

Исследование самоассоциации молекул некоплементарных дезокситетрануклеотидов различной последовательности оснований в водном растворе методом ^1H -ЯМР спектроскопии

А. Н. Веселков*, С. Ф. Барановский, Н. В. Петренко, С. Г. Осетров, Д. А. Веселков, Л. Н. Дымант, А. Такер¹, Х. Паркес¹, Д. Дэвис¹

Севастопольский государственный техн. университет Министерства образования Украины 335053, Севастополь, Студгородок

¹Лондонский университет, Беркбек колледж
Лондон WC1N 0PP, Великобритания

Изучена самоассоциация молекул некоплементарных дезокситетрарибонуклеозидтрифосфатов 5'-d(CGAA), 5'-d(AAGC), 5'-d(CTGA) и 5'-d(GAAG) в водном растворе методом одномерной и двухмерной ЯМР- ^1H спектроскопии (500 и 600 МГц). Двухмерная гомоядерная ПМР-спектроскопия 2M-TOCSY и 2M-NOESY использована для полного отнесения сигналов протонов тетрануклеотидов. Измерены концентрационные и температурные зависимости химических сдвигов необменивающихся протонов молекул. Экспериментальные результаты проанализированы на основе димерной модели ассоциации молекул. Определены равновесные константы димеризации, значения предельных химических сдвигов протонов тетрануклеотидов в мономере и ассоциате, термодинамические параметры реакции ΔH и ΔS . Проведен сравнительный анализ характеристик самоассоциации некоплементарных дезокситетрануклеотидов различного состава и последовательности оснований в цепи.

Введение. Изучение поведения одноцепочечной ДНК (ssДНК) в растворе важно для понимания процессов передачи генетической информации и репликации ДНК. Известно, что в некоторых бактериофагах молекула ДНК существует в виде одноцепочечной структуры [1]. Исследование конформации молекулы однонитчатой ДНК в растворе связано с большими трудностями; в разбавленном солевом растворе при комнатной температуре между азотистыми основаниями ssДНК могут возникать как внутри-, так и межмолекулярные связи [2, 3]. Интерес к одноцепочечным нуклеотидным последовательностям поддерживается также исследованиями комплексообразования биологически активных веществ с ssДНК. Полученные недавно данные [4, 5] свидетельствуют о высоком сродстве и избирательном связывании антибиотика актиномицина D с ssДНК. Акридиновый краситель профлавин [6] и фенантридиновый краситель бромистый этидий [7] также проявляют сиквенс-специфичность связывания с одноцепочечными олигонуклеотидными последовательностями. В работе [8] показано, что гомодимер этидия, способный к бис-интеркаляции, имеет примерно одинаковое

*Correspondence address.

© А. Н. ВЕСЕЛКОВ, С. Ф. БАРАНОВСКИЙ, Н. В. ПЕТРЕНКО, С. Г. ОСЕТРОВ, Д. А. ВЕСЕЛКОВ, Л. Н. ДЫМАНТ, А. ТАКЕР, Х. ПАРКЕС, Д. ДЭВИС, 1996

сродство к связыванию как с однонитчатой, так и двухспиральной ДНК. Экспериментально установлено, что специфичность связывания ароматических лигандов с нативной ДНК проявляется уже на коротких самокомплементарных олигонуклеотидах, включающих в себя соответствующий участок [6, 7, 9, 10]. Следовательно, можно ожидать, что необходимые энергетические и структурные характеристики комплекса лигандов с ssДНК в растворе могут быть выявлены посредством изучения их взаимодействия с малыми фрагментами одноцепочечных нуклеиновых кислот — некомплементарными олигонуклеотидами заданной последовательности оснований. В связи с этим важным представляется непосредственное исследование поведения некомплементарных олигонуклеотидов различных последовательностей, находящие структурных и энергетических характеристик их самоассоциации в растворе.

Наиболее эффективным экспериментальным методом исследования конформации олигонуклеотидов в растворе является ЯМР-спектроскопия. Ранее [11—13] методом ^1H -ЯМР-спектроскопии нами изучено равновесие самокомплементарных дезокситетрануклеотидов в водно-солевом растворе. В настоящей работе в тех же условиях проанализирована самоассоциация некомплементарных дезокситетрарибонуклеозидтрифосфатов $5'$ -d(CGAA), $5'$ -d(AAGC), $5'$ -d(CTGA) и $5'$ -d(GAAG), отличающихся последовательностью оснований в цепи. Изучены концентрационные и температурные зависимости протонных химических сдвигов дезокситетрануклеотидов для определения равновесных констант и термодинамических параметров самоассоциации молекул в водном растворе. Данные гомоядерной корреляционной двухмерной ЯМР-спектроскопии (2M-TOCSY и 2M-NOESY) использованы для полного отнесения сигналов в спектре ^1H -ЯМР олигонуклеотидов.

Методика. Дезокситетрарибонуклеозидтрифосфаты $5'$ -d(CGAA), $5'$ -d(AAGC), $5'$ -d(CTGA) и $5'$ -d(GAAG) синтезированы компанией «Oswel DNA Service» (Великобритания). Образцы лиофилизировали из D_2O с изотопной чистотой 99,95 % («Sigma», США) и растворяли в дейтерированном 0,1 М Na-фосфатном буфере (pD 7,15).

Одномерные спектры ^1H -ЯМР измерены на импульсном спектрометре «JEOL GSX 500» с резонансной частотой 500 МГц. Концентрационные измерения протонных химических сдвигов молекул выполнены при двух температурах ($T_1 = 298$ К, $T_2 = 308$ К) в интервале концентраций от 3÷4 до 0,1 ммоль. Температурные зависимости химических сдвигов протонов дезокситетрануклеотидов измерены в диапазоне температур от 283 до 353 К. Двухмерные гомоядерные TOCSY и NOESY эксперименты, использованные для отнесения сигналов необменивающихся протонов дезокситетрануклеотидов в ПМР-спектрах водных растворов, измеряли на спектрометре «Bruker AMX» (600 МГц). Исследуемые образцы предварительно дегазировали, продувая их азотом в течение 20—30 мин. Спектры 2M-NOESY регистрировали при фиксированной температуре $T = 298$ К с использованием стандартной последовательности импульсов при ширине спектров $\text{SW} = 5400$ Гц, 4096 точек в период детектирования (t_2), 512 приращений времен эволюции (t_1) и при двух временах смешивания $\tau_{m1} = 90$ и $\tau_{m2} = 200$ мс. Спектры 2M-TOCSY измеряли при той же температуре, используя 2048 точек в t_2 и 256 приращений в t_1 . Период восстановления составлял 1,5 с для 2M-TOCSY и 3 с для 2M-NOESY. Для увеличения чувствительности импульсную последовательность при каждом t_1 повторяли 16 и 32 раза для 2M-TOCSY и 2M-NOESY экспериментов соответственно. Температуру в процессе измерений стабилизировали BVT-терморегулятором. Одномерные и двухмерные спектры измеряли в стандартных ампулах с внешним диаметром 5 мм, минимальный раствор объема 5 мл. Химический сдвиг определяли относительно ДСС (2,2-диметил-2-силапентан-5-сульфокисло-

та), в качестве внутреннего стандарта использовали ТМА (бромистый тетраметиламмоний).

Результаты и обсуждение. Сигналы в спектре ПМР дезокситетрануклеотидов d(ApApGpC), d(CpTpGpA), d(CpGpApA) и d(GpApApG) относили на основании двумерных гомоядерных TOCSY- и NOESY-экспериментов. Спектр 2М-TOCSY использовали для выявления протонов, связанных J-взаимодействием и принадлежащих отдельному дезоксирибозному кольцу, а также для идентификации необменивающихся протонов по J(H5, H6)- и J(CH₃, H6)-корреляциям в основаниях цитозина и тимина. Из 2М-NOESY путем рассмотрения кросс-пиков между ароматическими протонами и протонами дезоксирибозы по известной схеме [14, 15] определено, какие сигналы протонов дезоксирибозного кольца и нуклеотидного основания относятся к отдельному нуклеозиду и в каком порядке углеводные остатки связаны в олигомерную цепь. В табл. 1 представлены полученные в результате отнесения сигналов значения химических сдвигов для всех необменивающихся протонов анализируемых дезокситетрануклеотидов. Исследованные нами тетрануклеотиды d(AAGC), d(CGAA) и d(GAAG) соответствуют участкам цепи гептамера d(GpCpGpApApGpC), который образует в растворе исключительно стабильную шпильку, содержащую петлю из нуклеозидов (GAA) [16]. Сравнение значений протонных химических сдвигов, приведенных в табл. 1 для d(AAGC), d(CGAA) и d(GAAG), с опубликованными результатами отнесения для ароматических протонов нуклеотидов гептамера [16] показывает их хорошее соответствие. Вместе с тем наблюдаются довольно большие отличия в резонансах протонов дезоксирибозных колец гептамера и исследованных тетрамеров, особенно для нуклеозидов, формирующих шпилечную петлю. По-видимому, образование шпильки за счет складывания цепи самой на себя приводит к достаточно напряженной структуре сахарофосфатного остова в области петли, что вызывает существенные различия в положениях резонансов протонов сахар-

Таблица 1
Сигналы ЯМР (δ , млн⁻¹) протонов дезокситетрарибонуклеозидтрифосфатов
5'-d(ApApGpC), C = 4,13 ммоль/л; 5'-d(CpTpGpA), C = 3,45 ммоль/л; 5'-d(CpGpApA),
C = 4,0 ммоль/л; 5'-d(GpApApG), C = 2,64 ммоль/л при T = 298 K; pD = 7,15

Нуклео- зид	H8	H6/H2	H5	H1'	H2'	H2''	H3'	H4'	H5'	H5''	CH ₃
5'-A	8,13	7,81	—	5,83	2,60	2,58	4,98	4,35	4,09	4,19	—
A	7,91	8,01	—	6,00	2,14	2,42	4,80	4,20	3,70	3,70	—
G	7,88	—	—	5,85	2,65	2,63	4,95	4,35	4,07	4,17	—
C	—	7,64	5,72	6,21	2,22	2,33	4,53	4,12	4,17	4,35	—
5'-C	—	7,74	5,95	6,05	1,89	2,26	4,85	4,12	3,92	3,92	—
T	—	7,42	—	6,13	2,23	2,50	4,66	4,14	3,72	3,79	1,83
G	8,01	—	—	5,76	2,48	2,48	4,89	4,27	3,99	4,03	—
A	8,34	7,83	—	6,36	2,54	2,74	4,87	4,25	4,11	4,16	—
5'-C	—	7,49	5,91	6,00	1,60	2,24	4,55	4,00	3,62	3,62	—
G	7,86	—	—	5,51	2,46	2,46	4,87	4,22	3,91	4,08	—
A	8,12	7,83	—	6,02	2,62	2,51	4,80	4,22	4,02	4,02	—
A	8,25	7,86	—	6,24	2,48	2,68	4,96	4,31	4,01	4,15	—
5'-G	7,86	—	—	5,81	2,55	2,53	4,82	4,31	4,01	4,12	—
A	8,12	7,78	—	5,95	2,45	2,33	4,94	4,66	3,65	4,11	—
A	8,08	7,68	—	5,96	2,57	2,52	4,95	4,34	4,12	4,12	—
G	7,75	—	—	5,72	2,30	2,09	4,96	4,16	3,65	4,11	—

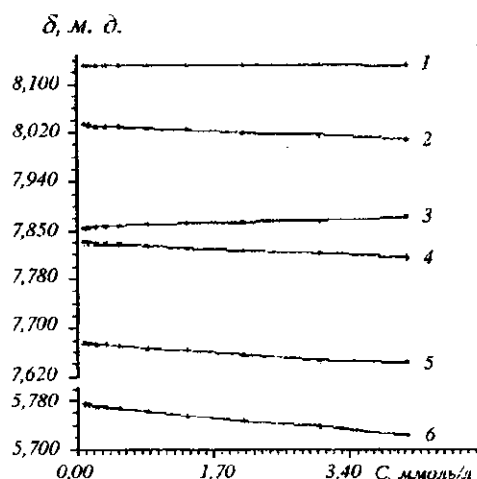


Рис. 1. Концентрационные зависимости химических сдвигов протонов тетрауклеотида 5'-d(ApApGpC) при $T = 298$ К: 1 — H8(A1); 2 — H2(A2); 3 — H8(G3); 4 — H2(A1); 5 — H6(C4); 6 — H5(C4)

ных колец в сравнении с наблюдаемыми для линейной структуры некомплементарного одноцепочечного дезокситетрануклеотида.

На рис. 1 в качестве примера представлены концентрационные зависимости химических сдвигов ароматических протонов и протонов H1' дезоксирибозы тетрауклеотида 5'-d(ApApGpC) при температуре $T = 298$ К. Для большинства протонов наблюдается довольно слабое смещение химического сдвига в область сильного поля при увеличении концентрации в исследованном диапазоне от 0,09 до 4,1 ммоль. Более выраженная зависимость имеет место для протонов H5 и H6 дезоксицитозина. Для получения ЯМР-сигнала достаточной интенсивности требуются относительно высокие по отношению к спектроскопическим исследованиям концентрации образцов, при которых повышается вероятность агрегации молекул в растворе. В случае некомплементарных нуклеотидных последовательностей возможность агрегации увеличивается за счет неспецифического спаривания оснований различных олигонуклеотидных цепей. Известно, что вероятность агрегации зависит от ионной силы, температуры раствора, концентрации и молекулярной массы олигомера. Исследования, проведенные в [17], дают основание считать, что при использованных в настоящей работе концентрациях тетрауклеотидов и ионной силе 0,1 М Na^+ агрегация незначительна. Таким образом, взаимодействие молекул тетрауклеотидов можно рассматривать в соответствии с моделью двух состояний:



В таком случае зависимость наблюдаемого химического сдвига протонов тетрауклеотидов от концентрации C представляется в форме [12]

$$\delta = \delta_d + (\delta_d - \delta_m) \left([1 - (8K_A C + 1)^{1/2}] / 4K_A C \right), \quad (2)$$

где δ_m , δ_d — протонные химические сдвиги в мономерной и димерной формах соответственно. Величины δ_m , δ_d и K_A , неизвестные априори, могут быть найдены как параметры модели (2) по экспериментальным концентрационным зависимостям химических сдвигов протонов из условия минимизации взвешенной суммы квадратов невязок δ_{si} и δ_i , где δ_{si} — экспериментальные, δ_i — рассчитанные по (2) значения химических сдвигов при i -й концентрации соответствующего тетрауклеотида [18]. Подобные расчеты

Таблица 2
Термодинамические параметры самоассоциации некомплементарных дезокситетрануклеотидов в водном растворе ($pD = 7,15$)

Тетра- нуклеотид	K_A , л/моль ($T=298$ К)	1-й метод расчета			2-й метод расчета	
		ΔH , кДж/моль	$\Delta S_{(298)}$, Дж/(моль·К)	$\Delta G_{(298)}$, кДж/моль	ΔH , кДж/моль	$\Delta S_{(298)}$, Дж/(моль·К)
d(AAGC)	23,4±6,8	-(38,9±2,0)	-(104,4±6,0)	-(7,8±0,7)	-(40,8±2,5)	-(109,5±5,5)
d(CGAA)						
d(CTGA)	8,2±3,5	-(31,9±0,6)	-(89,6±1,6)	-(5,2±1,2)	-(35,5±2,5)	-(98,2±4,0)
d(GAAG)	4,0±0,8	-(18,5±6,1)	-(50,7±19,0)	-(3,4±0,5)	-(19,5±4,0)	-(64,6±8,1)

выполнены для необменивающихся протонов оснований и протонов Н1' дезоксирибозных колец тетрануклеотидов. Согласно модели реакции (1), параметр K_A является равновесной константой димеризации молекул и должен быть одинаковым для всех протонов каждого тетрануклеотида. Усредненные значения этого параметра для исследованных некомплементарных дезокситетрануклеотидов приведены в табл. 2. Из таблицы видно, что величины K_A и соответственно значения свободной энергии Гиббса реакций димеризации $\Delta G = -RT \ln K_A$ существенно отличаются для тетрануклеотидов различных последовательностей оснований. Отметим, что для изомерных дезокситетрануклеотидов 5'-d(AAGC) и 5'-d(CGAA), как показали расчетные значения равновесных констант и термодинамических параметров реакций димеризации, совпадают в пределах погрешности их определения. Полученные значения констант реакции для 5'-d(AAGC) и 5'-d(CGAA) примерно в 3—5 раз меньше, чем K_A для самокомплементарных дезокситетрануклеотидов, имеющих в своем составе две А—Т-пары, в аналогичных условиях растворителя (0,1 М фосфатный буфер, $T = 298$ К, $pD = 7,1$) [11, 13]. Константы димеризации для некомплементарного дезокситетрануклеотида 5'-d(CTGA) на порядок, а для 5'-d(GAAG) примерно в 30—50 раз меньше констант самоассоциации самокомплементарных указанных тетрануклеотидов в тех же условиях [11—13]. Как известно, свободная энергия Гиббса ΔG — это термодинамическая величина, соответствующая количеству энергии, высвобождаемой в процессе реакции. Формально параметр ΔG , имеющий отрицательное значение, соответствует энергии связи молекул, поэтому при прочих равных условиях более вероятно образование такой структуры, для которой абсолютное значение ΔG больше. Сравнение параметров ΔG для исследованных некомплементарных дезокситетрануклеотидов (табл. 2) показывает их существенную зависимость от нуклеотидных последовательностей. Наблюдаемые различия, очевидно, связаны с возможностью специфического спаривания оснований (пары С—G и А—T) при «скольжении» нитей тетрануклеотидов 5'-d(AAGC), 5'-d(CGAA) и 5'-d(CTGA) относительно друг друга (рис. 2, а—г). Теоретический анализ [19] и экспериментальные данные [20] свидетельствуют о том, что водородные связи и межплоскостное или стэкинг-взаимодействие, обусловленное ван-дер-ваальсовыми силами и гидрофобными эффектами, дают сравнимый вклад в стабилизацию двойной спирали. В димере тетрануклеотидов 5'-d(CTGA), где CG-пары разделены неспаренными основаниями тимина (T) и цитозина (C), имеет место значительно

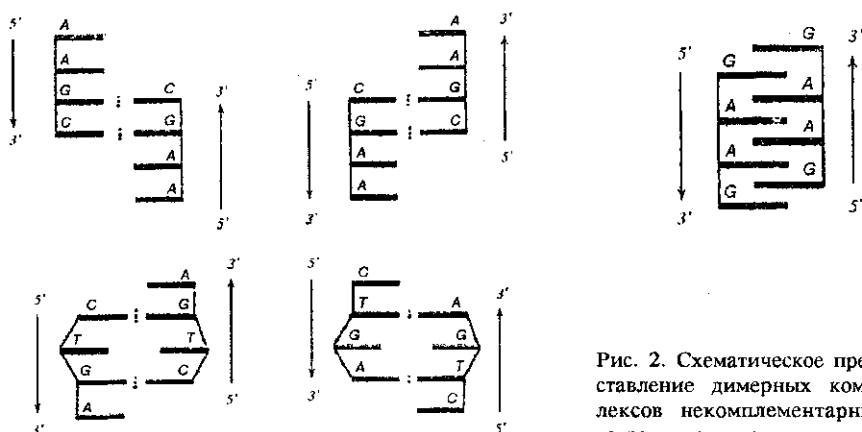


Рис. 2. Схематическое представление димерных комплексов некомплементарных тетрауклеотидов

меньшее стэкинг-взаимодействие между парами (рис. 2, в, г) в сравнении с димерами 5'-d(AAGC) и 5'-d(CGAA), в которых спаренные C—G-основания расположены последовательно (рис. 2, а, б). С этим, по-видимому, связаны различия в значениях свободной энергии для реакций димеризации этих тетрауклеотидов. Что касается тетрамера 5'-d(GAAG), то для него специфическое спаривание оснований невозможно ни при каких смещениях нуклеотидных цепей относительно друг друга. Вместе с тем в работе [21] на основе данных УФ- и ЯМР-спектроскопии показана возможность образования димера некомплементарного динуклеотида 5'-d(pApA), в котором одно основание аденина каждой молекулы интеркалирует между двумя основаниями другой молекулы так, что димерный ассоциат стабилизируется за счет оснований противоположных нуклеотидных цепей. В связи с этим можно предположить, что стабилизация димера некомплементарного дезокситетрауклеотида 5'-d(GAAG) осуществляется посредством стэкинг-взаимодействия оснований противоположных нитей тетрамера (рис. 2, д).

Для определения термодинамических параметров реакций самоассоциации тетрауклеотидов исследованы зависимости протонных химических сдвигов от температуры. На рис. 3 приведены температурные зависимости химических сдвигов для одной из изученных нами систем, 5'-d(CTGA) при $C = 3,45$ ммоль/л. Следует отметить, что в сравнении с самокомплементарными дезокситетрауклеотидами температурные, так же как и концентрационные зависимости химических сдвигов необмениваемых протонов для некомплементарных тетрамеров, выражены значительно слабее. В расчет-

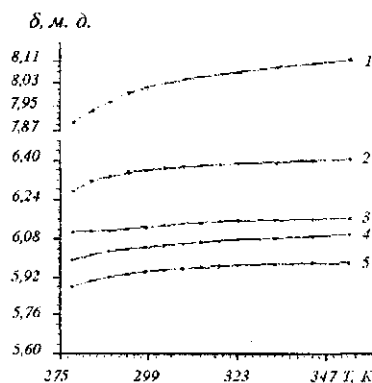


Рис. 3. Температурные зависимости химических сдвигов протонов тетрауклеотида 5'-d(CTGA) при $C = 3,45$ ммоль/л: 1 — H8(G); 2 — H1'(A); 3 — H1'(T); 4 — H1B(C); 5 — H5(C)

ной схеме зависимость наблюдаемого химического сдвига δ_i для i -го протона от температуры T_j была представлена в виде:

$$\delta_i(T_j) = \delta_{mi}(T_j)f_m(T_j) + \delta_{di}(T_j)f_d(T_j), \quad (3)$$

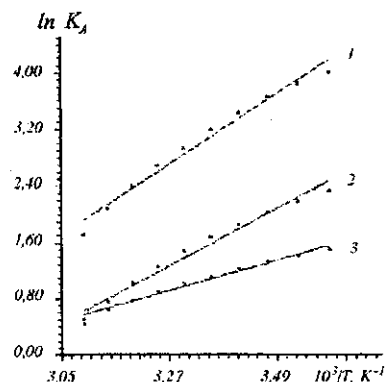
где $f_m(T_j)$ и $f_d(T_j)$ — равновесные мольные доли тетрауклеотида при температуре T_j в мономерной и димерной формах ($f_m + f_d = 1$). Результаты расчетов параметра δ_m , полученные из концентрационных зависимостей химических сдвигов протонов при различных температурах ($T_1 = 298$ К, $T_2 = 308$ К) для тетрауклеотида 5'-d(GAAG), свидетельствуют о том, что δ_m протона мономера меняется при вариации температуры. Это подтверждается также сравнением расчетных значений δ_m с экспериментальными значениями протонных химических сдвигов $\delta = \delta_{m0}$ всех изученных дезокситетрауклеотидов при высокой температуре $T_0 = 353$ К, когда можно считать, что все молекулы в растворе находятся в мономерной форме. Зависимость δ_m от температуры наблюдается и для самокомплементарных дезокситетрауклеотидов различных последовательностей оснований [11—13]. Это связано с конформационными изменениями молекул тетрауклеотидов в мономерной форме, в частности, с изменением внутримолекулярного стэкинга при увеличении температуры. Однако величина протонного химического сдвига в димере δ_d , практически неизменная для дуплексной формы самокомплементарных дезокситетрауклеотидов [11—13], в случае некомплементарных тетрамеров, как показали проведенные исследования, оказалась зависящей от температуры. Последнее, очевидно, связано с тем, что димерный комплекс некомплементарных (в отличие от самокомплементарных дезокситетрауклеотидов) не имеет регулярной двухспиральной структуры. Ввиду этого параметры δ_{mi} и δ_{di} , входящие в модель (3), следует считать функцией температуры. Мольные доли f_m и f_d однозначно связаны с равновесной константой самоассоциации K_A молекул при данной температуре, что позволяет определить температурную зависимость $K_A(T)$ и термодинамические параметры ΔH и ΔS реакции образования димера тетрауклеотида в водном растворе. Величины ΔH и ΔS рассчитывались в настоящей работе, как и ранее в [13], двумя различными способами.

Способ 1. Расчетная методика предусматривает применение параметрических регрессионных уравнений для описания зависимости мольных долей от температуры. Экспериментальные кривые на рис. 3 аппроксимированы регрессионными уравнениями второго порядка относительно температуры [13]:

$$\delta_i(T_j) = \delta_{di}(T_j) + (\delta_{mi}(T_j) - \delta_{di}(T_j)) [f_{m1} + a_m(T_0 - T_j) \times \\ \times (T_1 - T_j)T/T_1^2 + ((f_{m0} - f_{m1}) / (T_0 - T_1)) \cdot (T_j - T_1) \cdot T_j/T_0]. \quad (4)$$

В соотношение (4) включены известные мольные доли при температуре $T_1 = 298$ К, найденные при исследовании концентрационных зависимостей химических сдвигов взаимодействующих молекул. При составлении уравнения учитывали также тот экспериментальный факт, что при высоких температурах ($T_0 = 353$ К) происходит полное расхождение нитей тетрауклеотида, т. е. молекулы находятся в мономерной форме ($f_m(T_0) = 1$). При проведении расчетов использована линейная аппроксимация $\delta_m(T)$ по известным значениям δ_m при двух температурах, как это обычно делается в подобных случаях [17, 22, 23]. Использована также линейная аппроксимирующая зависимость δ_d от температуры, включающая известное значение δ_{di} при температуре $T = 298$ К и варьируемый параметр a_d . Вычислительная процедура нахождения параметров a_m и a_d регрессионных уравнений, основанная на минимизации квадратичного функционала невязки с использованием экспериментальных температурных зависимостей химических

Рис. 4. Зависимости Вант-Гоффа $\ln K_A$ от $1/T$ для реакций самоассоциации некомплементарных дезокситетрануклеотидов: 1 — d(AAGC); 2 — d(CTGA); 3 — d(GAAG)



сдвигов различных протонов тетрануклеотида, достаточно подробно описана в [18]. Равновесные константы K_A при различных температурах определяли по значениям мольных долей $f_m(T_j)$:

$$K_A(T_j) = (1 - f_m(T_j)) / (2f_m^2(T_j) \cdot C). \quad (5)$$

Для оценки энтальпии и энтропии реакций образования димеров некомплементарных дезокситетрануклеотидов в растворе использовали формализм Вант-Гоффа. На рис. 4 приведены зависимости Вант-Гоффа $\ln K_A = F(1/T)$, использованные для оценки энтальпии ΔH и ΔS реакций образования димеров тетрануклеотидов. Данные достаточно хорошо аппроксимируются прямыми линиями, что свидетельствует о незначительном изменении теплоемкости в приведенном на графике температурном интервале ($273 \pm +338$ K). Следует отметить, что при высоких температурах ($T > 338$ K) величины $f_m(T)$ для исследованных дезокситетрануклеотидов принимают значения, близкие к 1. Это приводит к большим погрешностям в определении $K_A(T_j)$ по формуле (5) с использованием рассмотренной методики. В связи с этим во избежание неопределенности в вычислении $K_A(T_j)$ при высоких температурах для таких слабоассоциирующих систем мы ограничились рассмотрением более узкого диапазона температур. Энтальпии реакций рассчитывали по величине тангенсов углов наклона аппроксимирующих прямых в соответствии с соотношением Вант-Гоффа:

$$(d(\ln K_A)) / (d(1/T)) = -\Delta H / R. \quad (6)$$

Изменение энтропии ΔS находили из свободной энергии Гиббса ΔG и найденного значения ΔH :

$$\Delta S = (\Delta G - \Delta H) / T. \quad (7)$$

Определенные таким образом значения термодинамических параметров ΔH , ΔG , ΔS приведены в табл. 2.

Способ 2. Использовали соотношение (2), справедливое для реакции образования димера тетрануклеотида в растворе, в котором равновесные константы K_A димеризации молекул при различных температурах выражены через термодинамические параметры ΔH° и ΔS°

$$K_A(T) = \exp[(\Delta S^\circ / R) - (\Delta H^\circ / RT)] \quad (8)$$

в предположении, что величины ΔH° и ΔS° не зависят существенным образом от температуры в исследованном интервале температур. При этом в соотношении (2), как и в предыдущем способе, учитывали зависимость δ_m и δ_d от температуры. Тогда можно считать, что наблюдаемый химический сдвиг δ в соотношении (2) является функцией трех неизвестных параметров a_d , ΔH° и ΔS° . Минимизация квадратичного функционала

невязки экспериментальных и расчетных значений δ позволяет определить оптимальные значения термодинамических параметров реакций самоассоциации некомплементарных дезокситетрануклеотидов в водном растворе. Такие расчеты выполнены только для тех необменивающихся протонов тетрануклеотидов, которые испытывают наиболее выраженные температурные зависимости химических сдвигов, что позволило рассчитать термодинамические параметры с необходимой точностью. Усредненные значения термодинамических характеристик реакций образования димерного комплекса и соответствующие погрешности их определения, рассчитанные вторым способом, также приведены в табл. 2. Важно отметить, что термодинамические параметры, найденные двумя различными способами, в пределах погрешности их определения хорошо согласуются. Полученные значения энтальпии ΔH и энтропии ΔS , как и следовало ожидать, существенно ниже соответствующих величин для самокомплементарных дезокситетрануклеотидов различных последовательностей оснований [11—13]. Сравнение результатов подтверждает роль состава оснований для реакции димеризации некомплементарных дезокситетрануклеотидов в водном растворе. Вероятность образования димерного комплекса для некомплементарных тетрануклеотидов существенно выше в том случае, когда существует возможность спаривания отдельных оснований в нуклеотидных последовательностях. Энтальпия и энтропия реакций самоассоциации дезокситетрануклеотидов 5'-d(AAGC), 5'-d(CGAA) и 5'-d(CTGA), для которых при димеризации существует вероятность образования двух спаренных CG оснований при определенном смещении нуклеотидных цепей (рис. 2, а—в), существенно выше по абсолютной величине значений ΔH и ΔS для тетрануклеотида 5'-d(GAAG), при димеризации которого спаривание оснований невозможно. Отметим, что значение ΔH и ΔS для димеризации 5'-d(CGAA) и 5'-d(AAGC) близки по величине к термодинамическим параметрам самоассоциации 5'-GC и 5'-CG динуклеотидов [24]. Выше уже подчеркивалось, что различная величина стэкинг-взаимодействия между CG-спаренными основаниями в димерах дезокситетрануклеотидов 5'-d(AAGC) и 5'-d(CTGA) оказывает существенное влияние на энергетику самоассоциации тетрануклеотидов в растворе. Анализ показывает, что различие в значениях свободной энергии при димеризации этих дезокситетрануклеотидов связано как с энтальпийным, так и с энтропийным эффектами (см. табл. 2). При самоассоциации тетрамера 5'-d(CTGA) в сравнении с дезокситетрануклеотидами 5'-d(AAGC) и 5'-d(CGAA) наблюдается некоторое уменьшение энтропии реакции, что, очевидно, определяется вероятными структурными особенностями димерных комплексов этих молекул (см. рис. 2, а—в).

В заключение следует еще раз подчеркнуть, что проведенный анализ образования димерных агрегатов некомплементарных олигонуклеотидов различных последовательностей представляется важным для выяснения молекулярного механизма сиквенс-специфичности связывания лигандов с одноцепочечными нуклеиновыми кислотами в водном растворе.

Выражаем благодарность Королевскому обществу Великобритании за частичное финансирование (А. Н. В.) экспериментальных исследований; Объединенному исследовательскому центру Лондонского университета — за предоставленную возможность в Беркбек колледже и Куин-Мери колледже использовать для измерения ЯМР-спектрометр 500 и 600 МГц; Центральному исследовательскому фонду Лондонского университета — за финансирование (Д. Д.) приобретения образцов олигонуклеотидов.

Проведенные исследования частично финансированы Грантом N UD 7200 Международного научного фонда.

О. Н. Веселков, С. Ф. Барановський, М. В. Петренко, С. Г. Осетров, Д. О. Веселков, Л. Н. Димант, А. Такер, Х. Паркес, Д. Девіс

Дослідження самоасоціації молекул некомплементарних дезокситетрануклеотидів різної послідовності основ у водному розчині методом ^1H -ЯМР спектроскопії

Резюме

Вивчено самоасоціацію молекул некомплементарних дезокситетрарибонуклеозидтрифосфатів $5'$ -d(CGAA), $5'$ -d(AAGC), $5'$ -d(CTGA) і $5'$ -d(GAAG) у водному розчині методом одновимірної та двовимірної ^1H -ЯМР-спектроскопії (500 і 600 МГц). Двовимірну гомоядерну ПМР-спектроскопію 2D-NOESY використано для повного віднесення сигналів протонів тетрануклеотидів. Виміряно концентраційні і температурні залежності хімічних зсувів необмінюваних протонів молекул. Експериментальні результати проаналізовано на основі димерної моделі асоціації молекул. Визначено рівноважні константи димеризації, значення граничних хімічних зсувів протонів тетрануклеотидів у мономері та асоціаті, термодинамічні параметри реакції ΔH і ΔS . Здійснено порівняльний аналіз характеристик самоасоціації некомплементарних дезокситетрануклеотидів різного складу та послідовності основ у ланцюгу.

A. N. Veselkov, S. F. Baranovsky, N. V. Petrenko, S. G. Osetrov, D. A. Veselkov, L. N. Djimant, A. Tucker, H. Parkes, D. Davies

^1H -NMR investigation of the self-association of non-complementary deoxytetranucleotides of different base sequences in aqueous solution

Summary

Self-association of deoxytetraribonucleoside triphosphates $5'$ -d(CGAA), $5'$ -d(AAGC), $5'$ -d(CTGA), $5'$ -d(GAAG) in aqueous solution have been studied by one-dimensional and two-dimensional ^1H -NMR spectroscopy (500 and 600 MHz). Two-dimensional homonuclear PMR spectroscopy (2D-TOCSY and 2D-NOESY) was used for complete assignments of tetranucleotides proton signals. Concentration and temperature dependences of non-exchangeable proton chemical shifts have been measured. Experimental results have been analyzed using dimer model of molecules association. Equilibrium association constants, values of limiting proton chemical shifts of tetranucleotides in the monomer and dimer states, thermodynamic parameters ΔH , ΔS of the reaction of molecules dimerization have been determined. Comparative analysis of the self-association characteristics for non-complementary deoxytetranucleotides of different base sequences has been made.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Льюин Б. Гены.—М.: Мир, 1987.—544 с.
2. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот.—М.: Мир, 1987.—584 с.
3. Веселков А. Н., Морошкин В. А., Полякова И. Д. и др. Конформация молекулы денатурированной ДНК в растворах с разной ионной силой // Молекуляр. биология.—1976.—10, № 5.—С. 1050—1060.
4. Rill R. L., Hecker K. N. Biochemistry, mapping of drug binding sites on single-stranded DNA using sequenase T7 DNA polymerase // Biochemistry.—1995.—35.—P. 15987—15999.
5. Graves D. E. Sequence selective binding of actinomycin D to duplex and single-strand DNA, Book of abstracts // Workshop on DNA-drug interactions (Madrid, Nov., 15—17).—Madrid, 1993.—P. 39.
6. Davies D.B., Djimant L. N., Veselkov A. N. ^1H NMR structure analysis of the interactions of proflavine with self-complementary deoxytetranucleotides of different base sequence // Nucleosides and Nucleotides.—1994.—13.—P. 637—655.
7. Веселков А. Н., Дымант Л. Н., Болотин П. А. и др. Исследование взаимодействия бромистого этидия с дезокситетрарибонуклеозидтрифосфатом $5'$ -d(GCGC) методом ^1H -ЯМР спектроскопии // Молекуляр. биология.—1995.—29.—№ 2.—С. 326—338.
8. Rye H. S., Glazer A. N. Interaction of dimeric intercalating dyes with single-stranded DNA // Nucl. Acids Res.—1995.—23, N 7.—P. 1215—1222.
9. Bailey S. A., Graves D. A., Rill R., Marsch G. Influence of DNA base sequence on binding energetics of actinomycin D // Biochemistry.—1993.—32.—P. 5881—5887.
10. Bailey S. A., Graves D. A., Rill R. Binding of actinomycin D to the T(G)_nT motif of double-stranded DNA. Determination of the guanine requirement in nonclassical, non-GpC binding sites // Ibid.—1994.—33.—P. 11493—11500.

11. Веселков А. Н., Дэвис Д., Дымант Л. Н. и др. 1М- и 2М-¹Н-ЯМР исследование самоассоциации дезокситетрарибонуклеозидтрифосфатов различной последовательности оснований в водном растворе // Биополимеры и клетка.—1991.—7, № 5.—С. 15—22.
12. Веселков А. Н., Дэвис Д., Дымант Л. Н., Паркес Х. Исследование самоассоциации молекул дезокситетрарибонуклеозидтрифосфатов d(ApGpCpT) в водном растворе методом одномерной и двумерной ¹Н ЯМР-спектроскопии // Биофизика.—1993.—38, № 4.—С. 627—635.
13. Веселков А. Н., Дымант Л. Н., Козинцев В. В. и др. Исследование самоассоциации дезокситетрарибонуклеозидтрифосфатов d(TpGpCpA) в водном растворе методом ¹Н ЯМР спектроскопии // Там же.—1995.—40, № 2.—С. 283—292.
14. Reid B. R. Sequence-specific assignment and their use in NMR studies of DNA structure // Quart. Rev. Biophys.—1987.—20.—P. 1—34.
15. Wijmenga S. S., Mooten M. W., Hilbers C. W. NMR of nucleic acids: from spectrum to structure // NMR of macromolecules: A practical approach.— London: Oxf. Univ. press, 1993.—P. 217.
16. Hirao I., Kawai G., Yoshizawa S. Most compact hairpin-turn structure exerted by a short DNA fragment, d(GCGAAGC) in solution: an extraordinarily stable structure resistant to nucleases and heat // Nucl. Acids Res.—1994.—22, N 4.—P. 576—582.
17. Freir S. M., Albergo D. D., Turner D. H. Solvent effects on the dynamics of (dG—dC) // Biopolymers.—1983.—22.—P. 1107—1131.
18. Veselkov A. N., Djimant L. N., Karawajew L. S., Kulikov E. L. Investigation of the aggregation of acridine dyes in aqueous solution by ¹H NMR // Stud. biophys.—1985.—106, N 3.—P. 171—180.
19. Kollman P. A., Weiner P. K., Dearing A. Molecular mechanical studies of proflavine and acridine orange intercalation // Biopolymers.—1981.—20.—P. 258—2597.
20. Marky L. A., Breslauer K. J. Calorimetric determination of base stacking enthalpies in double helical DNA molecules // Ibid.—1982.—21.—P. 2185—2194.
21. Bloomers M. J. J., Haasnot C. A. G., Walters J. A. L. Solution structure of the 3'-5' cyclic dinucleotide d(pApA). Combined NMR, UV melting and molecular mechanics study // Biochemistry.—1988.—27, N 22.—P. 8361—8369.
22. Petersheim M., Turner D. H. Base-stacking and base-pairing contribution to helix stability: thermodynamics of double-helix formation with CCGG, CCGGp, CCGGAp, CCGGUp and ACCGGUp // J. Amer. Chem. Soc.—1983.—22.—P. 256—263.
23. Albergo D. D., Turner D. H., Marky L. A., Breslauer K. J. Thermodynamics of (dG—dC), double-helix formation in water and deuterium oxide // Biochemistry.—1981.—20.—P. 1409—1413.
24. Дымант Л. Н., Веселков А. Н. Исследование самоассоциации дирибонуклеозидмонофосфатов CpG и GpC в водном растворе методом протонного магнитного резонанса // Биофизика.—1988.—33, № 4.—С. 728.