

Термодинамика комплексообразования ароматического лиганда с одноцепочечной последовательностью и петель шпилечной структуры одинакового нуклеотидного состава

С. Ф. Барановский, О. В. Рогова, А. А. Эрнандес Сантьяго¹,
О. С. Завьялова, А. Н. Веселков

Севастопольский национальный технический университет
Студгородок, Севастополь, 99053, Украина

¹ Автономный университет г. Пуэбла
72570, Пуэбла, Мексика

На основе данных ¹H ЯМР спектроскопии (500/600 МГц) проведен сравнительный анализ термодинамических параметров взаимодействия фенантридинового красителя бромистого этидия (EB) с дезоксигептануклеотидом d(GpCpGrArArGrC), способным образовывать в растворе шпилечную структуру, и одноцепочечным дезокситетрануклеотидом d(GrArArG), входящим в качестве составного элемента в структуру гептамера. Термодинамические параметры комплексообразования EB с олигонуклеотидами были рассчитаны с использованием экспериментальных температурных зависимостей химических сдвигов протонов и модели динамического равновесия между различными конформационными формами олигомеров в растворе. В частности, в случае гептамера рассматривали образование мономерной, шпилечной и димерной форм в водном растворе. Расчетные значения энтальпии комплексообразования EB с одноцепочечным тетра-нуклеотидом d(GAAG) в пределах погрешности совпадают с ΔH образования комплекса красителя с петлей шпильки d(GAA). Анализ полученных результатов позволяет сделать вывод о том, что одноцепочечные несомокомплементарные олигонуклеотиды одинакового нуклеотидного состава с петлей шпильки могут быть использованы в качестве модельных систем для исследования комплексообразования ароматических лигандов со шпилечными структурами в растворе.

Введение. Существование неклассических структурных состояний ДНК требует проведения исследований по определению специфичности связывания биологически активных лигандов, в частности интеркаляторов, с такими последовательностями и характера их действия на процессы узнавания нестандартных структур регуляторными белками [1, 2]. Частично несомокомплементарные палиндромные нуклеотидные последовательности могут формировать стабильные шпилечные структуры, являющиеся потенциальными местами узнавания для регуляторных белков в клетке [3–5]. Шпильки состоят

из спирального участка — стебля, образованного в основном Уотсон-Криковскими парами, который замыкается с одного конца петлей из неспаренных оснований. Анализ литературных данных свидетельствует о том, что шпилечные структуры в растворе в присутствии ароматических лигандов еще сравнительно мало изучены. Ранее показано [6, 7], что ароматические лиганды — фенантридиновый краситель бромистый этидий (EB) и феноксазоновый антибиотик актиномицин D — преимущественно интеркалируют в стебель шпилечных структур, при этом сделано предположение, что олигонуклеотиды существуют в растворе только в одном конформационном состоянии в виде шпиль-

© С. Ф. БАРАНОВСКИЙ, О. В. РОГОВА, А. А. ЭРНАНДЕС САНТЬЯГО, О. С. ЗАВЬЯЛОВА, А. Н. ВЕСЕЛКОВ, 2004

ки. Однако ЯМР анализ [8, 9] позволяет сделать вывод о том, что в растворе, содержащем гептамер d(GCGAAGC) и EB, наблюдается равновесие между различными конформациями олигонуклеотидных цепей — однонитчатой, шпильчатой и дуплексной формами гептануклеотида и их комплексами с ароматическим лигандом.

На основании полученных данных можно утверждать, что термодинамические параметры связывания ароматических лигандов с петлей определяются с существенно меньшей точностью, чем со стеблем шпильки в силу больших различий констант образования указанных молекулярных структур [8]. Этот вывод относится и к работе [10], в которой калориметрическими и спектроскопическими методами установлены термодинамические параметры комплексообразования фенантридиновых красителей с петлей и стеблем шпильчатых структур ДНК. Следует при этом отметить, что при комплексообразовании ароматических молекул с петлей шпильки в водном растворе определяющими являются stacking-взаимодействия между хромофором ароматического лиганда и азотистыми основаниями одноцепочечных последовательностей ДНК.

Следовательно, можно предположить, что использование модельных систем — несамодополнительных одноцепочечных последовательностей ДНК одинакового нуклеотидного состава с петлями шпилек позволит получить дополнительную информацию о специфике связывания с ними ароматических лигандов.

В настоящей работе проведено сравнительное исследование комплексообразования дезоксигептануклеотида d(GCGAAGC), образующего стабильную шпильчатую структуру [11], и несамодополнительного дезокситетрануклеотида d(GAAG), являющегося составной частью последовательности гептамера, с фенантридиновым красителем EB в водно-солевом растворе методами одно- и двухмерной ЯМР спектроскопии (500/600 МГц). Сравнительный анализ комплексообразования петли шпильки и одноцепочечного олигомера одинакового нуклеотидного состава с EB важен для выяснения физической природы специфики связывания ароматических биологически активных молекул со шпильчатыми структурами в водном растворе.

Материалы и методы. Дезокситетрануклеотид 5'-d(GpApApG) и дезоксигептануклеотид 5'-d(GpCpGpApApGpC) синтезированы компанией «Oswel DNA Service» (Великобритания). Бромистый этидий («Sigma», США), структурная формула которого представлена на рис. 1, использовали без дополнительной очистки. Образцы растворяли в

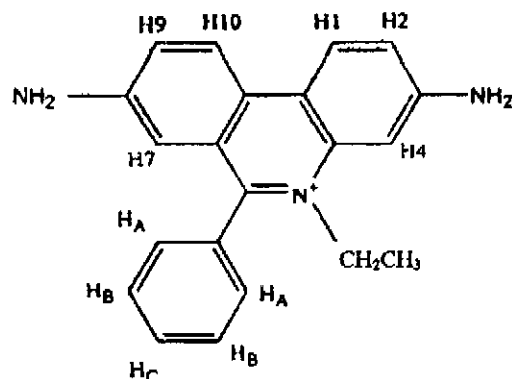


Рис. 1. Структурная формула молекулы бромистого этидия с указанием обменивающихся протонов

D₂O с изотопной чистотой 99,95 % («Sigma») и лиофилизировали. Растворы готовили, добавляя взвешенное количество лиганда в дейтерированный 0,1 М фосфатный буфер (pD 7,1). Концентрацию красителя определяли спектрофотометрически, используя коэффициент молярной экстинкции $\epsilon = 5860 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ($\lambda = 480 \text{ nm}$) [12]. Одномерные ¹H ЯМР спектры измеряли на импульсных спектрометрах с резонансной частотой 500 МГц («JEOL GSX 500», «Bruker DRX 500»), двухмерные гомоядерные спектры (2M-COSY, 2M-TOCSY, 2M-NOESY и 2M-ROESY) — на спектрометрах «Bruker DRX» (500 МГц) и «Bruker AMX» (600 МГц). При концентрационных исследованиях содержание красителя в растворе поддерживали постоянным, добавляя последовательно свежеприготовленный раствор лиганда определенной концентрации в исходную смесь олигонуклеотида и красителя. Температурные зависимости химических сдвигов протонов регистрировали при постоянном составе раствора. Температуру образцов стабилизировали с погрешностью $\pm 1 \text{ K}$ с помощью терморегулятора BVT-3000 или «JEOL NM-GVT 3».

Все ЯМР эксперименты выполнены в условиях быстрого химического обмена взаимодействующих молекул во временном масштабе ЯМР. Протонные химические сдвиги измеряли относительно внутреннего стандарта — TMA, поскольку его сигнал практически не зависит от pH и температуры в водных растворах олигонуклеотидов [13]. Измерения проводили в стандартных ампулах с внешним диаметром 5 мм, минимальный объем раствора — 0,5 мл.

Результаты и обсуждение. Ранее нами изучено равновесное поведение дезоксиолигонуклеотидов d(GCGAAGC) и d(GAAG), а также красителя EB в водно-солевом растворе методом 1M и 2M ¹H ЯМР спектроскопии [8, 9, 14, 15]. Молекулярное равно-

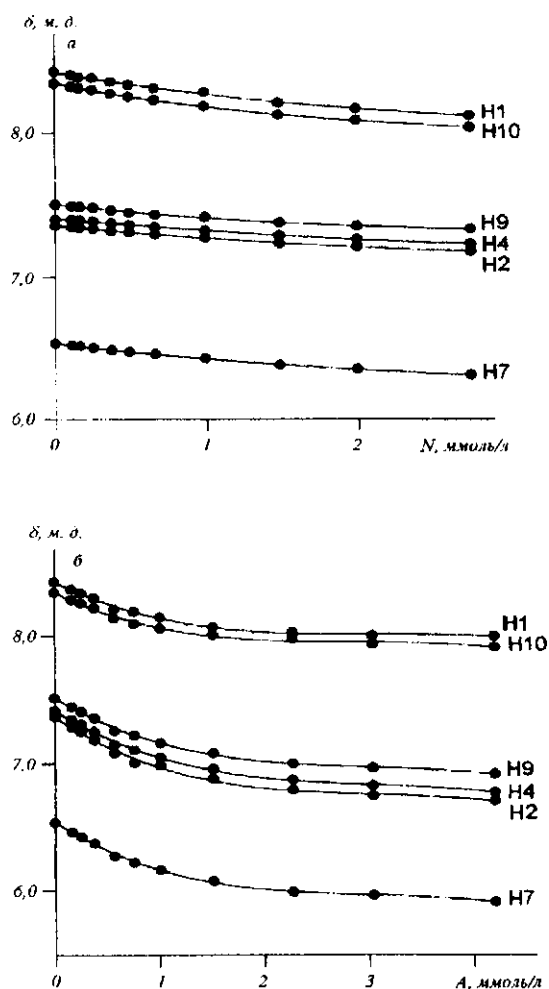


Рис. 2. Экспериментальные зависимости химических сдвигов протонов бромистого этидия от концентрации дезокситетрануклеотида 5'-d(GpApApG) (а) и дезоксигептануклеотида 5'-d(GpCpGpApApGpC) (б) при постоянной концентрации красителя ($D_0 = 1,15$ ммоль/л), $T = 298$ К)

весие «краситель—олигонуклеотид» в растворе анализировали на основе изучения экспериментальных концентрационных и температурных зависимостей химических сдвигов протонов молекул EB. Полное отнесение сигналов необменивающихся с растворителем протонов взаимодействующих молекул в смешанном растворе дезоксиолигонуклеотидов и красителя выполнено с использованием двухмерной корреляционной ^1H ЯМР спектроскопии (2M-TOCSY и 2M-NOESY).

Сравнение значений протонных химических сдвигов олигомеров показывает довольно большие различия в резонансах протонов дезоксирибозных колец гептамера и тетрамера, особенно для нукле-

озидов, формирующих шпильчную структуру. По-видимому, образование шпильки путем складывания цепи самой на себя приводит к достаточно напряженной структуре сахарофосфатного остова в области петли, что вызывает существенные различия в положениях резонансов протонов сахарных колец в сравнении с наблюдаемыми для линейной структуры некомплементарного одноцепочечного дезокситетрануклеотида. В спектре 2M-NOESY практически не наблюдаются кросс-пики NOE между протонами ароматического красителя и гептамера. Можно лишь отметить кросс-пики NOE малой интенсивности между *para*-, *meta*-протонами красителя и протонами дезоксирибозы H1' (C2) цитозина гептамера. Отсутствие, а точнее сказать, пренебрежимо малая интенсивность кросс-пигов NOE между протонами красителя и гептамера может быть обусловлена относительно большими расстояниями между протонами красителя и дезоксигептануклеотида в месте интеркаляционного связывания лиганда и сложным динамическим равновесием взаимодействующих молекул и их комплексов [16].

Данные двухмерной ЯМР спектроскопии позволяют утверждать, что GC-сайты в последовательности d(GCGAAGC) являются местами преимущественного связывания красителя с гептамером. В 2M-NOE спектре раствора красителя с некомплементарным дезокситетрануклеотидом d(GAAG), соответствующим внутреннему участку цепи гептамера, отсутствуют кросс-пики между красителем и тетрамером. Это может быть обусловлено сложным динамическим равновесием взаимодействующих молекул и их комплексов, приводящим к относительно малому процентному содержанию любого типа комплекса, образующегося в растворе.

Экспериментальные концентрационные зависимости химических сдвигов EB в смешанном растворе с рассматриваемыми олигонуклеотидами приведены на рис. 2. Анализ кривых свидетельствует о качественно различном характере изменения химических сдвигов протонов красителя в растворе с тетрамером и гептамером в аналогичных экспериментальных условиях. В случае комплексообразования красителя с гептамером наблюдается более резкая зависимость кривых в области малых концентраций (< 1 ммоль/л), чем при связывании с тетрамером. Эксперимент свидетельствует о монотонном уменьшении химических сдвигов красителя при увеличении концентрации тетрауклеотида в растворе во всем исследованном диапазоне концентраций (рис. 2). Последнее, по-видимому, объясняется тем, что комплексы EB с одноцепочечным

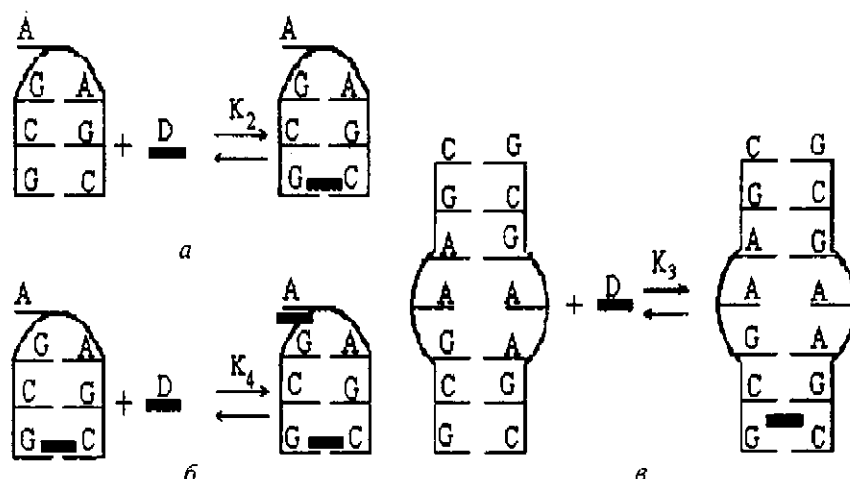
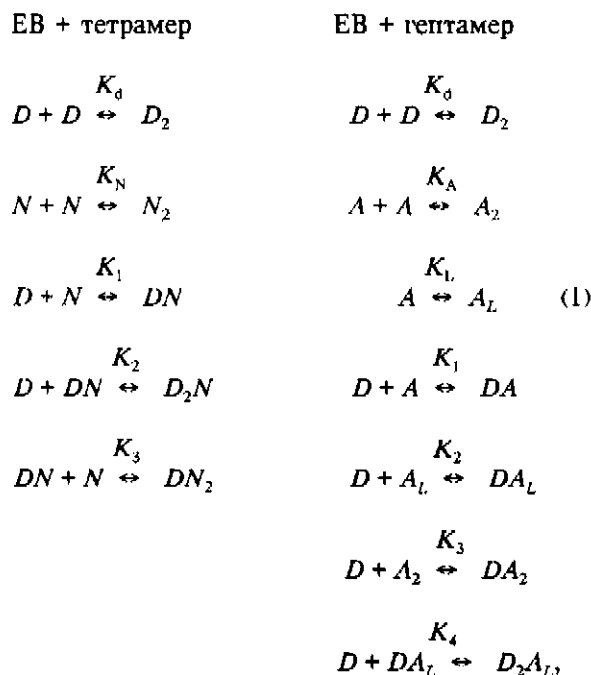


Рис. 3. Схематическое представление реакций образования комплексов бромистого этидия (EB) с дезоксигептануклеотидом 5'-d(GpCpGpApGpC): а — 1:1 комплекс EB со шпилькой; б — 2:1 комплекс EB со шпилькой; в — 1:2 комплекс EB с димером дезоксигептануклеотида

несамокомплементарным дезокситетрануклеотидом обладают существенно большими степенями свободы в сравнении с комплексами красителя с палиндромной последовательностью гептамера. Учитывая особенности процессов комплексообразования молекул, для количественного анализа взаимодействия красителя с некомплементарным дезокситетрануклеотидом и частично комплементарным дезоксигептануклеотидом были рассмотрены следующие схемы образования молекулярных ассоциатов в растворе:



где D , N и A соответствуют мономеру лиганда, тетра- и гептануклеотида и дезоксигептануклеотида; K_D , K_A , K_N , K_L — равновесные константы реакций димеризации красителя (D_2), образования димерного ком-

плекса гептамера (A_2), димерного комплекса тетрамера (N_2) и шпильки (A_L) соответственно. В первой схеме K_1 , K_2 и K_3 — константы реакций образования комплексов 1:1 (DN), 2:1 (D_2N) и 1:2 (DN_2) красителя с тетрамером. В схеме «EB + гептамер» K_1 , K_2 , K_3 , K_4 — константы реакций образования комплексов молекулы красителя с мономером (DA), шпилькой (DA_L), димером (DA_2) и двух молекул красителя со шпилькой (D_2A_L) гептамера соответственно. Схематическое представление реакций образования комплексов лиганда с димером и шпилькой гептануклеотида приведено на рис 3.

Для описания экспериментальных значений протонных химических сдвигов использовали аддитивную модель [8, 16, 17]. В случае системы «EB + тетрамер»:

$$\delta = D/D_0(\delta_m + 2K_D D \delta_d + K_1 N \delta_1 + 2K_1 K_2 DN \delta_2 + K_1 K_3 N^2 \delta_3), \quad (2)$$

где D_0 — исходная молярная концентрация красителя; D и N — равновесные молярные концентрации мономеров EB и тетра- и гептануклеотида; δ_m , δ_d , δ_1 , δ_2 , δ_3 — протонные химические сдвиги молекулы красителя в мономерной, димерной формах и в составе комплексов 1:1 (DN), 2:1 (D_2N) и 1:2 (DN_2) соответственно. Величины δ_m и δ_d определены ранее [15] при исследовании самоассоциации EB исходя из концентрационных зависимостей протонных химических сдвигов красителя в аналогичных экспериментальных условиях.

Модель для химических сдвигов протонов красителя в системе «EB + гептамер» имеет вид:

$$\delta = D/D_0(\delta_m + 2K_D D \delta_d + K_1 A \delta_1 + K_L K_2 A \delta_2 + K_A K_3 A^2 \delta_3 + 2K_L K_2 K_4 DA \delta_4), \quad (3)$$

где δ_1 , δ_2 , δ_3 , δ_4 — химические сдвиги протонов

Таблица 1

Расчетные значения параметров (δ , м. д. и K , 10^3 л/моль) комплексообразования бромистого этидия (ЕВ) с дезокситетрануклеотидом 5'-d(GpApApG) и дезоксигептануклеотидом 5'-d(GpCpGpApApGpC) в 0,1 М фосфатном буфере, рD = 7,1

Протон	δ_1	δ_2	δ_3	δ_4	δ_m	K_1	K_2	K_3	K_4
<i>T = 298 K</i>									
<i>5'-d(GpApApG) + EB</i>									
H1	8,03	8,15	7,98	—	8,69	—	—	—	—
H10	8,00	8,06	7,92	—	8,63	—	—	—	—
H9	7,34	7,36	7,25	—	7,66	$2,0 \pm 0,47$	$1,75 \pm 0,35$	$1,13 \pm 1,32$	—
H4	7,08	7,32	7,20	—	7,55	—	—	—	—
H2	7,15	7,26	7,14	—	7,48	—	—	—	—
H7	6,04	6,46	6,31	—	6,67	—	—	—	—
<i>5'-d(GpCpGpApApGpC) + EB</i>									
H1	7,89	8,10	7,93	7,48	8,68	—	—	—	—
H10	7,69	7,99	7,53	7,55	8,62	—	—	—	—
H9	7,31	6,97	6,51	6,61	7,66	$11,7 \pm 1,7$	$3,9 \pm 1,4$	$17,7 \pm 1,9$	$0,51 \pm 0,2$
H4	7,18	6,70	6,63	6,40	7,55	—	—	—	—
H2	7,16	6,65	6,49	6,66	7,48	—	—	—	—
H7	6,37	5,92	5,49	5,26	6,67	—	—	—	—
<i>T = 308 K</i>									
<i>5'-d(GpApApG) + EB</i>									
H1	8,02	8,14	7,99	—	8,69	—	—	—	—
H10	8,10	8,00	7,93	—	8,63	—	—	—	—
H9	7,35	7,40	7,26	—	7,66	$1,1 \pm 0,4$	$0,71 \pm 0,25$	$0,71 \pm 0,21$	—
H4	7,04	7,30	7,26	—	7,55	—	—	—	—
H2	7,21	7,29	7,19	—	7,48	—	—	—	—
H7	6,09	6,40	6,39	—	6,67	—	—	—	—
<i>5'-d(GpCpGpApApGpC) + EB</i>									
H1	7,90	8,12	7,91	7,43	8,68	—	—	—	—
H10	7,68	8,00	7,58	7,56	8,62	—	—	—	—
H9	7,30	6,97	6,57	6,68	7,66	$5,3 \pm 1,1$	$2,1 \pm 1,0$	$7,1 \pm 0,9$	$0,25 \pm 0,1$
H4	7,25	6,71	6,61	6,41	7,55	—	—	—	—
H2	7,21	6,64	6,44	6,63	7,48	—	—	—	—
H7	6,36	5,95	5,48	5,24	6,67	—	—	—	—

лиганда в составе комплексов 1:1 с мономером (AD) и шпилькой ($A_L D$), комплекса 1:2 с димером гептануклеотида ($A_2 D$) и в комплексе 2:1 со шпилькой ($A_L D_2$) соответственно.

Наблюдаемый химический сдвиг δ в первом случае является функцией неизвестных $\delta_1 + \delta_3$, $K_1 + K_3$, а во втором — $\delta_1 + \delta_4$ и $K_1 + K_4$. При определении параметров комплексообразования молекул

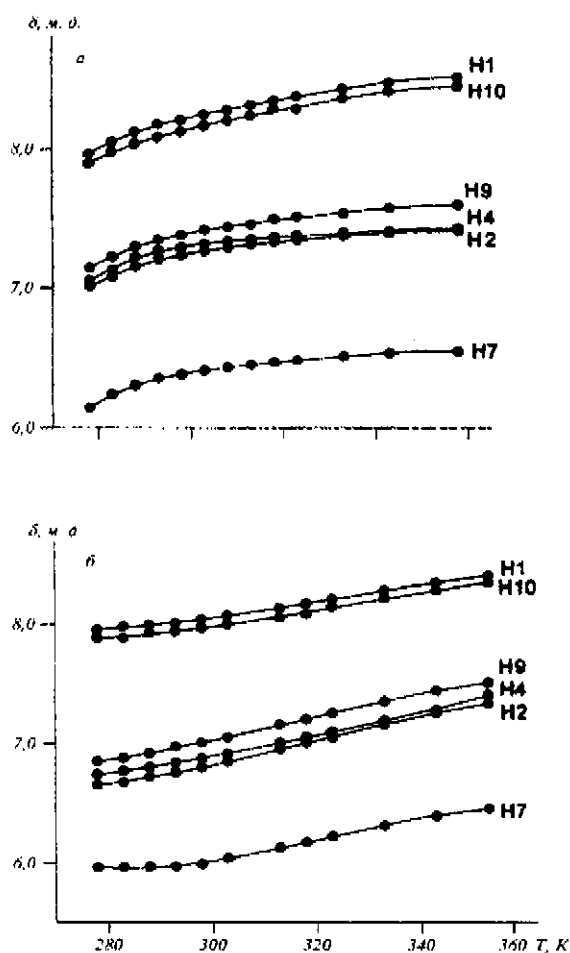


Рис. 4. Экспериментальные зависимости химических сдвигов протонов бромистого этидия от температуры в растворе красителя с дезоксиолигонуклеотидами: а — 5'-d(GpApApG) ($D_0 = 1,15$ ммоль/л, $N_0 = 1,48$ ммоль/л); б — 5'-d(GpCpGpApApG) ($D_0 = 1,15$ ммоль/л, $A_0 = 2,28$ ммоль/л)

учитывали законы сохранения массы и действующих масс для реакций (1) в растворе. Вычислительная процедура нахождения параметров модели, основанная на минимизации квадратичного функционала невязки с использованием экспериментальных концентрационных зависимостей химических сдвигов различных протонов красителя, достаточно подробно описана в [16, 18]. Расчетные значения констант образования комплексов EB с олигомерами ДНК и предельные значения химических сдвигов, позволяющие выявить структурные особенности молекулярных ассоциатов, приведены в табл. 1 при двух температурах.

Важно отметить, что равновесная константа K_2 образования 1:1 комплекса EB со шпилькой меньше констант K_1 и K_3 , соответствующих формированию 1:1 и 1:2 комплексов красителя с мономерной и димерной формами гептамера. Очевидно, связывание ароматического лиганда с исключительно компактной шпильчатой структурой d(GCGAAGC) существенно меньше, чем с конформационно более объемными структурами мономера и димера гептамера. Константы K_1 и K_3 комплексообразования EB с мономером и димером дезоксигептануклеотида находятся в хорошем согласии с аналогичными константами связывания красителя с GC-сайтом одно- и двухцепочечного дезокситетрануклеотида d(AGCT) [19]. Значение константы $K_4 = (0,51 \pm \pm 0,16) \cdot 10^3$ л/моль показывает, что вероятность образования в растворе 2:1 комплекса EB со шпилькой значительно ниже, чем 1:1 комплекса, т. е. связывание второй молекулы красителя со шпилькой имеет явно антикооперативный характер. Если предположить интеркаляцию первой молекулы EB в GC-сайт стебля, то вторая молекула, по всей вероятности, встраивается в петлю шпильки и стабилизируется за счет стэкинг-взаимодействия с неспаренным основанием аденина (A4) и основанием гуанина (G3) (рис. 3).

Эти результаты согласуются с выводами работ [10, 20], из которых следует, что константы связывания EB со стеблем в шпильках d(GCGCT_nGCGC) примерно на порядок больше, чем с петлями (T_n), содержащими различное количество ($n = 3, 5, 7$) тиминов в цепи, при этом стабилизация комплекса красителя с петлей происходит за счет стэкинг-взаимодействия между основаниями тиминов и хромофором красителя.

Термодинамические параметры определяли на основе температурных зависимостей химических сдвигов протонов EB в смешанном растворе с олигонуклеотидами (рис. 4). Из данных рис. 4 видно, что температурные зависимости, так же как и концентрационные, качественно различны для систем «EB + тетрамер» и «EB + гептамер», что, очевидно, связано с различной стабильностью молекулярных комплексов красителя с исследованными олигонуклеотидами в водном растворе. Расчет термодинамических параметров (энтропии и энтальпии) проводили с использованием соотношений (2) и (3), где константы равновесия учитывали в виде функции параметров ΔH и ΔS [16, 17]:

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

При этом предполагается, что величины ΔH и ΔS не зависят существенно от температуры в

Таблица 2

Термодинамические параметры ΔG , ΔH (кДж/моль) и ΔS (Дж/(моль·К)) комплексообразования бромистого этидия с дезоксигептануклеотидом 5'-d(GpCpGpApApGpC) и дезокситетрануклеотидом 5'-d(GpApApG) в 0,1 М фосфатном буфере, рН = 7,1

Реакции комплексообразования	$-\Delta G^0$	$-\Delta H^0$	$-\Delta S^0$
<i>5'-d(GpCpGpApApGpC) + EB</i>			
K_1 $D + A \leftrightarrow DA$	23,2±0,3	61±8	125±24
K_2 $D + A_1 \leftrightarrow DA_1$	20,5±0,7	48±7	93±22
K_3 $D + A_2 \leftrightarrow DA_2$	24,2±0,3	70±4	152±13
K_4 $D + DA_1 \leftrightarrow D_2A_1$	15,4±0,7	38±10	75±134
<i>5'-d(GpApApG) + EB</i>			
K_1 $D + N \leftrightarrow DN$	18,7±0,9	45±9	105±30

исследованном температурном диапазоне. Термодинамические параметры самоассоциации красителя (ΔH_d , ΔS_d) и олигонуклеотида (ΔH_N , ΔS_N) определены исходя из независимых исследований термодинамики самоассоциации этих молекул в тех же экспериментальных условиях [9, 14, 15].

Расчетные значения термодинамических параметров различных реакций комплексообразования EB с несамодоплементарным дезоксигептануклеотидом и реакции образования доминирующего в растворе комплекса 1:1 EB с дезокситетрануклеотидом представлены в табл. 2. Следует отметить, что термодинамические параметры могут быть оценены также исходя из значений равновесных констант комплексообразования молекул при двух температурах (табл. 1). Полученные значения ΔH и ΔS , рассчитанные двумя способами, совпадают в пределах ошибки их определения. Из данных табл. 2 видно, что реакции комплексообразования EB с дезоксиолигонуклеотидами являются экзотермическими, но абсолютные значения энтальпий этих реакций существенно различаются.

Наблюдаемые различия в значениях параметров могут быть обусловлены несколькими факторами, в том числе межмолекулярные физические взаимодействия (водородные связи, гидрофобные, Ван-дер-Ваальсовы и электростатические взаимодействия), конформационные изменения в олигонуклеотидах, высвобождение протонов или протонов и изменения гидратации при связывании молекул [21]. Значения ΔH_2 и ΔH_4 образования

комплексов EB соответственно со стеблем и петлей шпильки дезоксигептануклеотида d(GCGAAGC) находятся в хорошем согласии с результатами оптических и калориметрических исследований комплексообразования красителя со шпильками d(GCGCT_nGCGC), в стебель которых входят четыре G·C-пары и различное число тиминных остатков в петле [10, 20]. Энтальпия комплексообразования EB с димером гептамера 5'-d(GCGAAGC) в пределах погрешности согласуется с таковой красителя с самокомплементарными дезокситетрануклеотидами в аналогичных экспериментальных условиях [19].

Следует отметить, что образование в димере дезоксигептануклеотида неправильных нуклеотидных пар (A·G), рассмотренное в [11], по-видимому, сказывается на энергетике комплексообразования красителя. Величины энтропии взаимодействия одной и двух молекул EB, ΔS_2 и ΔS_4 со шпилькой дезоксигептануклеотида d(GCGAAGC) существенно меньше по абсолютной величине, чем ΔS_1 и ΔS_3 для реакций связывания красителя с мономером и димером гептамера (табл. 2). Положительный энтропийный вклад, прежде всего, определяется гидрофобным взаимодействием, связанным с переносом молекулы красителя в место интеркаляции. По-видимому, гидрофобные взаимодействия в компактной шпильчатой структуре играют большую роль при связывании ароматического лиганда в сравнении с мономерной и димерной формами дезоксигептануклеотида в водном растворе.

Из данных табл. 2 видно, что значения термодинамических параметров образования комплекса 1:1 EB с дезокситетрануклеотидом и комплекса красителя с петлей шпильки (реакция $D + DA_n \rightleftharpoons D_2A_n$) совпадают в пределах погрешности их определения. Это, очевидно, объясняется тем, что такие молекулярные комплексы стабилизируются, главным образом, за счет стэкинг-взаимодействий хромофора феноантридинового красителя и ароматических азотистых оснований в одноцепочечной последовательности. Следовательно, можно сделать вывод о том, что конформация одноцепочечной последовательности оказывает существенно меньшее влияние на характеристики связывания с ароматическим лигандом в сравнении с олигонуклеотидным дуплексом. Таким образом, одноцепочечные несамокомплементарные олигонуклеотиды одинакового нуклеотидного состава с петлей шпильки могут быть использованы в качестве модельных систем для исследования комплексообразования ароматических лигандов со шпильчатыми структурами в водном растворе.

S. F. Baranovsky, O. V. Rogova, A. A. Hernandez Santiago, O. S. Zavyalova, A. N. Veselkov

Thermodynamics of complexation of aromatic ligand with single-stranded deoxyoligonucleotide and a hairpin loop of the same nucleotide content

Summary

Comparative analysis of the thermodynamical parameters of interaction of phenanthridine dye, ethidium bromide (EB) with deoxyheptanucleotide $d(GpCpGpApApGpC)$, capable to form a hairpin structure, and a single-stranded deoxytetranucleotide $d(GpApApG)$, being a component element of the heptamer sequence, has been made using 1H NMR spectroscopy (500/600 MHz). Thermodynamical parameters (ΔH , ΔS) of complexation of EB with oligonucleotides have been calculated from the experimental temperature dependences of proton chemical shifts using a model of dynamic equilibrium between different conformational states of oligomers in solution. For example, monomer, hairpin and dimer forms have been considered as the heptamer conformational states in aqueous solution. The calculated enthalpy of complexation of EB with single-stranded tetranucleotide $d(GAAG)$ is similar, within the error limits, to the value of complex formation between the dye molecule and the hairpin loop $d(GAA)$. Analysis of the results obtained enables to conclude that single-stranded non-self-complementary oligonucleotides of the same nucleotide content as in the hairpin loop may be used as model systems for the investigation of complexation of aromatic ligands with hairpin structures in solution.

С. Ф. Барановський, О. В. Рогова, А. А. Ерна́ндес Сантьяго, О. С. Зав'ялова, А. Н. Веселков

Термодинаміка комплексоутворення ароматичного ліганду з одноланцюговою послідовністю і петлею шпилькової структури однакового нуклеотидного складу

Резюме

На основі даних 1H ЯМР спектроскопії (500/600 МГц) здійс-

нено порівняльний аналіз термодинамічних параметрів взаємодії феноантридинового барвника бромистого етидію (БЕ) з дезоксигептануклеотидом $d(GpCpGpApApGpC)$, здатним формувати в розчині шпилькову структуру, та одноланцюговим дезокситетрануклеотидом $d(GpApApG)$, який є складовим елементом структури гептамеру. Термодинамічні параметри комплексоутворення БЕ з олигонуклеотидами розраховували з використанням експериментальних температурних залежностей хімічних зсувів протонів і моделі динамічної рівноваги між різними конформаційними формами олигомерів у розчині. Зокрема, у випадку гептамеру розглянуто утворення мономерної, шпилькової і димерної форм у водному розчині. Розрахункові значення ентальпії комплексоутворення БЕ з одноланцюговим тетра-нуклеотидом $d(GAAG)$ у межах похибок збігаються з ΔH формування комплексу барвника з петлею шпильки $d(GAA)$. Аналіз отриманих результатів дозволяє зробити висновок стосовно того, що одноланцюгові несамокомплементарні олигонуклеотиди однакового нуклеотидного складу з петлею шпильки можуть бути використані як модельні системи для дослідження комплексоутворення ароматичних лігандів із шпильковими структурами у розчині.

СІНІСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Bianchi M. E., Beltrame M., Paonessa G. Specific recognition of cruciform DNA by nuclear protein HMG1 // Science. — 1989. — 243. — P. 1056—1059.
2. Duckett D. R., Murchie A. J. H., Bhattacharya A., Clegg R. M., Diekmann S., von Kitzig F., Lilley D. M. J. The structure of DNA junctions and their interactions with enzymes // Eur. J. Biochem. — 1992. — 207. — P. 285—295.
3. Spiro C., Richards J. P., Chandrasekaran S., Brennan R. G., McMurray C. T. Secondary structure creates mismatched base pairs required for high-affinity binding of cAMP response element-binding protein to the human enkephalin enhancer // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1993. — 90. — P. 4606—4610.
4. Miao D.-M., Honda Y., Tanaka K., Higashi A., Nakamura T., Taguchi Y., Sakai H., Komano T., Bagdasarian M. A base-paired hairpin structure essential for the functional priming signal for DNA replication of the broad host range plasmid RSF 1010 // Nucl. Acids Res. — 1993. — 21. — P. 4900—4903.
5. Froelich-Ammon S. J., Gale K. C., Osheroff N. Site-specific cleavage of a DNA hairpin by topoisomerase II: DNA secondary structure as a determinant of enzyme recognition cleavage // J. Biol. Chem. — 1994. — 269. — P. 7719—7725.
6. Chou S.-H., Zhu L., Gao Z., Cheng J.-W., Reid B. R. Hairpin loops consisting of single adenine residues closed by sheared A:A and G:G pairs formed by the triplets AAA and GAG: solution structure of the $d(GTACAAAGTAC)$ hairpin // J. Mol. Biol. — 1996. — 264. — P. 981—1001.
7. Brown D. R., Kurz M., Kearns D. R., Hsu V. L. Formation of multiple complexes between actinomycin D and a DNA hairpin: structural characterization by multinuclear NMR // Biochemistry. — 1994. — 33. — P. 651—664.
8. Davies D. B., Pahomov V. I., Veselkov A. N. NMR determination of the conformational and drug binding properties of the DNA heptamer $d(GpCpGpApApGpC)$ in aqueous solution // Nucl. Acids Res. — 1997. — 25. — P. 4523—4531.
9. Веселков А. Н., Пахомов В. И., Барановский С. Ф., Дэвис Д. Б. Анализ конформационных состояний палиндромной последовательности $d(GpCpGpApApGpC)$ в водном растворе методом 1H -ЯМР спектроскопии // Молекуляр. биология. — 1997. — 31. — С. 884—891.
10. Rentzeperis D., Medero M., Marky L. A. Thermodynamic investigation of the association of ethidium, propidium and bisethidium to DNA hairpin // Bioorg. Med. Chem. — 1995. — 3. — P. 751—759.

11. Hirao I., Kawai G., Yoshizawa S., Nishimura Y., Ishido Y., Watanabe K., Miura K. Most compact hairpin-turn structure exerted by a short DNA fragment, d(GCGAAGC) in solution: an extraordinary stable structure resistant to nucleases and heat // Nucl. Acids Res.—1994.—22.—P. 576—582.
12. Reinhardt C. G., Krugh T. R. A comparative study of ethidium bromide complexes with dinucleotides and DNA: Direct evidence for intercalation and nucleic acid sequence preferences // Biochemistry.—1978.—17.—P. 4845—4854.
13. Altona C., van Boom J. H., Haasnoot C. A. C. Conformational analysis of a DNA triplet in aqueous solution: thymidyl-(3'-5')-2'-deoxyadenosine d(T-T-A), studied by ^1H NMR at 360 MHz // Eur. J. Biochem.—1976.—71.—P. 557—565.
14. Веселков А. Н., Барановский С. Ф., Петренко Н. В., Остров С. Г., Веселков Д. А., Дымант Л. Н., Тагер А., Паркес Х., Дэвис Д. Исследование самоассоциации молекул некомplementарных дезокситетрануклеотидов различной последовательности оснований в водном растворе методом ^1H -ЯМР спектроскопии // Биополимеры и клетка.—1996.—12, № 4.—С. 27—34.
15. Веселков А. Н., Дымант Л. Н., Барановский С. Ф., Болотин П. А., Паркес Х. Е., Дэвис Д. Исследование самоассоциации бромистого этидия в водном растворе методом ^1H -ЯМР спектроскопии // Хим. физика.—1994.—13.—С. 70—78.
16. Davies D. B., Veselkov A. N. Structural and thermodynamical analysis of molecular complexation by ^1H NMR spectroscopy: intercalation of ethidium bromide with the isomeric deoxytetranucleosides 5'-d(GpCpGpC) and 5'-d(CpGpCpG) in aqueous solution // J. Chem. Soc. Faraday Trans.—1996.—9.—P. 3545—3557.
17. Davies D. B., Baranovsky S. F., Veselkov A. N. Structural and thermodynamical analysis of drug binding to single-stranded DNA oligomers. Self-association of non-self-complementary deoxytetranucleotides of different base sequence and their complexation with ethidium bromide in aqueous solution // J. Chem. Soc. Faraday Trans.—1997.—93.—P. 1559—1572.
18. Veselkov A. N., Djimant L. N., Kurawajew L. S., Kulikov E. L. Investigation of the aggregation of acridine dyes in aqueous solution by ^1H NMR // Stud. biophys.—1985.—120.—P. 171—180.
19. Davies D. B., Djimant L. N., Baranovsky S. F., Veselkov A. N. ^1H NMR determination of drug complexation with single-stranded oligonucleotides in solution: ethidium bromide complexation with the deoxytetranucleosides 5'-d(ApCpGpTp), 5'-d(ApGpCpTp) and 5'-d(TpGpCpAp) // Biopolymers.—1997.—42.—P. 285—295.
20. Rentzeperis D., Alessi K., Marky L. A. Thermodynamics of DNA hairpins: contribution of loop size to hairpin stability and ethidium binding // Nucl. Acids Res.—1993.—21.—P. 2683—2689.
21. Chaires J. B. Thermodynamics of the daunomycin-DNA interaction: ionic strength dependence of enthalpy and entropy // Biopolymers.—1985.—24.—P. 403—419.

УДК 577.113

Надійшла до редакції 20.12.02