

АНАЛИЗ АССОЦИИ ДНК С ГЕТЕРОКОМПЛЕКСОМ ТИАЗОТРОПСИНА А И Б МЕТОДОМ ЯМР-СПЕКТРОСКОПИИ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ

Головченко И.В., Скуратовская И.В., Якимова К.В., Евстигнеев М.П.
ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет»
ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, РФ
e-mail: golovchenko.igor1991@gmail.com

Аннотация. В рамках анализа данных ЯМР-спектроскопии, а именно зависимости химического сдвига от концентрации растворённых веществ, а также двумерных [^1H ; ^1H] NOESY спектров, различных комбинаций комплексов MGB лигандов тиазотропсина А и тиазотропсина В, а также дуплексного олигонуклеотида, имеющего сайты связывания для лигандов каждого типа, были последовательно определены константы само- и гетероассоциации компонентов, а также выдвинуто предположение о преассоциативном характере связывания гомодимеров лигандов с ДНК.

Ключевые слова: MGB лиганд, ДНК, комплексообразование, трёхкомпонентные системы.

ANALYSIS OF THE DNA ASSEMBLY WITH THE THIAZOTROPSIN A AND B HETEROCOMPLEX BY HIGH RESOLUTION NMR SPECTROSCOPY

Golovchenko I.V., Skuratovskaya I.V., Yakimova K.V., Evstigneev M.P.
Sevastopol State University
Universitetskaya St., 33, Sevastopol, 299053, Russia

Abstract. The analysis of NMR spectroscopy data: dependence of chemical shift on the concentration of dissolved substances and [^1H ; ^1H] NOESY spectra, of various combinations of MGB ligands Thiazotropsin A and B and the duplex oligonucleotide, having binding sites for the ligands of each type, allowed to determine the constants of self- and hetero-aggregation, and also it was suggested the nature of preassemble way of ligand homodimers binding DNA.

Key words: MGB ligand, DNA, complexation, three-component system.

В настоящее время с целью достижения специфического взаимодействия с малой канавкой в А-Т последовательностях нуклеиновых кислот открыто или синтезировано значительное количество новых соединений (MGB лиганды). Эти соединения имеют несколько общих признаков. Они состоят из ароматических колец, имеют общую изогнутую геометрическую форму, совпадающую с формой малой канавки ДНК, а также имеют водородные доноры на внутренней границе [1]. Дистамицин и нетропсин являются классическими примерами соединений естественного происхождения в этой категории, в то время как тиазотропсин А и Б (см. рис. 1) являются примерами искусственно синтезированных молекул. Потребность в синтезе новых MGB лигандов вызвана необходимостью селективности связывания, то есть каждый лиганд наиболее оптимально связывается со своей уникальной последовательностью нуклеотидов, а также в устранении негативных последствий (цитотоксичность и др.) введения в организм, которыми в частности обладают природные представители данного класса препаратов.

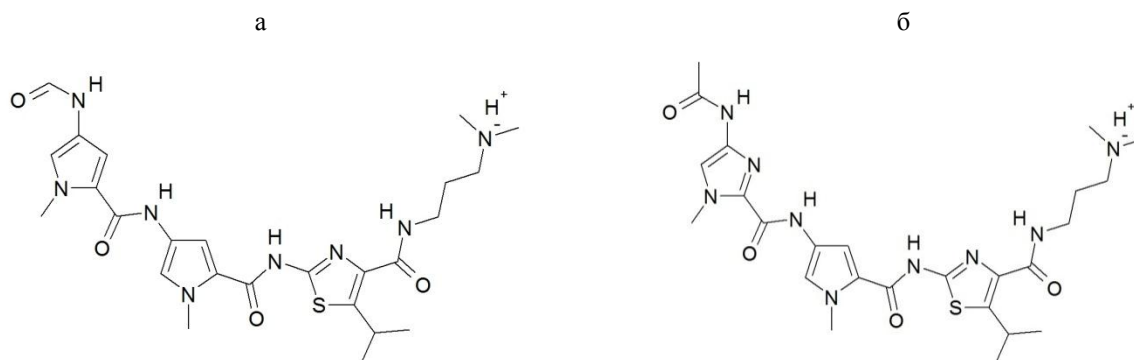


Рисунок 1 – Структурные формулы: а – тиазотропсин А; б – тиазотропсин Б

Методика проведения эксперимента. Рассматриваемые комплексы исследовались на основании анализа одно- и двумерных ЯМР спектров, полученных на спектрометре BrukerAV600. Соответствующие спектры снимались для растворов на основе D_2O , а также смеси H_2O и D_2O (в соотношении 9 к 1), при температуре 298 К.

Для определения констант самоассоциации лигандов (тиазотропсина А и Б) в водном растворе были приготовлены образцы для исследования, аналогичные описанным ранее в работе [2]. Последовательная серия разбавлений производилась в диапазоне концентраций от 5 до 0.1 мМ, сопровождаемая снятием одномерных ^1H ЯМР на каждом шаге титрования на тех же самых значениях концентрации растворённого лиганда, что и в работе [2].

Наличие само- и гетероассоциатов обусловлено, в основном, гидрофобными взаимодействиями за счёт того, что образуется антипараллельный димер, при этом циклические структуры одной молекулы находятся над амидными соединениями второй, в таком положении метильные группы на ароматических кольцах плотно упаковываются.

Для анализа гетероассоциации лигандов 3 мл раствора тиазотропсина А в D₂O при концентрации 0.5 мМ были приготовлены вместе с 550 мкл раствора тиазотропсина Б в D₂O при концентрации 4.0 мМ с добавлением 5 мкл 10-молярного раствора TSP в качестве эталона. Концентрация тиазотропсина Б уменьшалась с 4.0 мМ до 1.0 мМ с шагом в 0.5 мМ, а затем до 0.1 мМ с шагом в 0.1 мМ выдерживая при этом постоянную концентрацию тиазотропсина А. В каждой точке разбавления снимались одномерные ¹H ЯМР спектры.

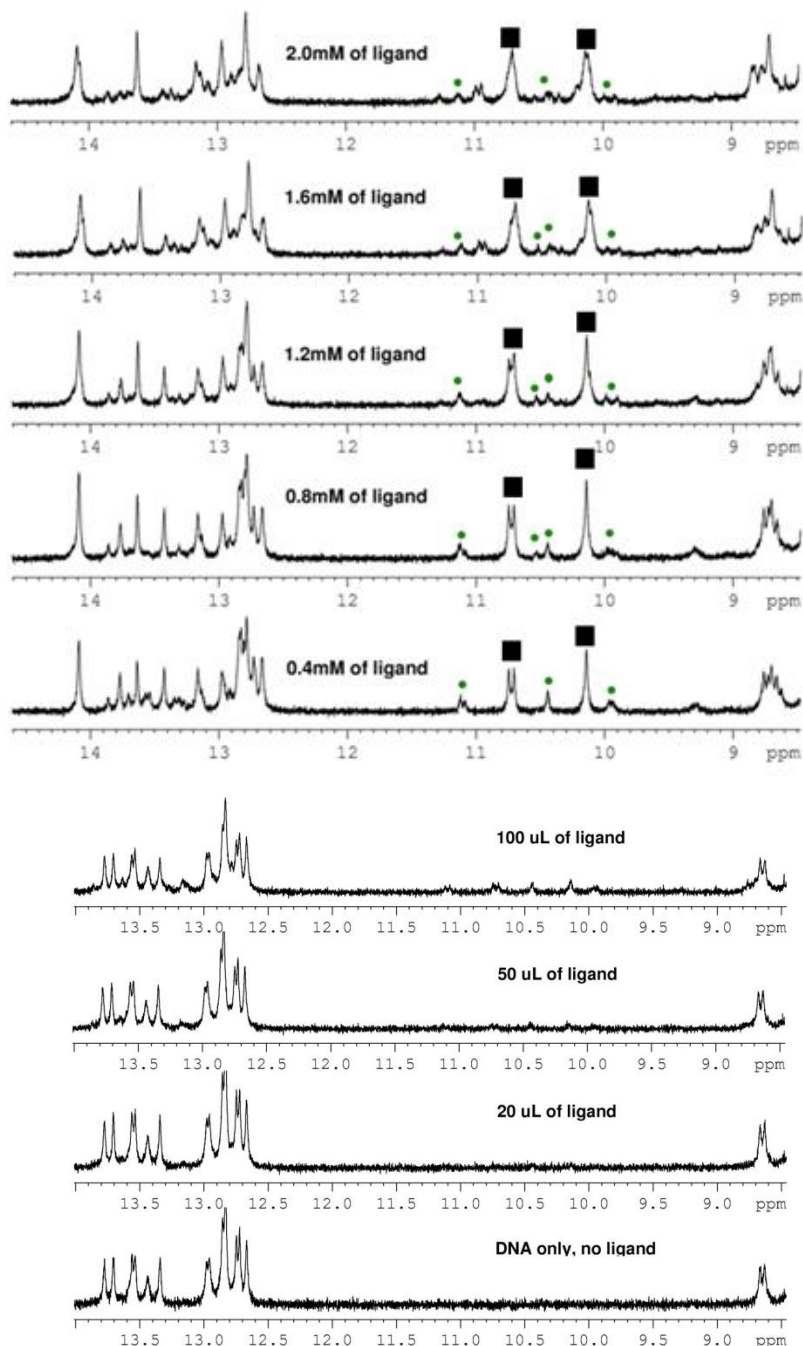


Рисунок 2 – Имино регион ¹H одномерного спектра в процессе титрования ДНК смесью тиазотропсина А и Б. Квадратами отмечены пики протонов тиазотропсина А, а кружками – тиазотропсина Б

Для определения констант комплексообразования лигандов с ДНК использовали раствор ДНК дуплекса с концентрацией 2мМ, полученного путём смешивания в равных пропорциях двух комплементарных одноцепочечных 16-тимерных последовательностей 5'-CGACGCGTACTAGTCG-3' и 5'-CGACTAGTACGCGTCG-3'. Полученный дуплекс имеет сайты связывания специфичные для каждого из лигандов.

Из-за ограниченного количества тиазотропсина Б было принято решение использовать повторно ранее уже использованный образец для титрования. В образец с чистой ДНК добавляли высококонцентрированную смесь из тиазотропсина А и тиазотропсина Б. По достижению соотношения концентраций тиазотропин Б: тиазотропсин А: ДНК = 0.1 : 0.1 : 1 титрование продолжилось путём добавления только тиазотропсина А вплоть до соотношения концентраций тиазотропин Б: тиазотропсин А: ДНК = 0.1 : 1 : 1 (см. рис. 2) при незначительных погрешностях. Что интересно: добавление тиазотропсина А вызвало небольшое увеличение интенсивности пиков у тиазотропсина Б.

Расчётная модель. Факт наличия ярко выраженной агрегации в используемых растворах лигандов (как само-, так и гетероассоциатов) подтверждается смещением химических сдвигов протонов в область сильного поля с ростом концентрации растворённых веществ. На рисунке 3 изображён 2D [¹H; ¹H] NOESY ЯМР спектре тиазотропсина А или тиазотропсина Б. Кросспики, отмеченные 1, показывают nOe взаимодействия между единичным протоном принадлежащим одной молекуле и двумя протонами принадлежащим к обеим молекулам подтверждая существование гетероассоциации. Пики, отмеченные 2 представляют особый интерес, так как там можно наблюдать негативные кросспики которые характерны для больших агрегатов малых молекул.

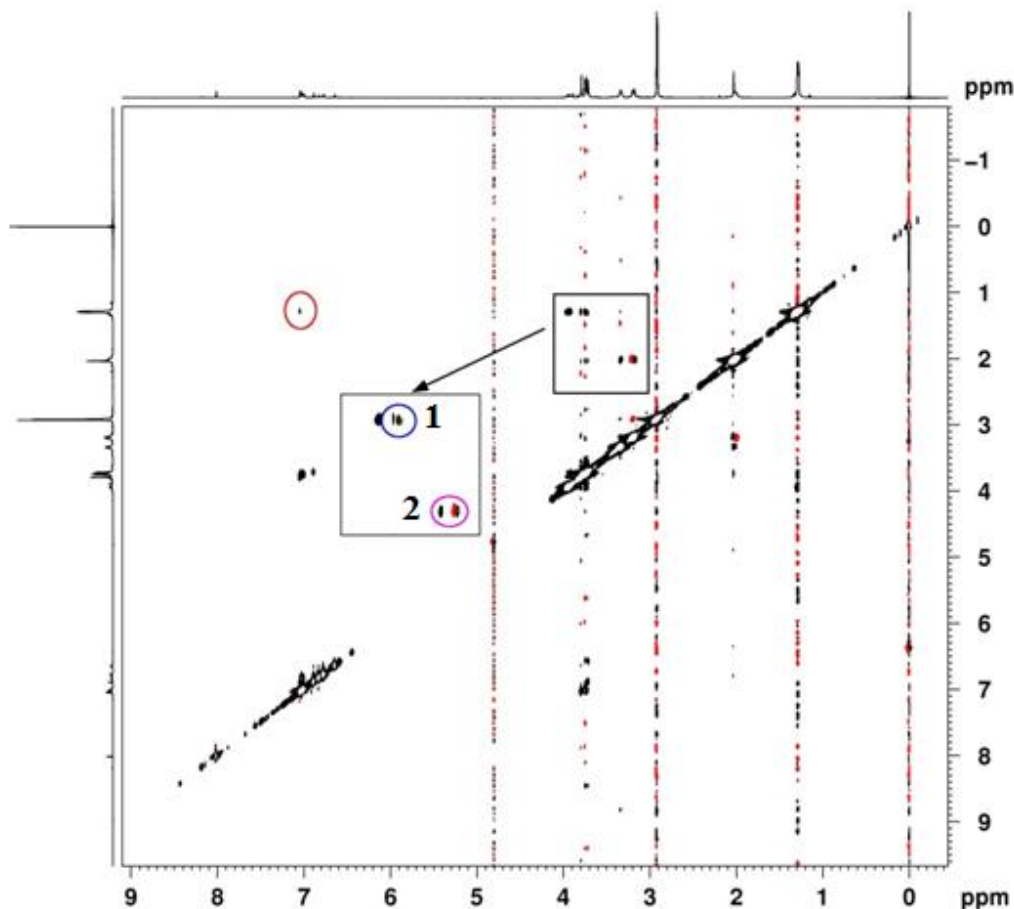


Рисунок 3 – 600МГц 2D [¹H, ¹H] NOESY ЯМР спектр тиазотропсина А и тиазотропсина Б в растворе D₂O при температуре 298 К

Для расчета констант ассоциации различных комплексов лигандов была использована димерная модель, ограниченная структурой, состоящей максимум из двух молекул: ТзА-ТзА, ТзА-ТзБ и ТзБ-ТзБ, где ТзА и ТзБ – соответственно тиазотропсин А и тиазотропсин Б.

В рамках димерной модели для чистых растворов лигандов на основе закона сохранения масс были получены константы димеризации для соответствующих самоассоциатов:

$$A_0 = A + 2 * K_a * A^2; B_0 = B + 2 * K_b * B^2,$$

где A_0 и B_0 – текущие концентрации растворённых лигандов (тиазотропсина А и Б, соответственно) в процессе разбавления; A и B – концентрации мономерных форм лигандов (выражаются из системы уравнений сохранения массы, как и все прочие концентрации соединений, производных от компонентов системы, которые невозможно измерить напрямую); K_a и K_b – константы димеризации соответствующих молекул. Из полученных зависимостей химических сдвигов протонов, связанных с атомами углерода, входящими в состав ароматических колец лигандов (см. рис. 1), от концентрации лекарственного препарата, были получены значения констант

самоассоциации, а также значения химических сдвигов для выбранных протонов в мономерной (δ_m) и димерной (δ_d) форме:

$$\delta_a = \frac{A}{A_0} * (\delta_{ma} + 2 * K_a * A * \delta_{da}); \delta_b = \frac{B}{B_0} * (\delta_{mb} + 2 * K_b * B * \delta_{db}),$$

где δ_a и δ_b – измеренные значения химического сдвига выбранного протона тиазотропсина А или Б соответственно.

Следующим шагом было определение константы гетероассоциации тиазотропсина А и Б из концентрационной зависимости химического сдвига всё тех же протонов, принадлежащих ароматическим кольцам лигандов, полученной при титровании смеси лекарственных препаратов. Закон сохранения масс в этом случае принимал вид:

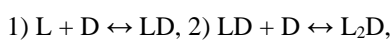
$$\begin{cases} A_0 = A + 2 * K_a * A^2 + K_{ab} * A * B \\ B_0 = B + 2 * K_b * B^2 + K_{ab} * A * B, \end{cases}$$

где K_{ab} – константа гетероассоциации тиазотропсина А и Б. По аналогии с химическим сдвигом в случае самоассоциации получаем:

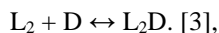
$$\begin{cases} \delta_a = \frac{A}{A_0} * (\delta_{ma} + 2 * K_a * A * \delta_{da} + K_{ab} * B * \delta_{ha}) \\ \delta_b = \frac{B}{B_0} * (\delta_{mb} + 2 * K_b * B * \delta_{db} + K_{ab} * A * \delta_{hb}), \end{cases}$$

где δ_{ha} и δ_{hb} – химические сдвиги протонов, принадлежащих молекулам тиазотропсина А и Б соответственно, входящим в состав гетеродимера. Значения химических сдвигов для протонов молекул в мономерной и связанной форме гомодимера взяты из эксперимента по самоассоциации.

Завершающим этапом является определение констант связывания для каждого лиганда с дуплексом ДНК. На основании анализа данных само- и гетероассоциации MGB-лигандов тиазотропсин А [2] и тиазотропсин Б между собой и в присутствии ДНК, имеющие специфические домены для каждого типа лигандов, был сделан вывод о том, что данные лиганды связываются с макромолекулой в димерной форме. При этом, в сайт посадки, специфический для данного типа желобочников, лиганды садятся не последовательно по схеме:



а одновременно:



где L – свободная (мономерная) форма лиганда, садящегося на ДНК; L_2 – связанная (гомо- или гетеродимерная) форма лиганда/лигандов; D – свободная форма олигонуклеотидного дуплекса; LD – гетерокомплекс ДНК с одной молекулой лиганда; L_2D – гетерокомплекс ДНК с двумя молекулами лиганда/лигандов.

В рамках вышеупомянутых допущений можно предположить, что в результате создания смеси, содержащей одновременно все три компонента, а именно тиазотропсин А, тиазотропсин Б и дуплексный олигонуклеотид, в растворе будут наблюдаться следующие типы соединений: ТзА, ТзБ, ТзА-ТзА, ТзБ-ТзБ, ТзА-ТзБ, ДНК, ДНК-ТзА-ТзА, ДНК-ТзБ-ТзБ и ДНК-ТзА-ТзБ. При этом подтвердить наличие в растворе последнего из перечисленных соединений на основании имеющихся данных весьма затруднительно, а добавляя к этому тот факт, что концентрация Тиазотропсина Б при проведении эксперимента была значительно ограничена, было принято решение пренебречь данным типом комплекса в рамках используемой расчетной модели для случая трёхкомпонентной системы. Тогда система уравнений, описывающих закон сохранения масс, примет следующий вид:

$$\begin{cases} A_0 = A + 2 * K_a * A^2 + K_{ab} * A * B + K_{Ma} * K_a * A^2 * M \\ B_0 = B + 2 * K_b * B^2 + K_{ab} * A * B + K_{Mb} * 2 * K_b * B^2 * M \\ M_0 = M + K_{Ma} * K_a * A^2 * M + K_{Mb} * K_b * B^2 * M, \end{cases}$$

где K_{Ma} и K_{Mb} – константы комплексообразования олигонуклеотидного дуплекса с тиазотропсином А и тиазотропсином Б соответственно; M_0 – текущая концентрация растворённого дуплекса ДНК; M – концентрация несвязанной в комплекс с лигандами дуплексной ДНК в растворе.

Соответствующие значения химических сдвигов для каждого элемента трёхкомпонентной системы будут описываться следующей системой уравнений:

$$\begin{cases} \delta_a = \frac{A}{A_0} * (\delta_{ma} + 2 * K_a * A * \delta_{da} + K_{ab} * B * \delta_{ha}) \\ \delta_b = \frac{B}{B_0} * (\delta_{mb} + 2 * K_b * B * \delta_{db} + K_{ab} * A * \delta_{hb}) \\ \delta_M = \frac{M}{M_0} * (1 + K_{Ma} * K_a * A^2 + K_{Mb} * K_b * B^2), \end{cases}$$

где δ_M – измеренные значения химического сдвига протонов, принадлежащих олигонуклеотидному дуплексу.

В рамках модели были получены следующие усреднённые параметры комплексообразования (при этом $K_i(\text{агрегации}) = 2 * K_i$):

$K_a(\text{агрегации}) = 2,252 * 10^3 \text{ M}^{-1}$, $K_b(\text{агрегации}) = 2,66 * 10^3 \text{ M}^{-1}$, $K_{ab}(\text{агрегации}) = 2,04 * 10^3 \text{ M}^{-1}$, $K_{Ma} = 1,1 * 10^3 \text{ M}^{-1}$.

Работа была выполнена при поддержке гранта РФФИ (проект № 15-04-03119).

Список литературы / References:

1. Wemmer E., Dervan P. Targeting the minor groove of DNA. *Proc Uni of California USA*, 1997, vol. 7, pp. 355-361.
2. Головченко И.В., Евстигнеев М.П., Ивашинин Н.В. Исследование самоассоциации тиазотропсина А. *Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ-2015. Материалы X международной научно-технической конференции*, 2015, с. 105-110. [Golovchenko I.V., Evstigneev M.P., Ivashinin N.V. The Study of Thiazotropsin A Self-Assembly. *Modern trends in biological physics and chemistry. BPPC-2015. Proceedings of X International Science-Technical Conference*, 2015, pp. 105-110. (In Russ.)]
3. Rubinson M. A., Parkinson J.A., Evstigneev M.P. Entropic binding mode preference in cooperative homo-dimeric drug-DNA recognition. *Chemical Physics Letters*, 2015, vol. 624, pp. 12-14.
4. Rubinson M.A., Parkinson J.A., Evstigneev M.P. Entropic nature of cooperative homo-dimeric drug-dna binding. *Modern trends in biological physics and chemistry. BPPC-2015. Proceedings of X International Science-Technical Conference*, 2015, pp. 131-134.