paralelních kvadruplexů (maxima kolem 210 nm a 264 nm a minimum kolem 240 nm), viz grafy 27 až 31. Nutno podotknout, že se jedná o CD spektra pro zředěné vzorky, jejichž koncentrace byla 4 – 7 μM, podobně jako v práci (Sengar, et al., 2014). Při zvýšení teploty na 95°C dochází k zeslabení tohoto signálu, způsobeného výrazným úbytkem kvadruplexů. Zatímco u S-G15, C-G15 a T-G15 dojde k úplnému roztátí paralelního kvadruplexu, u A-G15 a G-G15 pozorujeme i při nejvyšších teplotách ještě zbytkový CD signál, pocházející pravděpodobně z přetrvávající kvadruplexové struktury. Nejpatrnější je to v případě G-G15 (graf 29). Dle našich CD měření jsou tak právě tyto dva oligonukleotidy teplotně stabilnější než ostatní, což se zdá být v rozporu s výsledky práce (Sengar, et al., 2014), v níž se nejstabilnější zdá S-G15 a naopak A-G15 i G-G15 zdaleka tak stabilní nebyly; viz hodnoty teploty tání v tabulce 3.

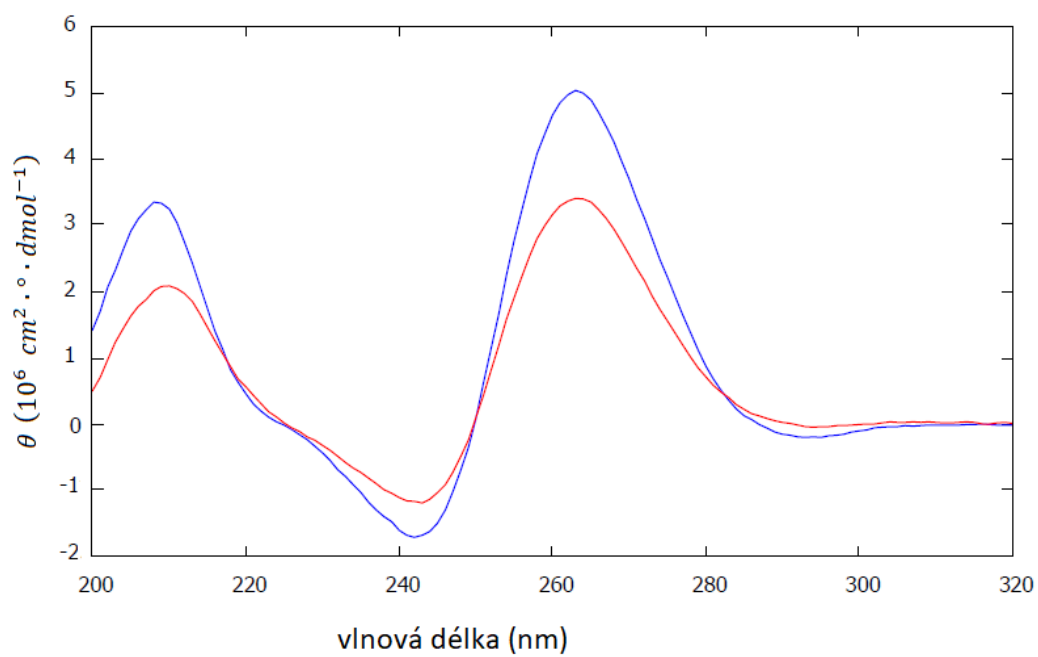


Graf 27: CD spektrum A-G15 při 20°C (modrá křivka) a 95°C (červená křivka).

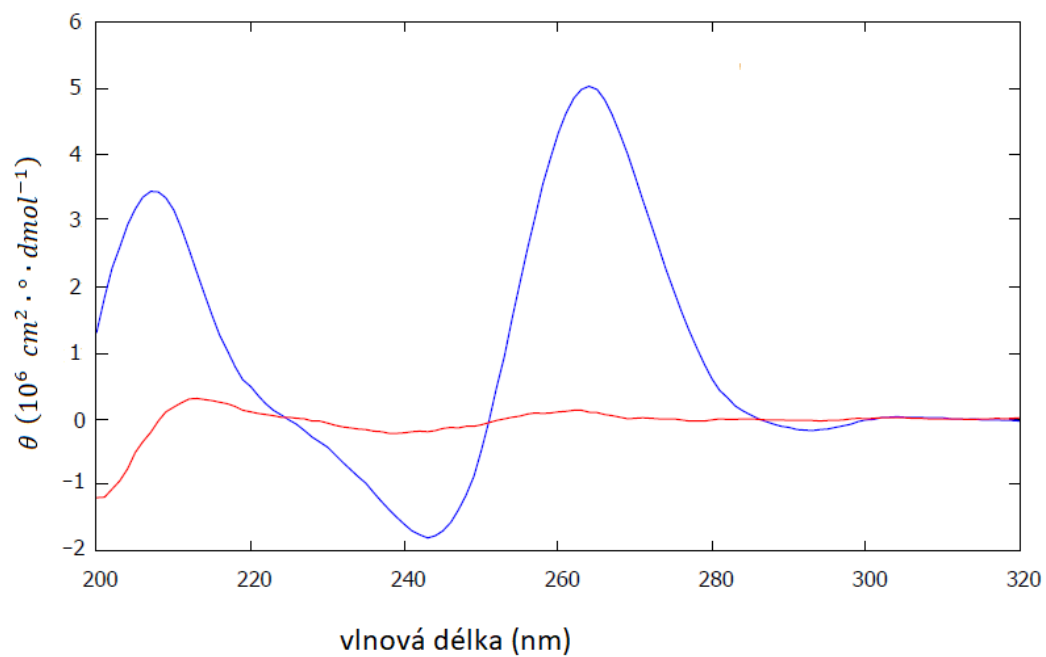
<sup>10</sup> Výsledky ukazují, že to, jestli je spektrum při 20°C naměřeno před nebo po ohřevu, nemá na průběh závislosti významnější vliv.



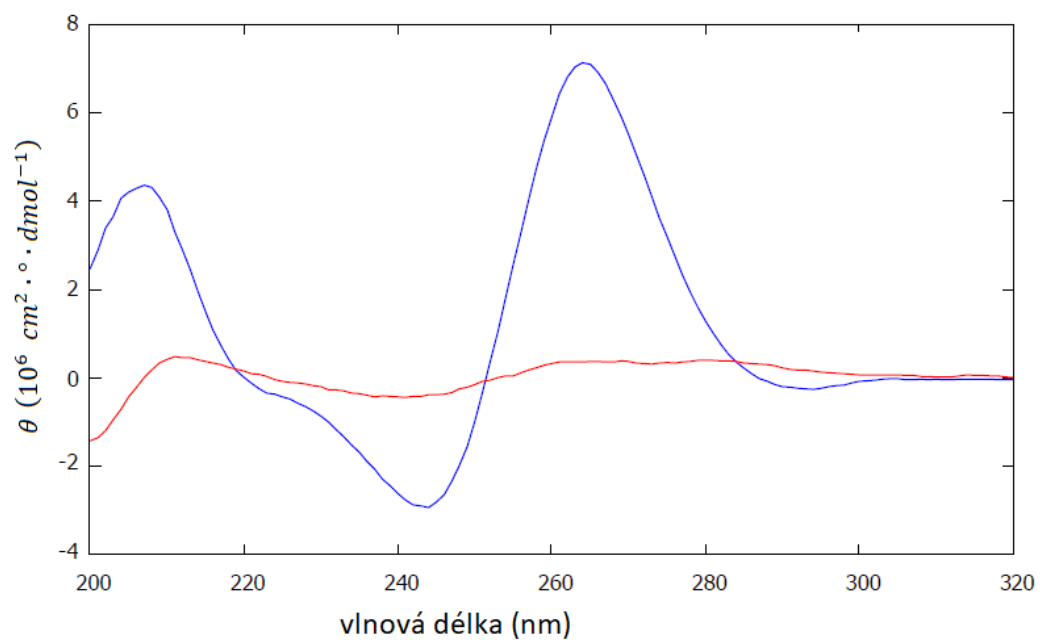
Graf 28: CD spektrum C-G15 při 20°C (modrá křivka) a 95°C (červená křivka).



Graf 29: CD spektrum G-G15 při 20°C (modrá křivka) a 95°C (červená křivka).

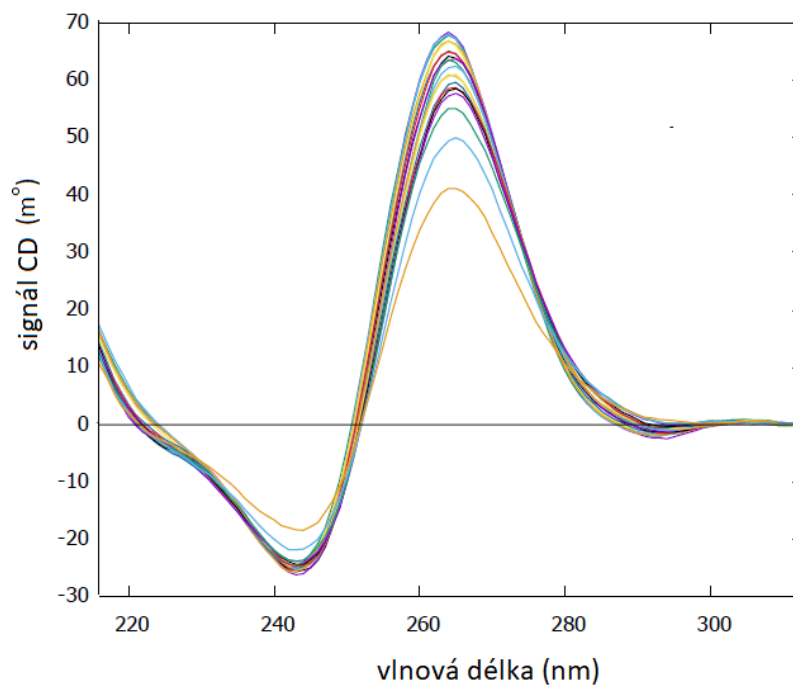


Graf 30: CD spektrum S-G15 při 20°C (modrá křivka) a 95°C (červená křivka).

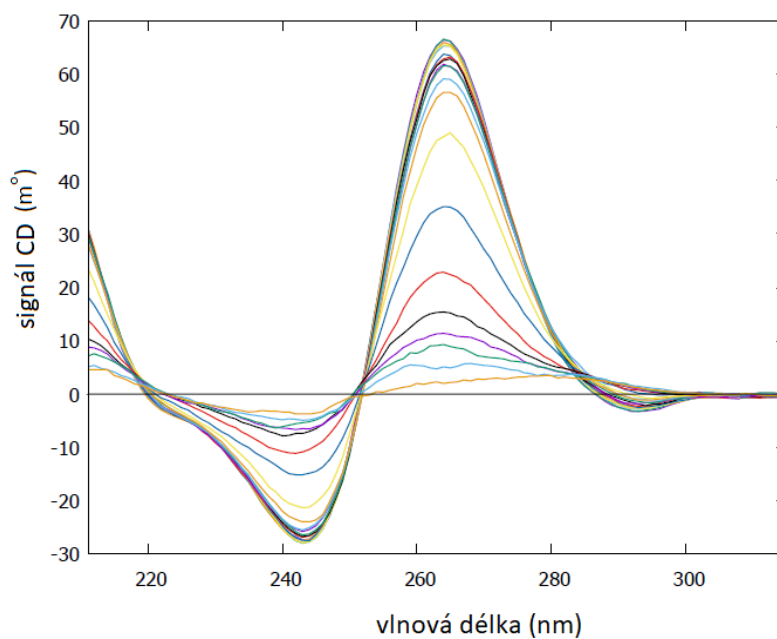


Graf 31: CD spektrum T-G15 při 20°C (modrá křivka) a 95°C (červená křivka).

V grafu 32 a 33 vidíme rozdíl mezi CD křivkami naměřenými při různých teplotách pro stejně koncentrovaný roztok T-G15 ( $4 \mu\text{M}$ ) při  $2000\times$  ředění  $\text{K}^+$ -PBS pufrem ( $240 \text{ mM K}^+$ ) a deionizovanou vodou ( $120 \mu\text{M K}^+$ ). Protože koncentrace oligonukleotidu je v obou případech stejná, vynikne účinek vysoké koncentrace  $\text{K}^+$  iontů na jeho stabilitu.

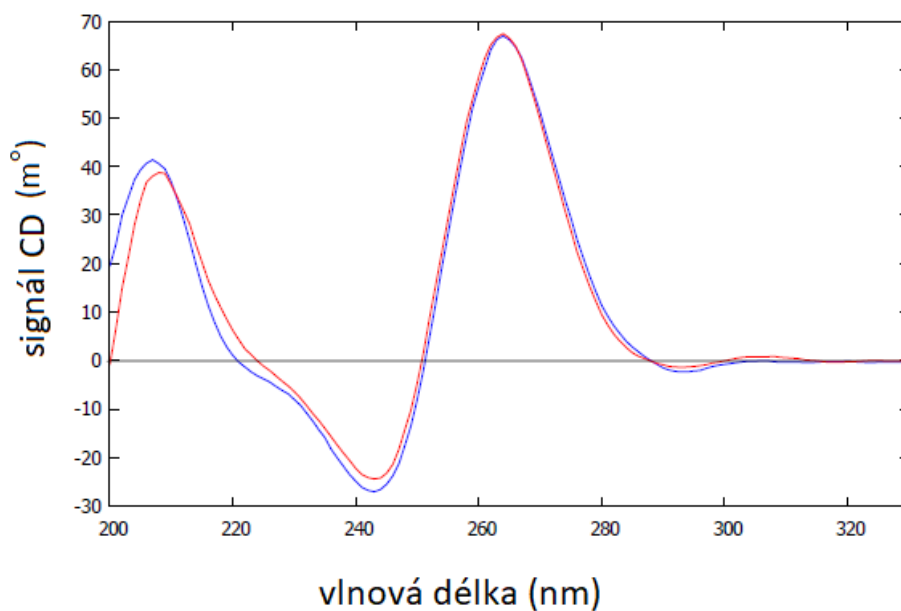


Graf 32: CD spektrum  $4 \mu\text{M}$  T-G15 pro různé teploty za přítomnosti  $240 \text{ mM K}^+$ .

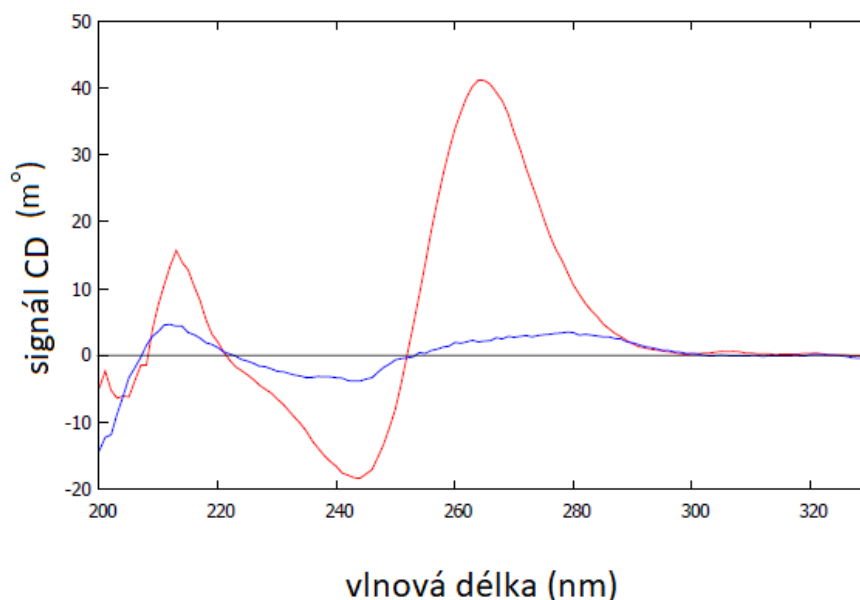


Graf 33: CD spektrum  $4 \mu\text{M}$  T-G15 pro různé teploty za přítomnosti  $120 \mu\text{M K}^+$ .

Pro přímé porovnání spekter 4  $\mu\text{M}$  T-G15 stabilizovaného různou koncentrací  $\text{K}^+$  byly vytvořené grafy 34 a 35, které ukazují rozdíl při vybrané teplotě 20°C a 95°C. Zatímco při pokojové teplotě se křivky prakticky neliší, při vysoké teplotě je rozdíl velmi významný.

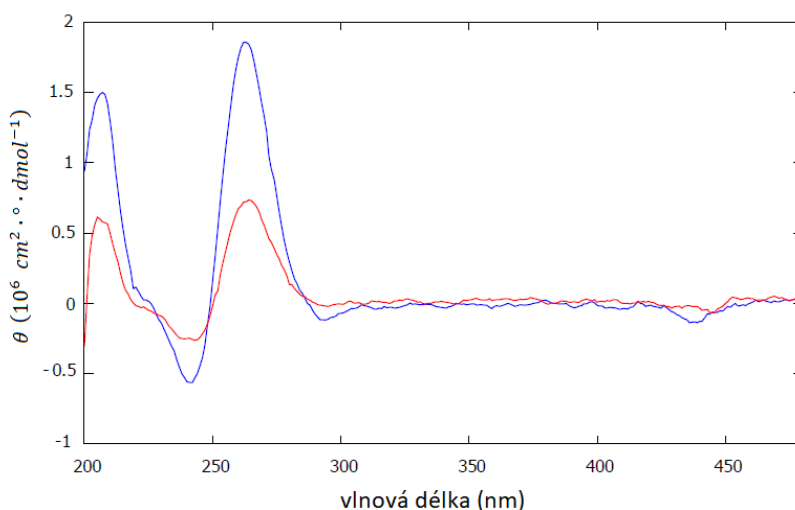


Graf 34: CD spektrum 4  $\mu\text{M}$  T-G15 za přítomnosti 120  $\mu\text{M}$   $\text{K}^+$  (značeno modře) a 240 mM  $\text{K}^+$  v pufru (značeno červeně) při 20°C.

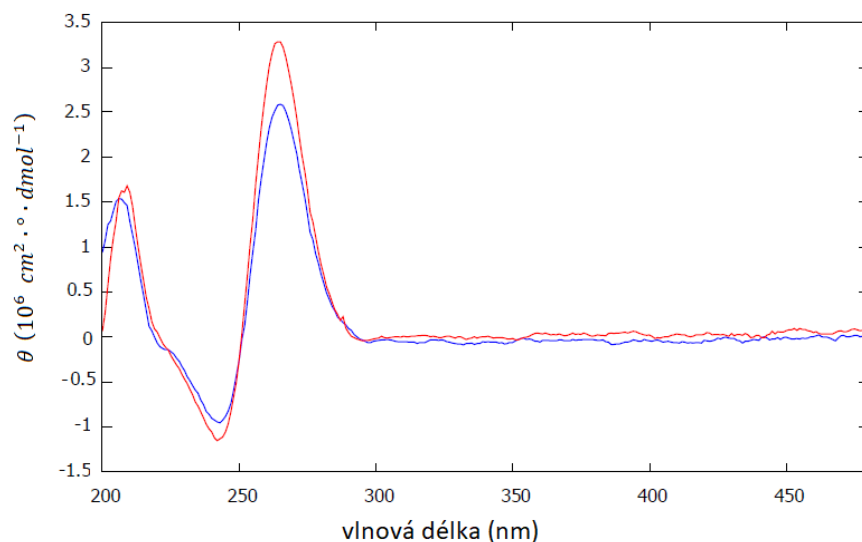


Graf 35: CD spektrum 4  $\mu\text{M}$  T-G15 za přítomnosti 120  $\mu\text{M}$   $\text{K}^+$  (značeno modře) a 240 mM  $\text{K}^+$  v pufru (značeno červeně) při 95°C.

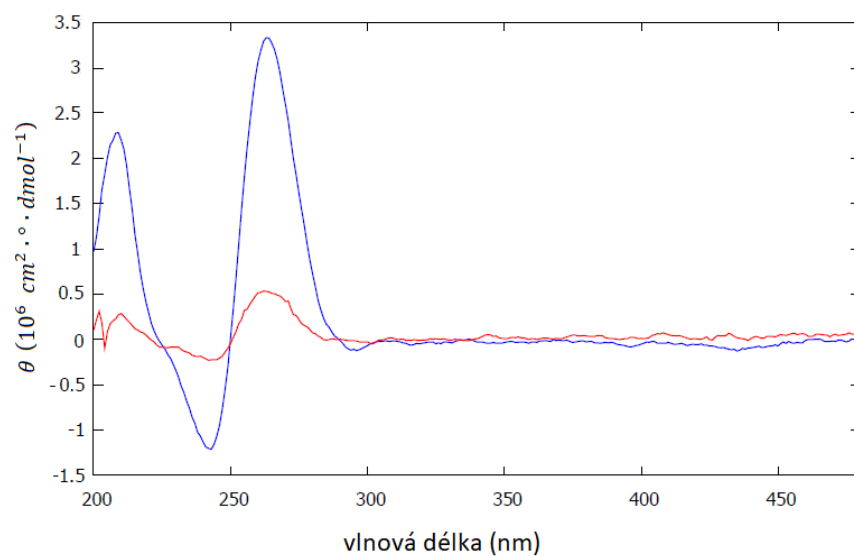
Na závěr zbyly měřeny roztoky ekvimolárních ( $3 \mu\text{M}$ ) komplexů jednotlivých oligonukleotidů s porfyrinem CuTMPyP4, a to po naředění zásobního roztoku oligonukleotidu  $\text{K}^+$ -PBS pufrém nebo deionizovanou vodou, tj. za podmínky vysoké ( $240 \text{ mM}$ ) nebo nízké ( $120 \mu\text{M}$ ) koncentrace  $\text{K}^+$ ; výsledky viz grafy 36 až 40. V případě interakce podobné interakcím CuTMPyP4 s TBA (Palacký, 2012) bychom očekávali vznik indukovaného CD signálu původně achirálního porfyriu ve viditelné části spektra. Náznak indukovaného signálu je vidět pouze ve spektru A-G15 v okolí  $440 \text{ nm}$ . I tak se však v porovnání s výsledky v práci (Palacký, 2012) jedná pouze o slabý signál. Ani A-G15 tedy nemá významnou schopnost vázat kationický porfyrin CuTMPyP4, která by byla porovnatelná s jeho interakcemi s antiparalelním kvadruplexem TBA. Rozdíly v celkové intenzitě CD signálu mezi vzorky za přítomnosti  $120 \mu\text{M K}^+$  a  $240 \text{ mM K}^+$  jsou zde pravděpodobně způsobeny rozdílnou koncentrací oligonukleotidů v měřených roztocích, vliv na vznik indukovaného signálu však tato skutečnost nemá. Je však možné, že k interakci mezi oligonukleotidy a CuTMPyP4 přesto dochází bez toho, aby byl indukován CD signál CuTMPyP4, a že se projevuje destabilizaci paralelní struktury, čehož projevem je právě pokles CD signálu. Pokus by bylo potřeba zopakovat, aby se tato hypotéza ověřila.



Graf 36: CD spektrum směsi  $3 \mu\text{M}$  A-G15 s  $3 \mu\text{M}$  porfyrinem CuTMPyP4 za přítomnosti  $120 \mu\text{M K}^+$  (značeno modře) a za přítomnosti  $240 \text{ mM K}^+$  (značeno červeně) při  $20^\circ\text{C}$ .

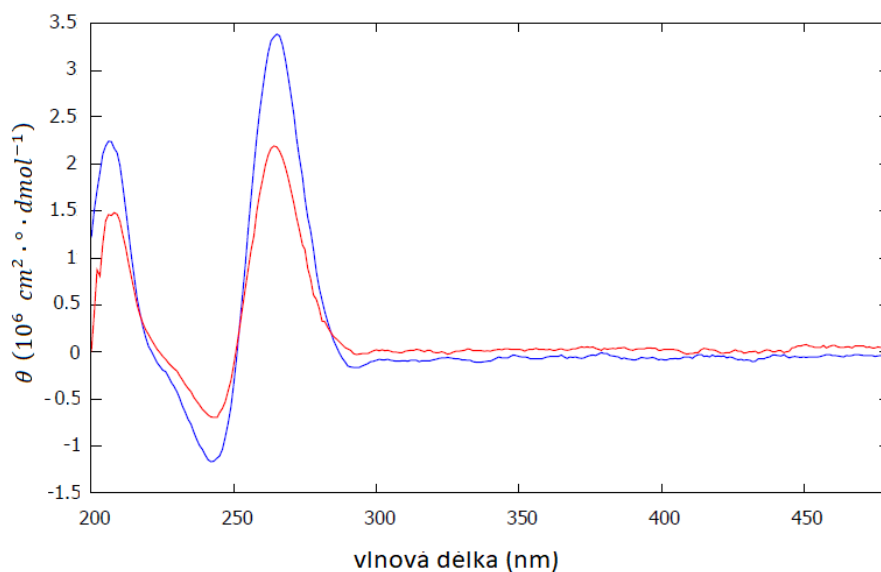


Graf 37: CD spektrum směsi 3  $\mu\text{M}$  C-G15 s 3  $\mu\text{M}$  porfyrinem CuTMPyP4 za přítomnosti 120  $\mu\text{M}$   $\text{K}^+$  (značeno modře) a za přítomnosti 240 mM  $\text{K}^+$  (značeno červeně) při 20°C.

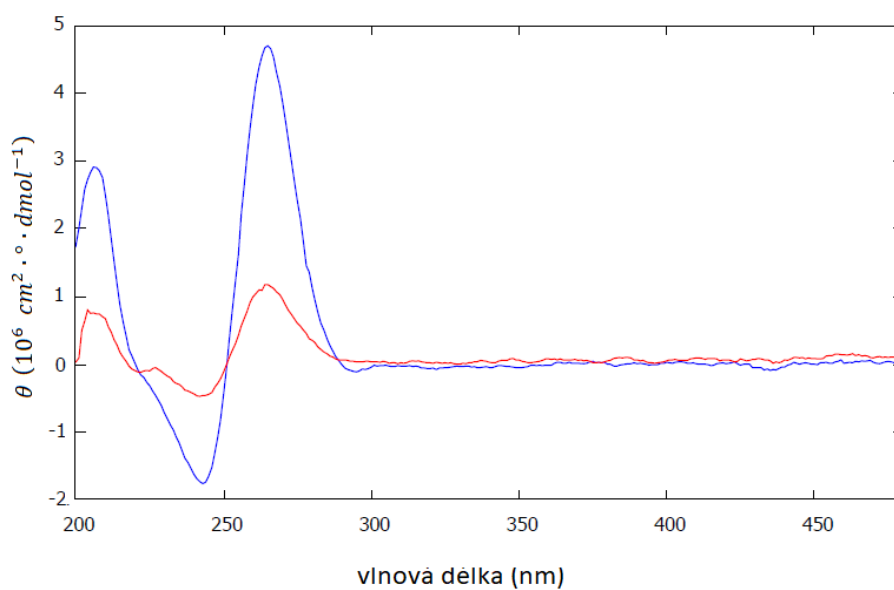


Graf 38: CD spektrum směsi 3  $\mu\text{M}$  G-G15 s 3  $\mu\text{M}$  porfyrinem CuTMPyP4 za přítomnosti 120  $\mu\text{M}$   $\text{K}^+$  (značeno modře) a za přítomnosti 240 mM  $\text{K}^+$  (značeno červeně) při 20°C.





Graf 39: CD spektrum směsi 3  $\mu\text{M}$  S-G15 s 3  $\mu\text{M}$  porfyrinem CuTMPyP4 za přítomnosti 120  $\mu\text{M}$   $\text{K}^+$  (značeno modře) a za přítomnosti 240 mM  $\text{K}^+$  (značeno červeně) při 20°C.



Graf 40: CD spektrum směsi 3  $\mu\text{M}$  T-G15 s 3  $\mu\text{M}$  porfyrinem CuTMPyP4 za přítomnosti 120  $\mu\text{M}$   $\text{K}^+$  (značeno modře) a za přítomnosti 240 mM  $\text{K}^+$  (značeno červeně) při 20°C.

## Diskuze výsledků

Všechny námi zkoumané sekvence tvořily za nízkých koncentrací oligonukleotidu ( $\mu\text{M}$ ) paralelní kvadruplex, dokonce i za velice nízké koncentrace stabilizujícího protiiontu  $\text{K}^+$   $120 \mu\text{M}$ . V tom se naše výsledky dobře shodují s výsledky publikovanými v práci (Sengar, et al., 2014). Nicméně určité rozdíly byly pozorovány. Zatímco v našich nízkokoncentračních UV a CD měřeních byly stabilnější kvadruplexy s purinovými bázemi ve smyčkách (viz grafy 27 až 31), v citované práci vycházely jako stabilnější naopak ty s pyrimidinovými bázemi, a úplně nejstabilnější kvadruplex pak tvořila sekvence s S-G15 a abazickými místy ve smyčkách. Důvodem těchto rozdílů by mohly být rozdílné použité koncentrace  $\text{K}^+$ , resp. molárního poměru mezi oligonukleotidem a  $\text{K}^+$ . V citované práci byla použita koncentrace  $\text{K}^+$  (jako KCl přidáný do pufru)  $5 \text{ mM}$ , tj. ca  $40\times$  vyšší, než zde, při srovnatelných koncentracích oligonukleotidů. Při našich měřeních v  $50 \text{ mM}$   $\text{K}^+$ -PBS s celkovým obsahem  $240 \text{ mM}$   $\text{K}^+$  již byly kvadruplexy i při  $\mu\text{M}$  koncentracích oligonukleotidu natolik stabilní, že jejich teplotu tání nebylo možno určit. Je možné, že koncentrační poměr mezi  $\text{K}^+$  a oligonukleotidem se u jednotlivých modifikací smyček projevuje různě, a vede k pozorovaným rozdílům. Pro ověření této domněnky by však bylo třeba provést další měření s více koncentracemi  $\text{K}^+$  (nebo různým poměrem  $\text{K}^+$  k oligonukleotidu) pro jednotlivé vzorky<sup>11</sup>. Jiným důvodem by mohla být přítomnost i jiných iontů nebo jiných skutečných koncentrací  $\text{K}^+$  v roztocích na rozdíl od toho, co bylo v citaci (Sengar, et al., 2014) deklarováno. V naší práci jsme ionty přítomné ve vzorku ze syntézy pečlivě vytěsnili přebytkem iontů z  $\text{K}^+$ -PBS pomocí koncentrační centrifugace. Citovaná práce uvádí jiný postup čištění vzorků, a to o opakovanou dialýzu proti  $2 \text{ mM}$  KC v  $10 \text{ mM}$  Tris-HCl pufru a pak vodě, následovanou lyofilizací.

Při vysokých koncentracích oligonukleotidů se pak ukázalo, že vzniklé kvadruplexy jsou natolik stabilní, že v Ramanových spektrech (grafy 9 až 13) lze i při teplotě  $95^\circ\text{C}$  pozorovat zřetelné markery svědčící o stabilní paralelní struktuře kvadruplexů. V průběhu ohřevu tak docházelo jen k malým změnám spojeným

---

<sup>11</sup> Napovídalo by tomu však i to, že teploty tání T-G15 je v Sengarově práci  $75,6^\circ\text{C}$ , přičemž v grafu 33 této teplotě odpovídá černá křivka, naznačující skoro roztáté kvadruplexy. V obou pracích byla přítom u tohoto oligonukleotidu užita přibližně stejná koncentrace  $4 \mu\text{M}$ .

s větší flexibilitou G-tetrád; základní uspořádání kvadruplexu v G-tetrádách však zůstalo překvapivě stabilní. Ostatní změny, které se netýkaly známých markerů kvadruplexů, pak pravděpodobně souvisely se změnami Ramanova spektra pufru, kyvety atp. Paralelní kvadruplexy tohoto typu, tj. se čtyřmi repeticemi tří guaninů a jedinou bází ve smyčce, by mohly být zajímavé z technologického hlediska, protože jejich stabilitu bylo možno ovlivňovat jak koncentrací  $K^+$  tak samotného oligonukleotidu.

Velkým překvapením bylo v naší práci zjištění samovolného vzniku pravidelných krystalů A-G15 v zásobních roztocích. Zatímco získání krystalů různých struktur nukleových kyselin je obecně obtížné a vyžaduje hledání vhodných krystalizačních podmínek, A-G15 vytvořilo krystaly rozměrů desítek mikrometrů tím nejjednodušším způsobem, jednoduchým ochlazením zásobního roztoku. Vysvětlení vzniku krystalů může dát představa adeninu ve smyčkách, mířícího vně strukturu kvadruplexu a interagujícího stohováním s adeniny sousedních kvadruplexů. Jednotlivé kvadruplexy by pak prostřednictvím adeninů ve smyčkách vytvářely plošnou strukturu. To by také mohlo vysvětlovat nepoměr mezi rozměry krystalu ve dvou směrech ( $x$  a  $y$ ) a třetím rozměrem, který je výrazně menší. Krystaly A-G15 jsou neobyčejně ploché..

Otázkou také je, proč podobné krystaly tvoří i ostatní oligonukleotidy. Podobně silnou stohovací interakci možno totiž očekávat i pro guanin ve smyčkách. Puríny obecně vykazují výraznější stohování než pyrimidiny. Kvadruplexy A-G15 a G-G15 vykazovaly i při nižších koncentracích oligonukleotidu v roztocích vyšší teplotní stabilitu, nicméně u G-G15 krystaly pozorovány nebyly. Vysvětlením by tak mohlo být spíše to, že A-G15 mělo ze všech zkoumaných vzorků nejvyšší koncentraci (13,5  $\mu$ M) a snadná tvorba krystalů by tak mohla být podmíněna právě dostatečně vysokou koncentrací. To vše snad ukáže další výzkum, který jistě bude s těmito zajímavými krystaly proveden i pomocí dalších metod.

V rámci celého měření se také jasně ukázaly výhody Ramanovy spektroskopie při měření vysoce koncentrovaných roztoků. Nejen že jsme díky ní mohli spojit přímé pozorování krystalů s tvořením map jejich složení, ale obecně je při vyšších koncentracích oligonukleotidů velmi užitečným nástrojem, zachycující i velmi jemné změny ve struktuře kvadruplexů tam, kde již mnoho jiných metod ani nelze využít. V kombinaci s faktorovou analýzou pak lze odhalit výsledky, které jsou pouhým pohledem na spektra neodhalitelné (viz sekce 5.2.3).

## Závěr

První část práce se zabývala souhrnem základních poznatků o guaninových kvadruplexech a jejich experimentálním zkoumáním, přičemž využity byly i výsledky z nedávno publikovaných článků, zabývajících se výskytem kvadruplexů v živých systémech.

Na tuto část jsme navázali vlastním měřením spektroskopickými metodami, kde jsme se zaměřili zejména na měření Ramanových spekter vzorků o vysoké koncentraci vybraných oligonukleotidů (v řádu mM), a příslušné koncentraci stabilizačních iontů. Ukázalo se, že takové vzorky vytvářejí vysoce stabilní paralelní kvadruplexy, kdy ani při 95°C nedocházelo k podstatnějšímu narušení jejich kvadruplexové struktury. Zkoumána byla také absorpční spektra a CD spektra stejných oligonukleotidů při nižších koncentracích (v řádu  $\mu\text{M}$ ), přičemž byla potvrzena tvorba paralelních kvadruplexů, v souladu s publikovanými pracemi, stejně tak větší stabilita při zvýšené koncentraci iontů. Diskutovány byly také rozdíly ve stabilitě zkoumaných vzorků při  $\mu\text{M}$  koncentracích nukleových kyselin. Zkoumané oligonukleotidy pak dle naměřených CD spekter nemají schopnost vázat porfyrin CuTMPyP4.

Dále byly pozorovány opticky aktivní krystaly tvořené oligonukleotidem A-G15, vznikající samovolně v roztoku při snížené teplotě (okolo 5°C) a koncentraci přes 10 mM. Pomocí Ramanova mikroskopu byla naměřena Ramanova spektra těchto krystalů. Pravděpodobně jde o první měření Ramanových spekter kvadruplexů v krystalické formě. Dále byly popsány některé rozdíly oproti spektrům kvadruplexu A-G15 v roztoku. Vzhledem k neobvyklé snadnosti, se kterou A-G15 vytvořil krystaly přímo z roztoku obsahujícího pouze oligonukleotid a  $\text{K}^+$ -PBS, by bylo zajímavé pokusit se o vypěstování většího krystalu vhodného pro rentgenovou strukturní analýzu.<sup>12</sup>

---

<sup>12</sup> V době psaní této práce již projevila zájem o tuto strukturu tým profesorky Michaely Vorlíčkové z Biofyzikálního ústavu v Brně.

## Seznam využitých zdrojů

### *Internetové zdroje*

*Amicon® Pro Purification System*, <http://www.merckmillipore.com/CZ/cs>  
[Přístup získán 17. 5. 2019].

*atdbio*, <https://www.atdbio.com/>  
[Přístup získán 17. 5. 2019].

Clark, J., 2019. *The Beer-Lambert Law*, <https://chem.libretexts.org>  
[Přístup získán 17. 5. 2019].

*Nucleic acid database*, <http://ndbserver.rutgers.edu/>  
[Přístup získán 17. 5. 2019].

*Protein data bank*, <https://www.rcsb.org>  
[Přístup získán 17. 5. 2019].

*Units of CD measurement*,  
<https://www.chem.uci.edu/~dmitryf/manuals/Fundamentals/CD%20practical%20guide.pdf>  
[Přístup získán 17. 5. 2019].

*Web of Science*, <https://apps.webofknowledge.com/>  
[Přístup získán 6. 7. 2019].

### *Články*

Balasubramanian, S., Hurley, L. H. & Neidle, S., 2011. Targeting G-quadruplexes in gene promoters: a novel anticancer strategy?. *NATURE REVIEWS DRUG DISCOVERY*, Svazek 10, p. 261.

Bao, H.-L. & Xu, Y., 2018. Investigation of higher-order RNA G-quadruplex structures in vitro and in living cells by F-19 NMR spectroscopy. *Nature Protocols*, Svazek 13, p. 652.

Bielskute, S., Plavec, J. & Podbevsek, P., 2019. Impact of Oxidative Lesions on the Human Telomeric G-Quadruplex. *JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY*, Svazek 141, p. 2594.

Evans, C. L. & Xie, X. S., 2008. Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy: Chemical Imaging for Biology and Medicine. *Annual Review of Analytical Chemistry*, Svazek 1, p. 883.

Largy, E. a další, 2016. Quadruplex Turncoats: Cation-Dependent Folding and Stability of Quadruplex-DNA Double Switches. *J. Am. Chem. Soc.*, Svazek 138, p. 2780.

Manna, S., Sarkar, D. & Srivatsan, S. G., 2018. A Dual-App Nucleoside Probe Provides Structural Insights into the Human Telomeric Overhang in Live Cells. *JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY*, Issue 140, p. 12622.

O'Connor, T., Johnson, C. & Scovell, W. M., 1976. RAMAN pH PROFILES FOR NUCLEIC ACID CONSTITUENTS I. CYTIDINE AND URIDINE RIBONUCLEOSIDES. *Biochimica et Biophysica Acta*, Svazek 447, p. 484.

Palacký, J., Mojzeš, P. & Bok, J., 2011. SVD-based method for intensity normalization, background correction and solvent subtraction in Raman spectroscopy exploiting the properties of water stretching vibrations. *Journal of Raman Spectroscopy*, Svazek 42, p. 1528.

Palacký, J., Vorlíčková, M., Kejnovská, I. & Mojzeš, P., 2013. Polymorphism of human telomeric quadruplex structure controlled by DNA concentration: a Raman study. *Nucleic Acids Research*, Svazek 41, p. 1005.

Sengar, A., Heddi, B. & Phan, A. T., 2014. Formation of G-Quadruplexes in Poly-G Sequences: Structure of a Propeller-Type Parallel-Stranded G-Quadruplex Formed by a G15 Stretch. *Biochemistry*, Svazek 53, p. 7718.

Zhang, S. a další, 2018. Real-time monitoring of DNA G-quadruplexes in living cells with a small-molecule fluorescent probe. *Nucleic Acids Research*, Svazek 46, p. 7522.

### **Publikace**

Palacký, J., 2012. *Biologically important non-canonical structures of nucleic acids in complexes with cationic porphyrins*. Praha: Doctoral thesis.

Saenger, W., 1984. *Principles of Nucleic Acid Structure*. New York: Springer-Verlag. ISBN: 978-1-4612-5190-3

Schrader, B. a další, 1995. *Infrared and Raman Spectroscopy*. New York: VCH. ISBN: 3-527-26446-9

Sborník Quadruplex nucleic acids (2006, ISBN: 978-1-84755-529-8), obsahující dílčí části:

Parkinson, G. N., 2006. Fundamentals of Quadruplex Structures. *Quadruplex Nucleic Acids*. Cambridge: RSC Publishing.

Riou, J.-F., Gomez, D., Morjani, H. & Trentesaux, C., 2006. Quadruplex Ligand Recognition: Biological Aspects. *Quadruplex Nucleic Acids*. Cambridge: RSC

Sborník Quadruplex nucleic acids (2013, ISBN: 978-1-84755-529-6), obsahující dílčí části:

Giancola, C. & Pagano, B., 2013. Energetics of Ligand Binding to G-Quadruplexes. *Quadruplex Nucleic Acids*. Heidelberg: Springer.

Hänsel, R., Foldynová-Trantírková, S., Dötsch, V. & Trantírek, L., 2013. Investigation of Quadruplex Structure Under Physiological Conditions Using In-Cell NMR. *Quadruplex Nucleic Acids*. Heidelberg: Springer.

Miyoshi, D., Fujimoto, T. & Sugimoto, N., 2013. Molecular Crowding and Hydration Regulating of G-Quadruplex Formation . *Quadruplex Nucleic acids*. Heidelberg: Springer.

Petraccone, L., 2013. Higher-Order Quadruplex Structures . *Quadruplex Nucleic Acids*. Heidelberg: Springer.

Randazzo, A., Spada, G. P. & da Silva, M. W., 2013. Circular Dichroism of Quadruplex Structures. V: *Quadruplex Nucleic Acids*. Heidelberg: Springer Publishing.

Tran, P. L. T. a další, 2013. Tetramolecular Quadruplex Stability and Assembly. *Quadruplex nucleic acids*. Heidelberg: Springer.

## Seznam tabulek

Tabulka 1: Vymezení torzních úhlů v nukleotidu. ....	4
Tabulka 2: Markery v Ramanových spektrech charakteristické pro přítomnost či nepřítomnost kvadruplexů v roztocích DNA. ....	32
Tabulka 3: Informace o zkoumaných oligonukleotidech. ....	34
Tabulka 4: Koncentrace zásobních roztoků určené z absorbancí naměřených při rozdílných teplotách. ....	48
Tabulka 5: Přehled markerů indikujících přítomnost nebo strukturu s kvadruplexů (paralelní / antiparalelní / žádný) v grafech 9 až 13, a shrnutí dalších spektrálních změn pozorovaných v těchto spektrech. ....	55
Tabulka 6: Porovnání markerů bází přítomných v grafech 2 a 3 s pásy, vyskytujícími se v grafu 24. ....	68
Tabulka 7: Pásky v diferenčním spektru grafu 25 a jejich možná interpretace pomocí kvadruplexových markerů z grafu 2 a tabulky 3. ....	74

## Seznam obrázků

Obrázek 1: Guaninový nukleotid.....	2
Obrázek 2: Navázání nukleotidů do vlákna nukleové kyseliny. ....	2
Obrázek 3: Nejobvyklejší báze v nukleových kyselinách.....	3
Obrázek 4: Torzní úhly v nukleotidu. ....	4
Obrázek 5: Glykosidické torzní úhly, uspořádání anti a syn. ....	4
Obrázek 6: Konformace cukru C3'-endo v ribóze a C2'-endo v deoxyribóze. ....	4
Obrázek 5: Glykosidické torzní úhly, uspořádání anti a syn.....	4
Obrázek 6: Konformace cukru C3'-endo v ribóze a C2'-endo v deoxyribóze. ....	4
Obrázek 7: Možná vazebná místa pro vodíkové můstky na guaninu. ....	6
Obrázek 8: Watsonovo-Crickovo párování bází v DNA. ....	6
Obrázek 9: Guaninová tetráda. ....	8
Obrázek 10: Struktura i-Motivu vytvořená mezi cytosiny.....	8
Obrázek 11: Možné polariry vláken v kvadruplexech. ....	9
Obrázek 12: Příklady bimolekulárních kvadruplexů s různými typy smyček a s ukázkou možných glykosidických torzních úhlů u jednotlivých guaninů.....	10
Obrázek 13: Příklady možných intramolekulárních kvadruplexů. 11	
Obrázek 14: Schematické znázornění stabilizace kvadruplexů draselnými a sodnými ionty. ....	12
Obrázek 15: Možné konformační přepínání (switch) kvadruplexů způsobené změnou typu iontů, případně jejich koncentrací v roztoku. ....	13
Obrázek 16: Proměnlivý tvar dutiny uprostřed G-kvadruplexu v závislosti na orientaci guaninů v jednotlivých tetrádách. ....	16
Obrázek 17: Ukázka telomerní sekvence DNA s převisem bohatým na guanin.....	18
Obrázek 18: Možné vyšší struktury tvořené z jednotlivých kvadruplexů na repetitivních telomerních sekvencích skrze různé interakce.....	20
Obrázek 19: Nejvýznamnější elektrické momenty přechodu v molekule guaninu, vyvolávající CD signál při uvedených vlnových délkách.....	26
Obrázek 20: „HEAD“ a „TAIL“ strana guaninu, orientace pro guanosin v anti a syn konformaci a různé orientace guaninů v základních typech kvadruplexů. ....	27
Obrázek 21: Rozdíly plynoucí ze stohování G-tetrád v orientaci guaninů H-to-T a T-to-H.....	27
Obrázek 22: Ilustrace možných přechodů mezi vibračními stavy molekuly a tím působených možnostmi rozptylů (elastický Rayleighův, neelastický Ramanův Stokesův a anti-Stokesův), resp. absorpce. ....	30
Obrázek 23: Struktura G-G15 určená z NMR měření. ....	35
Obrázek 24: Uspořádání cukr-fosfátové kostry G-G15 z NMR měření. ....	35
Obrázek 25: Porovnání struktury G-G15 a T-G15 při pohledu ze strany a svrchu. ...	35
Obrázek 26: Krystalky pozorované v zásobním roztoku A-G15. ....	70
Obrázek 27: Krystal vlevo před a po měření hloubkového profilu. ....	71
Obrázek 28: Krystaly A-G15 zobrazené standardně v procházejícím světle a mezi zkříženými polarizátory v polarizačním módu.....	71
Obrázek 29: Hloubkový profil (axiální řez) krystalem A-G15. ....	71
Obrázek 30: Hloubkový profil (axiální řez) jiného krystalu A-G15 v pozdější fázi měření, s viditelnou dírou uprostřed krystalu. ....	71



## Seznam grafů

Grafy 1: Příklady typických CD spekter pro a) paralelní kvadruplexy b) konformace 3+1 c) antiparalelní kvadruplexy. ....	28
Graf 2: Ramanova spektra oligonukleotidů s 15 stejnými bázemi (odshora T, A, G) v pufru K <sup>+</sup> -PBS. ....	33
Graf 3: Spektrum cytidinu při mírně kyselém pH. ....	33
Graf 4: Absorpční spektra vzorku A-G15 pro teploty 20°C, 95°C a jejich rozdíl. ....	45
Graf 5: Absorpční spektra vzorku C-G15 pro teploty 20°C, 95°C a jejich rozdíl. ....	46
Graf 6: Absorpční spektra vzorku G-G15 pro teploty 20°C, 95°C a jejich rozdíl. ....	46
Graf 7: Absorpční spektra vzorku S-G15 pro teploty 20°C, 95°C a jejich rozdíl. ....	47
Graf 8: Absorpční spektra vzorku T-G15 pro teploty 20°C, 95°C a jejich rozdíl. ....	47
Graf 9: Změna Ramanových spekter A-G15 s rostoucí teplotou. ....	50
Graf 10: Změna Ramanových spekter C-G15 s rostoucí teplotou. ....	51
Graf 11: Změna Ramanových spekter G-G15 s rostoucí teplotou. ....	52
Graf 12: Změna Ramanových spekter S-G15 s rostoucí teplotou. ....	53
Graf 13: Změna Ramanových spekter T-G15 s rostoucí teplotou. ....	54
Graf 14: Rozdíl Ramanových spekter pro různé teploty, naměřených při zahřívání a následném ochlazování vzorku A-G15. ....	57
Graf 15: Rozdíl Ramanových spekter pro různé teploty, naměřených při zahřívání a následném ochlazování vzorku C-G15. ....	58
Graf 16: Rozdíl Ramanových spekter pro různé teploty, naměřených při zahřívání a následném ochlazování vzorku G-G15. ....	59
Graf 17: Rozdíl Ramanových spekter pro různé teploty, naměřených při zahřívání a následném ochlazování vzorku S-G15. ....	60
Graf 18: Rozdíl Ramanových spekter pro různé teploty, naměřených při zahřívání a následném ochlazování vzorku T-G15. ....	61
Grafy 19: Subspektra $S_7$ - $S_6$ se svými teplotně závislými koeficienty $V_{ij}$ pro A-G15. ....	63
Grafy 20: Subspektra $S_7$ - $S_6$ se svými teplotně závislými koeficienty $V_{ij}$ pro C-G15. ....	64
Grafy 21: Subspektra $S_7$ - $S_6$ se svými teplotně závislými koeficienty $V_{ij}$ pro G-G15. ....	65
Grafy 22: Subspektra $S_7$ - $S_6$ se svými teplotně závislými koeficienty $V_{ij}$ pro S-G15. ....	66
Grafy 23: Subspektra $S_7$ - $S_6$ se svými teplotně závislými koeficienty $V_{ij}$ pro T-G15. ....	67
Graf 24: Rozdíl Ramanových spekter kvadruplexů A-G15, C-G15, G-G15 a T-G-15 po odečtení spektra vzorku S-G15. ....	69
Graf 25: Ramanova spektra krystalu, okolního roztoku a jejich difference. ....	73
Detail grafu 25: Rozdíly spekter A-G15 v krystalu a v roztoku. ....	74
Graf 26: Detail charakteristické oblasti spektra roztoku A-G15 při 21°C, bez přítomných krystalků. ....	73
Graf 27: CD spektrum A-G15 při 20°C a 95°C. ....	75
Graf 28: CD spektrum C-G15 při 20°C a 95°C. ....	76
Graf 29: CD spektrum G-G15 při 20°C a 95°C. ....	76
Graf 30: CD spektrum S-G15 při 20°C a 95°C. ....	77
Graf 31: CD spektrum T-G15 při 20°C a 95°C. ....	77
Graf 32: CD spektrum 4 μM T-G15 pro různé teploty za přítomnosti 240 mM K <sup>+</sup> . ....	78
Graf 33: CD spektrum 4 μM T-G15 pro různé teploty za přítomnosti 120 μM K <sup>+</sup> . ....	78
Graf 34: CD spektrum 4 μM T-G15 za přítomnosti 120 μM K <sup>+</sup> a 240 mM K <sup>+</sup> v pufru při 20°C. ....	79
Graf 35: CD spektrum 4 μM T-G15 za přítomnosti 120 μM K <sup>+</sup> a 240 mM K <sup>+</sup> v pufru při 95°C. ....	79

Graf 36: CD spektrum směsi 3 $\mu\text{M}$ A-G15 s 3 $\mu\text{M}$ porfyrinem CuTMPyP4 za přítomnosti 120 $\mu\text{M}$ $\text{K}^+$ a za přítomnosti 240 mM $\text{K}^+$ při 20°C.....	80
Graf 37: CD spektrum směsi 3 $\mu\text{M}$ C-G15 s 3 $\mu\text{M}$ porfyrinem CuTMPyP4 za přítomnosti 120 $\mu\text{M}$ $\text{K}^+$ a za přítomnosti 240 mM $\text{K}^+$ při 20°C.....	81
Graf 38: CD spektrum směsi 3 $\mu\text{M}$ G-G15 s 3 $\mu\text{M}$ porfyrinem CuTMPyP4 za přítomnosti 120 $\mu\text{M}$ $\text{K}^+$ a za přítomnosti 240 mM $\text{K}^+$ při 20°C.....	81
Graf 39: CD spektrum směsi 3 $\mu\text{M}$ S-G15 s 3 $\mu\text{M}$ porfyrinem CuTMPyP4 za přítomnosti 120 $\mu\text{M}$ $\text{K}^+$ a za přítomnosti 240 mM $\text{K}^+$ při 20°C.....	82
Graf 40: CD spektrum směsi 3 $\mu\text{M}$ T-G15 s 3 $\mu\text{M}$ porfyrinem CuTMPyP4 za přítomnosti 120 $\mu\text{M}$ $\text{K}^+$ a za přítomnosti 240 mM $\text{K}^+$ při 20°C.....	82

## Seznam použitých zkratk

### **Zkratky nukleových bází**

A-adenin, C-cytosin, G-guanin, S-abazický nukleotid, T- thymin

Příklad: G-Kvadruplexy, G-tetrády (G značí guaninové)

### **Značení atomů v molekule**

např. C5' (značí atom uhlíku, očíslovaný jako pátý)

### **Vybrané nezminěné značení fyzikálních veličin**

pK<sub>a</sub> ... disociační konstanta

pH ... potenciál vodíku

### **Zkoumané vzorky**

značení	odpovídající sekvence
A-G15	TTGGGAGGGAGGGAGGGT
C-G15	TTGGGCGGGCGGGCGGGT
G-G15	TTGGGGGGGGGGGGGGT
S-G15	TTGGGSGGGSGGGSGGGT
T-G15	TTGGGTGGGTGGGTGGGT

### **Další zkratky vyskytující se v práci**

AP-Q ... antiparalelní kvadruplex

CCD ... *charge-coupled device*

CD ... cirkulární dichroismus

CuTMPyP4 ... *copper(II) meso-tetra(N-methyl-4-pyridyl)porphyrin*

DNA ... deoxyribonukleová kyselina

H-to-H ... HEAD to HEAD

H-to-T ... HEAD to TAIL

HPLC ... *high performance liquid chromatography*

NA (apertura – optika) ... numerická apertura

Nd:YVO<sub>4</sub> ... *Neodymium-doped yttrium orthovanadate*

NMWL ... *nominal molecular weight limit*

NMR ... nukleární magnetická rezonance

RTG ... rentgenový

P-Q ... paralelní kvadruplex

PAGE ... *polyacrylamide gel electrophoresis*

PBS ... *phosphate buffered saline*

RNA ... ribonukleová kyselina

ROS ... *reactive oxygen species*

SVD ... *single value decomposition*

t-RNA ... transferová RNA

T-to-T ... TAIL to TAIL

TAS DNA ... *telomere associated sequences*

TBA ... *thrombin binding aptamer*

UV-vis ... *ultraviolet - visible*