

УДК 577.113

О.В. Рогова, В.С. Волюнкин, К.А. Рыбакова, В.И. Пахомов

Севастопольский национальный технический университет

Студгородок, г. Севастополь, Украина, 99053

E-mail: veselkov @sevgtu.sebastopol.ua

¹Н-ЯМР АНАЛИЗ САМОАССОЦИИ САМОКОМПЛЕМЕНТАРНОГО ДЕЗОКСИГЕКСАНУКЛЕОТИДА

5'-d(GpCpApTpGpC) В ВОДНОМ РАСТВОРЕ

Исследована самоассоциация самокомплементарного дезоксигексануклеотида 5'-d(GCATGC) в водно-солевом растворе методом 1М- и 2М-¹Н ЯМР спектроскопии (500 МГц). Анализ экспериментальных данных позволяет заключить, что в области низких концентраций при сравнительно невысоких температурах водного раствора одноцепочечная последовательность гексамера d(GCATGC) образует компактную (шпилькоподобную) структуру в водном растворе. Предложена возможная пространственная структура шпильки исследованного дезоксигексануклеотида.

Исследования методом одно- и двумерной ¹Н-ЯМР-спектроскопии самоассоциации в водном растворе самокомплементарных и несамкомплементарных дезокситетра- и дезокигексануклеотидов различной последовательности оснований в цепи показали [1-3], что уже на коротких олигонуклеотидах можно проследить основные характерные свойства вторичных структур ДНК, их структурные особенности и определить термодинамические параметры при формировании и стабилизации двухспиральных последовательностей. Относительное содержание GC- и AT-пар оснований в нуклеотидной цепи оказывает существенное влияние на стабильность олигомеров ДНК и энергетику их самоассоциации [3,4], при этом необходимо учитывать, что значительный вклад (~40%) в энтальпию образования дуплекса вносят внутримолекулярные взаимодействия в отдельных нитях ДНК [5]. Следует отметить, что прямой перенос термодинамических характеристик образования дуплексных структур в коротких олигонуклеотидных последовательностях на полимерную ДНК не всегда возможен из-за существенного влияния раскрытия терминальных пар оснований на особенности поведения внутренних нуклеотидов в двойной спирали [3-6]. Одним из путей решения этой проблемы является установление корреляций термодинамических и структурных параметров вторичной структуры в зависимости от длины олигонуклеотида и последовательности оснований в цепи. При этом необходимо иметь в виду, что при определенных условиях динамическое равновесие в растворе олигонуклеотидов может быть более сложным и не отвечающим в полной мере модели двух состояний "мономер-дуплекс". Это прежде всего связано с возможностью образо-

вания в растворе неканонических вторичных структур, например, шпильчатых [7].

В настоящей работе исследована методом 1М- и 2М-¹Н-ЯМР-спектроскопии (500 МГц) самоассоциация в водно-солевом растворе самокомплементарного дезоксигексануклеотида 5'-d(GCATGC). Ранее [3] в аналогичных условиях было исследовано поведение дезоксигексануклеотида d(CGТАСG), имеющего инвертированную нуклеотидную последовательность по отношению к данному гексамеру. Сравнительный анализ равновесного поведения изомерных фрагментов ДНК позволяет глубже понять влияние последовательности оснований на особенности формирования олигонуклеотидных дуплексов в растворе [3,4].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дезоксигексануклеотид 5'-d(GpCpApTpGpC), синтезированный компанией "Oswel DNA Service" (Великобритания), лиофилизовали из 99,95% D₂O и растворяли в 0,1 М фосфатном буфере, рD 7.1, содержащем 10⁻⁴ моль/л ЭДТА. 1М- и 2М-ЯМР (2М-TOCSY, 2М-NOESY/ROESY) измерения выполнены на спектрометре "Bruker DRX" (500 МГц). Методики приготовления растворов и проведения ЯМР-эксперимента описаны ранее [8]. Протонные химические сдвиги измеряли относительно внутреннего стандарта ТМА (бромид тетраметиламмония). Температура образцов регулировалась с помощью терморегулятора BVT-3000.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Процедура отождествления ¹Н-ЯМР сигналов протонов олигонуклеотидов по данным двумерных корреляционных спектров 2М-TOCSY и 2М-NOESY в основном соответствовала известной методике. Анализ двумерных 2М-NOESY спектров водного раствора d(GCATGC) позволяет сделать вывод, что наиболее вероятной конформацией дуплекса гексамера в данных условиях растворителя является двойная спираль В-типа. Следует отметить, что подобный вывод был сделан и относительно исследованных ранее гексамеров с другими нуклеотидными последовательностями – d(CGCGCG), d(CGТАСG) и d(TACGTA) [3,6]. В таблице 1 представлены полученные значения химических сдвигов для всех необменивающихся протонов исследуемого дезоксигексануклеотида 5'-d(GCATGC), которые находятся в хорошем согласии с резонансными сигналами протонов гексамера, определенными ранее в близких экспериментальных условиях [9].

На рисунке 1,а представлены концентрационные зависимости химических сдвигов необменивающихся протонов дезоксигексануклеотида d(GCATGC), измеренные при температурах 298 К и 308 К. Там же для сравнения приведены кривые титрования для аналогичных протонов оснований

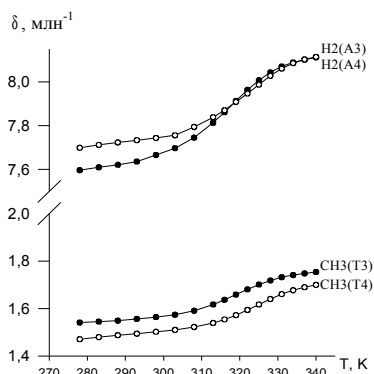
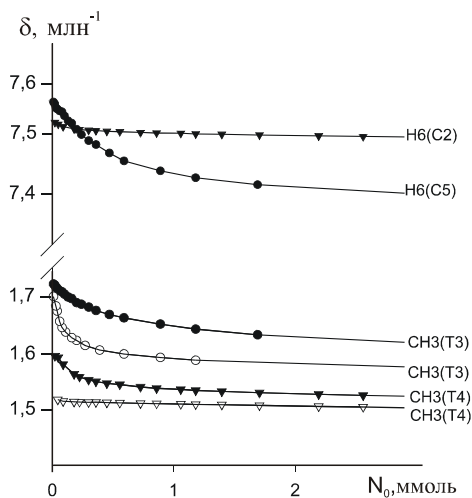


Рисунок 1 – Зависимости протонных химических сдвигов изомерных дезоксигексануклеотидов в 0,1 М фосфатном буфере:

- от концентрации гексамера d(GCATGC) ((∇) – при температуре 298 К и ($\blacktriangledown$) – при 308 К) и гексамера d(CGTACG) (($\circ$) – при температуре 303 К и ($\bullet$) – при 313 К);
- от температуры раствора: ($\circ$) – для d(GCATGC) при $N_0 = 3,07$ мМ и ($\bullet$) – для гексамера d(CGTACG) при $N_0 = 2,95$ мМ

в изомерном дезоксигексануклеотиде d(CGTACG) при температурах 303 и 313 К [3]. Обращают на себя внимание очень небольшие изменения химических сдвигов протонов d(GCATGC) в исследованном диапазоне концентраций (0,02 - 3,1 мМ) по сравнению с кривыми титрования для изученного ранее гексамера d(CGTACG) в аналогичных условиях растворителя [3]. При этом наблюдаются качественно различный ход в области малых концентраций при изменении температуры кривых титрования изомерных последовательностей: в частности, при повышении температуры раствора для протонов $\text{CH}_3(\text{T4})$ гексамера d(CGTACG) имеет место более выраженная зависимость химического сдвига от концентрации $\delta(N_0)$, а для аналогичных протонов $\text{CH}_3(\text{T3})$ изомерного дезоксигексануклеотида d(GCATGC) наблюдается обратная картина – этот эффект проявляется при понижении температуры (рисунок 1,а). Аналогичная картина имеет место и для других необменивающихся протонов изомерных дезоксигексануклеотидов.

Таблица 1 – Отнесение резонансных сигналов (δ , м.д.) необменивающихся протонов гексамера 5'-d(GpCpApTpGpC) в 0,1 М Na-фосфатном буфере, рD 7.1, $N_0 = 3,07$ mM при $T = 298$ K

Протон	H8	H2	H6	H5/CH ₃	H1'	H2'	H2''	H3'	H4'	H5'	H5''
G ₁	7,97	—	—	—	5,99	2,62	2,79	4,85	4,24	3,73	3,73
C ₂	—	—	7,50	5,46	5,70	2,20	2,50	4,90	4,23	4,13	4,13
A ₃	8,38	7,74	—	—	6,315	2,75	2,98	5,06	4,46	4,25	4,18
T ₄	—	—	7,14	1,50	5,77	1,97	2,37	4,87	4,18	4,12	4,12
G ₅	7,88	—	—	—	5,93	2,62	2,68	4,98	4,35	4,11	4,11
C ₆	—	—	7,46	5,42	6,20	2,20	2,20	4,50	4,07	4,07	4,07

В то же время температурные зависимости протонных химических сдвигов дезоксигексануклеотида d(GCATGC), как видно из рис. 1б, имеют выраженную S-образную форму, характерную для плавления дуплекса, и хорошо коррелируют с аналогичными зависимостями химических сдвигов протонов гексамера d(CGTAACG) [3]. Важно отметить, что экстраполяция концентрационных зависимостей гексамера d(GCATGC) к нулевой концентрации дает существенно более низкие значения химических сдвигов по сравнению со значениями химических сдвигов зависимостей $\delta(T)$ при максимальной температуре измерений, когда можно считать, что практически весь гексамер находится в одноцепочечном состоянии. Это не согласуется с моделью двух состояний (мономер-дуплекс), поскольку в этом случае концентрационные и температурные кривые должны приближаться к значению протонных химических сдвигов мономера дезоксигексануклеотида в растворе, как это имело место для всех исследованных ранее самокомплементарных дезоксиолигонуклеотидов, в частности, d(TACGTA), d(CGTAACG) и d(CGCGCG) [3,6]. Можно предположить, что причиной такого различия в ходе концентрационных зависимостей гексамеров при низких температурах является формирование одноцепочечным дезоксигексануклеотидом d(GCATGC) в растворе компактной структуры (шпилькоподобной), магнитное экранирование протонов в которой близко к наблюдаемому в дуплексе гексамера. Такое предположение можно считать оправданным в связи с повышенной конформационной гибкостью гексамера на участке d(ApT) [10].

Для определения равновесной константы и термодинамических

параметров реакции образования дуплекса гексамера d(GCATGC) использованы температурные зависимости протонных химических сдвигов, полученные при максимальной в данных исследованиях концентрации (рисунок 1,б). При этом для описания экспериментальных кривых была использована модель двух состояний [3,6], в предположении, что вклад компактной структуры мономера дезоксигексануклеотида играет существенную роль лишь в области малых концентраций и при сравнительно низких температурах. Согласно такой модели результирующий химический сдвиг i -го протона гексамера при температуре T может быть представлен в виде [3]:

$$\delta_i(T) = f_m(T)\delta_{mi}(T) + f_d(T)\delta_{di}, \quad (1)$$

где $\delta_{mi}(T)$, δ_{di} и $f_m(T)$, $f_d(T)$ – протонные химические сдвиги и равновесные мольные доли гексамера при температуре T в мономерной и дуплексной формах соответственно. В выражении (1) учтено, что значение $\delta_{mi}(T)$ монотонно изменяется с увеличением температуры за счет конформационных перестроек мономера, обусловленных изменениями внутримолекулярного стэкинга оснований [8]. Для конформационно более стабильных дуплексных структур обычно считается, что δ_{di} от температуры практически не зависит [8].

Для аппроксимации температурной зависимости мольной доли дуплекса гексамера в растворе использовано регрессионное уравнение [8]:

$$f_d(T) = f_d(T_1)(1 + S(T_1))/(1 + S(T)), \quad (2)$$

где $S(T) = (T/T_m)^b$; T_m и b – параметры регрессионного уравнения. Здесь T_1 – некоторая фиксированная температура ($T_1 = 298$ К), а параметр T_m соответствует температуре плавления дуплекса, то есть температуре, при которой мольная доля дуплекса в растворе уменьшается в два раза по сравнению с его содержанием при низких температурах [4,8]. Величину $f_d(T)$ можно выразить через равновесную константу образования дуплекса гексамера $K(T)$ в соответствии с моделью двух состояний [8]:

$$f_d(T) = 1 - 2/(1 + \sqrt{1 + 8K(T)N_0}), \quad (3)$$

где N_0 – исходная концентрация нитей олигонуклеотида в растворе. Расчет термодинамических параметров (энтропии и энтальпии) проводился с использованием соотношений (2) и (3), где константы равновесия учитывались в виде функции параметров ΔH и ΔS :

$$K(T) = \exp\left(\frac{\Delta S}{R} - \frac{\Delta H}{RT}\right). \quad (4)$$

предполагая, что величины ΔH^0 и ΔS^0 практически не зависят от температуры в исследованном температурном диапазоне [3, 8].

Неизвестные параметры, входящие в уравнения (1)-(4), определяли из условия минимума квадратичной функции невязки экспериментальных и

расчетных значений протонных химических сдвигов гексамера при различных температурах [3,8]. Вычислительная процедура минимизации функции невязки описана в [8]. Значения K , ΔH^0 , ΔS^0 (при стандартных условиях $T=298\text{ K}$) и величина T_m , рассчитанные по температурным зависимостям химических сдвигов протонов гексамера d(GCATGC), представлены в таблице 2. Там же для сравнения приведены результаты расчета этих параметров для d(GCATGC)₂ по модели "ближайшего соседа" [4].

Таблица 2 – Равновесные параметры реакции самоассоциации дезоксигексануклеотида 5'-d(GpCpApTpGpC) в 0,1 М Na-фосфатном буфере, рD 7.1, $N_0=3,07\text{ mM}$ при $T=298\text{ K}$

Протон	$K, 10^3$ л/моль	δ_m , м.д.	δ_d , м.д.	T_m , К	$-\Delta H^0$, кДж/моль	$-\Delta S^0$, Дж/(моль·К)	$-\Delta G^0$, кДж/моль
CH ₃ (T4)	164	1,731	1,493	324,2	179,1	501,3	29,7
H2(A3)	67	8,156	7,723	321,3	166,2	465,4	27,5
H5 (C2)	118	5,950	5,418	323,7	170,1	473,2	28,9
H6 (T4)	203	7,415	7,127	325,7	184,7	518,1	30,3
H6 (C2)	169	7,823	7,486	324,2	179,7	502,9	29,8
H6 (C6)	30	7,600	7,453	317,5	158,3	456,1	25,5
Среднее	126±51	—	—	322,7±2,3	173±8	486±21	29,1±0,9
Значения параметров, рассчитанные по модели "ближайшего соседа" [4]							
—	—	—	—	—	182	518	27,7

Как известно, термодинамическая стабильность олигонуклеотидных дуплексов существенно зависит от длины, нуклеотидного состава и последовательности нуклеотидов в цепи олигомера. Полученные величины термодинамических параметров реакций образования дуплекса d(GCATGC)₂ находятся в хорошем согласии (в расчете на одну пару оснований) с соответствующими теоретическими значениями ΔH^0 и ΔS^0 , рассчитанными по модели "ближайшего соседа" [4], для реакций димеризации самокомплементарных гексамеров в растворе. Одной из основных причин довольно большой стабильности дуплекса d(GCATGC)₂ является сравнительно высокая энергия взаимодействия нуклеотидных пар в терминальных d(GC)₂ участках и по-видимому, связанное с этим кооперативное взаимоусиление уотсон-криковских водородных связей, стэкинг-взаимодействий, а также конформационных изменений в цепи. При этом следует отметить, что наличие в исследованном ранее дезоксигексануклеотиде d(TACGTA) двух низкоэнергетических d(TA)/d(AT) терминальных звеньев существенно снижает температуру плавления T_m двуспирального дуплекса этого гексамера [6].

Для того, чтобы согласовать результаты температурных и концентрационных зависимостей протонных химических сдвигов молекул

гексамера d(GCATGC) (см. рисунок 1,а,б) в аддитивной модели (1) для анализа кривых титрования (рисунок 1,а) был дополнительно учтен вклад от компактной формы мономера, магнитное экранирование протонов в которой может существенно отличаться от экранирования в "развернутой" мономерной последовательности:

$$\begin{aligned}\delta_i(N_0) &= f_m(N_0)\delta_{mi} + f_d(N_0)\delta_{di} + f_c(N_0)\delta_{ci}, \\ f_m(N_0) + f_d(N_0) + f_c(N_0) &= 1,\end{aligned}\quad (5)$$

где $\delta_i(N_0)$ и δ_{ci} – результирующий химический сдвиг i -го протона гексамера и протонный химический сдвиг в компактной одноцепочечной структуре, $f_m(N_0)$, $f_d(N_0)$ и $f_c(N_0)$ – равновесные мольные доли дезоксигексануклеотида в мономерной, дуплексной и шпильчатой формах, соответственно. Тогда зависимость химического сдвига от концентрации N_0 олигонуклеотида в растворе можно представить в виде [7]:

$$\delta_i(N_0) = \delta_{di} + 2(\delta_{0i} - \delta_{di}) / (1 + \sqrt{1 + 8zN_0}), \quad (6)$$

где $\delta_{0i} = (\delta_{mi} + \delta_{ci}K_c) / (1 + K_c)$ и $z = K / (1 + K_c)^2$, δ_{ci} и K_c – протонный химический сдвиг и равновесная константа образования компактной формы мономера, соответственно. Следует отметить, что модель (6) использовалась нами ранее для анализа равновесного поведения дезоксигептануклеотида 5'-d(GCGAAGC), содержащего палиндромную последовательность в цепи и способного образовывать термически устойчивую шпильчатую структуру в водном растворе. ЯМР-анализ показал, что в состоянии равновесия, наряду со шпилькой указанный гептамер находится в растворе в мономерной и дуплексной формах [7].

При минимизации функционала невязки экспериментальных и расчетных значений химических сдвигов $\delta_i(N_0)$ использовались значения равновесной константы образования дуплекса K и значения протонных химических сдвигов в мономерной и дуплексной формах гексамера d(GCATGC), полученные при анализе температурных зависимостей химических сдвигов. Основанием для этого послужило то, что компактная форма присутствует в растворе лишь при малых концентрациях и невысоких температурах, тогда как температура плавления гексамерного дуплекса довольно высока ($T_m = 322$ К) и измерения температурной зависимости протонных химических сдвигов проведены при максимальной концентрации гексамера в растворе ($N_{0\max} = 3,07$ мМ). В результате расчета по модели (6) были получены значения равновесной константы образования компактной структуры гексамера при двух температурах: $K_{c(298)} \approx 3,0$, $K_{c(308)} \approx 0,8$, которые находятся в хорошем согласии с величиной равновесной константы образования шпильчатой структуры дезоксигептамера d(GCGAAGC) в водном растворе [7].

Одна из возможных компактных одноцепочечных структур

дезоксигексануклеотида d(GpCpApTpGpC) в растворе в виде шпильки, включающей стебель из двух GC пар, представлена на рисунке 2. Расчет пространственной структуры шпильки гексамера d(GCATGC) выполнен методами молекулярной механики с использованием программы *X-PLOR* (версия 3.851) [11]. В стартовых конфигурациях молекулы

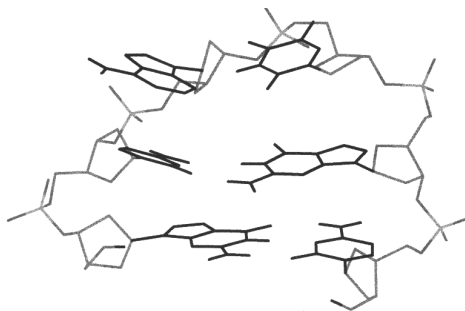


Рисунок 2 – Расчетная пространственная структура компактной одноцепочечной формы дезоксигексануклеотида 5'-d(GpCpApTpGpC), полученная методом молекулярного моделирования

дезоксигексануклеотида локальные конформационные параметры динуклеотидного стебля полагали близкими к наблюдаемым в *B*-форме ДНК, а конформация петли шпильочной структуры варьировалась в достаточно широких пределах. Рассчитанная пространственная структура шпильки гексамера d(GCATGC), представленная на рисунке 2, характеризуется сравнительно малым значением общей потенциальной энергии молекулярной системы и оптимальными энергетическими соотношениями между различными ее составляющими.

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о существовании в растворе сложного равновесия различных конформационных состояний дезоксигексануклеотида d(GCATGC), обусловленные его нуклеотидным составом и последовательностью оснований в цепи. Можно предположить, что наличие терминальных d(GC)-сайтов в сочетании с центральными d(AT)-сайтами в самокомплементарных дезоксиолигонуклеотидных последовательностях создает условия для формирования неканонических компактных структур (шпилькоподобных) даже в довольно коротких одноцепочечных фрагментах ДНК.

Библиографический список

1. Thermodynamics of (dG-dC)₂ double-helix formation in water and deuterium oxide / D.D. Albergo, L.A. Marky, K.J. Breslauer, D.H. Turner // *Biochemistry*. — 1981. — V. 20. — P. 1409–1417.
2. Influence of DNA base sequence on the binding energetics of actinomycin D / S. Bailey, D.E. Graves, R. Rill, G. Marsh // *Biochemistry*. — 1993. — V. 32. — P. 5881–5887.
3. ЯМР-исследование самоассоциации молекул дезоксигексануклеотидов 5'-d(CpGpTpApCpG) и 5'-d(CpGpCpGpCpG) в водном растворе / А.Н. Веселков, В.И. Пахомов, Р.Дж. Итон, Д.Б. Дэвис // *Биофизика*. — 2000. — Т. 45. — С. 20–26.

4. SantaLucia J.Jr. A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics / J.Jr. SantaLucia // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1998. — V. 95. — P. 1460–1465.
5. Chen Y.K. Stability of double- and triple-strand helical nucleic acids / Y.K. Chen, B.M. Pettit // Progr. Biophys. Mol. Biol. — 1992. — V. 58. — P. 225–257.
6. ЯМР-анализ термодинамических характеристик самоассоциации молекул дезоксигексануклеотида 5'-d(ТрАпСрГрТрА) в водном растворе / А.Н. Веселков, В.И. Пахомов, Р.Дж. Итон, Д.Б. Дэвис // Доповіді НАНУ. — 2001. — № 3. — С. 95–101.
7. Davies D.B. NMR determination of the conformational and drug binding properties of the DNA heptamer d(GpCpGpApApGpC) in aqueous solution / D.B. Davies, V.I. Pahomov, A.N. Veselkov // Nucleic Acids Res. — 1997. — V. 25. — P. 4523–4531.
8. Davies D.B. Structural and thermodynamical analysis of molecular complexation by ¹H NMR spectroscopy: intercalation of ethidium bromide with the isomeric deoxytetranucleotides 5'-d(GpCpGpC) and 5'-d(CpGpCpG) in aqueous solution / D.B. Davies, A.N. Veselkov // J. Chem. Soc. Faraday Trans. — 1996. — V. 92. — P. 3545–3557.
9. NMR studies of the interaction of the antibiotic nogalamycin with the hexadeoxyribonucleotide duplex d(5'-GCATGC)₂ / M.S. Searle, J.G. Hall, W.A. Denny, L.P. Wakelin // Biochemistry. — 1988. — V. 27. — P. 4340–4349.
10. Crystal structure of the complementary quadruplex formed by d(GCATGCT) at atomic resolution / J.H. Thorpe, S.C.M. Teixeira, B.C. Gale, C.J. Cardin // Nucleic Acids Res. — 2003. — 31. — № 3. — P. 844–849.
11. Brunger A.T. X-PLOR, A system for X-ray crystallography and NMR / A.T. Brunger. — Yale: Univ. Press, 1992. — 382 p.

Поступила в редакцию 02.03.2004 г.