

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПИЛЛАРАРЕНА С ОЛИГОНУКЛЕОТИДОМ ДНК МЕТОДОМ ЯМР СПЕКТРОСКОПИИ

Скворцова П.В.^{1,2}, Шурпик Д.Н.², Стойков И.И.², Зуев Ю.Ф.², Хайрутдинов Б.И.^{1,2}

¹Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН

ул. Лобачевского, д. 2/31, г. Казань, 420111, РФ

e-mail: skvpolina@gmail.com

²Казанский Федеральный Университет

ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, РФ

Аннотация. Проект направлен на инженерию новых перспективных супрамолекулярных структур для медико-биологического применения, обладающих способностью связывать и/или компактизировать молекулы ДНК. Фундаментальная новизна проекта заключается в использовании новых макроциклических соединений – пиллар[5]аренов, которые могут работать как контейнеры для доставки лекарственных препаратов, включая средства генной диагностики и фармакологии.

В работе методами спектроскопии ЯМР высокого разрешения и ЯМР диффузометрии исследована способность 4,8,14,18,23,26,28,31,32,35-дека-[(N-(2',2',2'-триэтиламиноэтил) -карбамоилметокси)-пиллар[5]арен декайодида взаимодействовать с палиндромным декамером ДНК. Выполнено полное соотнесение спектров ЯМР олигонуклеотида и пиллар[5]арена используя двумерные гомо- и гетеро-ядерные спектры ЯМР: COSY, TOCSY, NOESY, HSQC, HMBC. Определен гидродинамический радиус пиллар[5]арена, который находится в хорошем согласии с теоретически рассчитанным. Образование молекулярного комплекса пиллар[5]арена с олигонуклеотидом ДНК подтверждено измерениями коэффициентов самодиффузии молекул в свободной форме и в комплексе.

Ключевые слова: пиллар[5]арены, ДНК, супрамолекулярные ассоциаты, структура, спектроскопия ЯМР.

INVESTIGATION OF INTERACTION OF PILLARARENE WITH DNA OLIGONUCLEOTIDE BY NMR SPECTROSCOPY METHOD

Skvortsova P.V.^{1,2}, Shurpik D.N.², Stoikov I.I.², Zuev Y.F.¹, Khairutdinov B.I.^{1,2}

¹Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics of Kazan Science Centre of the Russian Academy of Sciences

Lobachevsky St., 2/31, Kazan, 420111, Russia

e-mail: skvpolina@gmail.com

²Kazan Federal University

Kremlin st., 18, Kazan, 420008, Russia

The project is destined at the engineering of new promising supramolecular structures for medical and biological applications that have the ability to bind and/or compact DNA molecules. The fundamental novelty of the project is the using of new macrocyclic compounds - pillar[5]arenes, which can work as containers for drug delivery, including genetic diagnostics and pharmacology.

High-resolution NMR spectroscopy and NMR diffusometry were used to study the ability of 4,8,14,18,23,26,28,31,32,35-decakis-[(N-(2', 2', 2'-triethylaminoethyl) - carbamoylmethoxy) -pillar[5]arene decay iodide to interact with the palindromic DNA decamer. The completely assigned of the NMR spectra of the oligonucleotide and the pillar[5]arene was carried out using the two-dimensional homo- and hetero-nuclear NMR spectra: COSY, TOCSY, NOESY, HSQC, HMBC. The hydrodynamic radius of the pillar[5]arene is determined, which is in good agreement with the theoretically calculated one. The formation of the molecular complex pillar[5]arene with a DNA oligonucleotide is confirmed by measurements of the coefficients of self-diffusion of molecules in free form and in a complex.

Key words: pillar[5]arene, DNA, supramolecular associates, structure, NMR spectroscopy.

Одной из важнейших задач современной медицины является лечение наследственных заболеваний. Генотерапия, то есть доставка в клетки пациента новых генов в качестве лекарственных средств, – перспективный способ ее решения. Молекула нуклеиновой кислоты может быть доставлена в клетку с помощью различных систем доставки. Одно из направлений по созданию таких молекулярных систем для трансфекции ДНК основывается на использовании супрамолекулярных платформ.

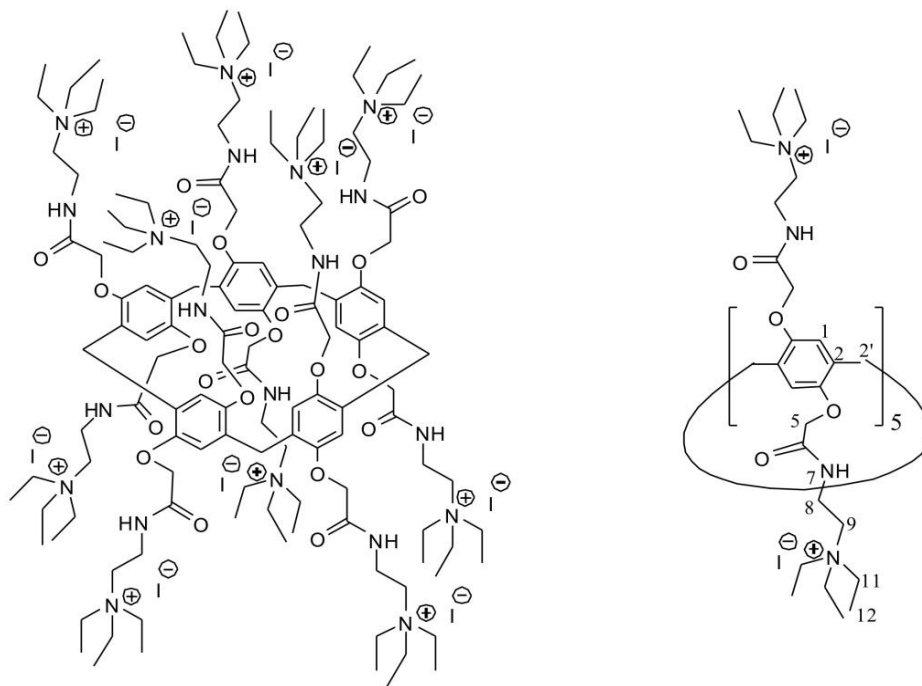
Концепция супрамолекулярной химии, позволяющая реализовать упорядоченную и ориентированную сборку надмолекулярных структур, привлекает к себе внимание исследователей из разных областей науки – химии, биологии, физики. В качестве молекулярных платформ для создания различных рецепторов используется ряд макроциклических соединений, таких как циклодекстрины, краун-эфиры, каликсарены и кукурбитурилы. Другим классом перспективных супрамолекулярных структур являются пиллар[n]арены. Их преимущество перед остальными макроциклическими соединениями заключается в легком синтезе, уникальной форме, универсальной функциональности и хорошей водорастворимости [1]. Пиллар[n]арены способны к образованию комплексов как с заряженными, так и с нейтральными молекулами [2,3].

Изучение комплекса ДНК с неорганическими соединениями возможно методом спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) высокого разрешения. Данные ЯМР спектроскопии способны повысить точность молекулярного докинга и построения модели комплекса [4].

ЯМР эксперименты проводились на спектрометре Bruker Avance III с рабочей частотой 600 МГц на ядрах ¹H используя 5-мм инверсный трех-ядерный датчик ¹H/¹³C/¹⁵N, оснащенный градиентной катушкой. В качестве

стандарта калибровки спектра ЯМР использовали TSP (3-триметилсилилпропионовая-2,2,3,3-d 4 -кислота, натриевая соль), сигналы которого принимались за начало отсчета равными 0 м.д. Для записи спектров DOSY использовали стандартную импульсную последовательность «стимулированное эхо» с биполярными градиентами.

В работе исследован 4,8,14,18,23,26,28,31,32,35-дека-[(N-(2',2',2'-триэтиламиноэтил)-карбамоилметокси)-пиллар[5]арен декайодид [5], структурная формула которого представлена на рисунке 1.



а)

б)

Рисунок 1 – Структурная формула пиллар[*n*]арена: а) формула пиллар[5]арена с противоионами йода, б) одно звено пиллар[5]арена с нумерацией атомов

В качестве растворителя для пиллар[5]арена использовалась вода (90% H₂O, 10% D₂O), концентрация исследуемого раствора 21 mM. Были определены химические сдвиги сигналов пиллар[5]арена, а также выполнено полное соотнесение двумерных гомо- и гетеро-ядерных спектров ЯМР: COSY, TOCSY, NOESY, HSQC, HMBC. Химические сдвиги приведены в таблице 1.

Таблица 1. Химические сдвиги пиллар[5]арена в водном растворе при 30 °C

	1	2	2'	3	5	6	7	8	9	11	12
H	6,80		4,02		4,47 4,32		8,24	3,80 3,70	3,36	3,36	1,31
C	115,26	129,07	30,12	149,11	67,80	171,10		32,45	54,10	53,36	7,06

С использованием метода ЯМР диффузометрии была дана оценка гидродинамического радиуса молекулы в растворе. Для этого была проведена серия экспериментов по определению коэффициента самодиффузии при различных температурах.

С помощью полученной температурной зависимости гидродинамический радиус пиллар[5]арена был рассчитан по формуле Стокса-Эйнштейна:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r}$$

где *k* – постоянная Больцмана, *T* – температура в Кельвинах, *η* – вязкость, *r* – гидродинамический радиус.

Из формулы видно, что зависимость удобно строить не от температуры, а от величины *T/η*, так как остальная часть формулы является константой. На рисунке 2 приведен график полученной температурной зависимости.

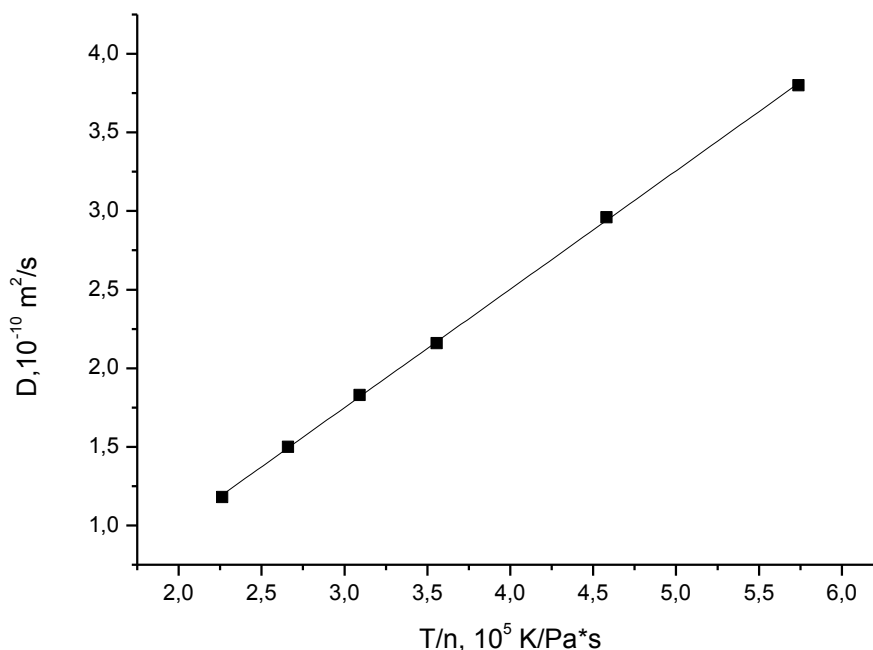


Рисунок 2 – Зависимость коэффициента самодиффузии пиллар[5]арена от T/η

Рассчитанный гидродинамический радиус пиллар[5]арена равен $9,8\text{\AA}$, что вполне соответствует структурной формуле. Отсюда следует что при концентрации до 21 mM в водном растворе исследуемое вещество не олигомеризуется и находится в форме мономера.

Для исследования комплексообразования пиллар[5]арена с олигонуклеотидом в качестве модели была выбрана двухцепочечная палиндромная молекула декамера ДНК $d(\text{GCGAATTTCGC})_2$ из банка данных Биологического магнитного резонанса (www.bmrb.wisc.edu). Небольшой размер молекулы позволяет использовать образцы без обогащения по ядрам ^{13}C . Было показано, что данный олигонуклеотид в растворе существует в двух состояниях: в форме двухцепочечной спирали (доминирующая структура в растворе) и одноцепочечной форме в конформации «шпилька» [6].

Изучение взаимодействия пиллар[5]арена с олигонуклеотидом проводилось в водном натрий-фосфатном 20 mM , $\text{NaCl } 50\text{ mM}$ буферном растворе с $\text{pH}=7.0$. Мы провели ряд ЯМР экспериментов с образцом, в котором концентрация ДНК была постоянной ($0,48\text{ mM}$), а концентрация пиллар[5]арена изменялась. В частности, были проведены эксперименты по определению коэффициента самодиффузии при температуре 30°C . Полученные данные представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Коэффициенты самодиффузии пиллар[5]арена и олигонуклеотида ДНК при различных относительных концентрациях в растворе при 30°C

$C_{\text{DNA}}:C_{\text{Pillar[5]aren}}$	$D_{\text{DNA}}, 10^{-10}\text{ m}^2/\text{c}$	$D_{\text{Pillar[5]aren}}, 10^{-10}\text{ m}^2/\text{c}$
Свободное состояние	1,90	2,55
1:0.2	1,90	1,55
1:0.5	1,84	1,58
1:1	1,54	1,44
1:2	1,48	1,48
1:3	1,48	1,60
1:5	1,46	1,92

Из таблицы видно, что коэффициенты самодиффузии для пиллар[5]арена и для ДНК в свободном состоянии существенно отличаются. Значение коэффициента самодиффузии для пиллар[5]арена больше, что указывает на его большую подвижность в растворе по сравнению с олигонуклеотидом. Это качественно согласуется с тем, что молекулярная масса олигонуклеотида ДНК больше чем молекулярная масса пиллар[5]арена, 6214 Da и 3732 Da соответственно. При добавлении в раствор ДНК небольшого количества пиллар[5]арена его коэффициент самодиффузии резко уменьшается, что свидетельствует об уменьшении подвижности пиллар[5]арена вследствие образования комплекса. При этом коэффициент самодиффузии ДНК не меняется. Это может означать, что ДНК в растворе избыточное количество и сохраняется достаточно много молекул в свободном состоянии. При увеличении

концентраций пиллар[5]арена коэффициенты самодиффузии выравниваются. Наиболее близки коэффициенты самодиффузии при относительной концентрации пиллар[5]арена 1 и 2. При дальнейшем увеличении концентрации коэффициент самодиффузии пиллар[5]арена начинает увеличиваться, при этом для ДНК он остается постоянным. Это свидетельствует о том, что не все молекулы пиллар[5]арена связываются с ДНК. Таким образом, можно предположить, что одна молекула палиндромного декамера ДНК может связать одну или две молекулы пиллар[5]арена.

Список литературы / References:

1. Ogoshi T., Yamagishi T., Nakamoto Y. Pillar-Shaped Macrocyclic Hosts Pillar[n]arenes: New Key Players for Supramolecular Chemistry. *Chemical Reviews*, 2016, vol. 116, pp. 7923-8002.
2. Li C., Chen S., Li J., Han K., Xu M., Hu B., Jia X. Novel neutral guest recognition and interpenetrated complex formation from pillar[5]arenes. *Chem. Commun.*, 2011, vol. 47, no. 40, pp. 11294-11296
3. Cao D., Meier H. Pillar[n]arenes – a novel, highly promising class of macrocyclic host molecules. *Asian J. Org. Chem.*, 2014, vol. 3, pp. 244-262.
4. Orts J., Bartoschek S., Griesinger C., Monecke P., Carlomagno T. An NMR-based scoring function improves the accuracy of binding pose predictions by docking by two orders of magnitude. *Journal of Biomolecular NMR*, 2012, vol. 52, pp. 23-30.
5. Yakimova L., Shurpik D., Gilmanova L., Makhmutova A., Rakhimbekova A., Stoikov I. Highly selective binding of methyl orange dye by cationic water-soluble pillar[5]arenes. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 2016, vol. 14, pp. 4233-4238.
6. Khairutdinov B., Ermakova E., Sitnitsky A., Stoikov I., Zuev Y. Supramolecular complex formed by DNA oligonucleotide and thiacalix[4]arene. NMR-spectroscopy and molecular docking. *Journal of Molecular Structure*, 2014, vol. 1074, pp. 126-133.

РОЛЬ КОНТАКТОВ N-КОНЦЕВОГО УЧАСТКА БЕЛКА L27 С РИБОСОМНОЙ 23S РНК В ФОРМИРОВАНИИ ФУНКЦИОНАЛЬНО-АКТИВНОЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ РИБОСОМЫ

Фандо М.С., Коробейникова А.В.

Институт белка РАН

ул. Институтская, 4, г. Пуццо, 142290, РФ

e-mail: fando@vega.protres.ru

Аннотация. Рибосомный белок L27 является особенностью бактериальной рибосомы. Из результатов структурных исследований известно, что вытянутый N-концевой «хвост» белка L27 достигает пептидилтрансферазного центра рибосомы, где он образует обширные контакты со спиралью H80-H81 23S рРНК, а также несколько контактов с тРНК в А- и Р-участках рибосомы. Укорочение белка L27 из *Escherichia coli* с N-конца приводит к снижению функциональной активности рибосом. Предполагается, что белок L27 играет важную роль в позиционировании тРНК в двух тРНК-связывающих сайтах рибосомы. В настоящей работе исследована роль контактов N-концевого участка белка L27 с 23S рРНК в функционировании рибосомы. С этой целью был создан ряд штаммов *E. coli*, содержащих белок L27 с точечными заменами. Оказалось, что некоторые внесенные в белок замены (K4L или K4A/K5G) приводят к значительному замедлению роста клеток и снижению активности их аппарата трансляции. На основании имеющихся структурных данных в рибосоме эти консервативные аминокислотные остатки белка L27 взаимодействуют только с 23S рРНК, но не с тРНК. Полученные в работе данные указывают на важность контактов N-концевого участка белка L27 с 23S рРНК для формирования функционально-активной бактериальной рибосомы *in vivo*.

Ключевые слова: рибосомный белок L27, рибосомная РНК, рибосома, трансляция, *Escherichia coli*.