

Pracownia Biofizyki dla zaawansowanych

Ćwiczenie laboratoryjne dla studentów III roku kierunku
„Zastosowania fizyki w biologii i medycynie”
Biofizyka molekularna

Pomiary właściwości termodynamicznych kwasów nukleinowych przy pomocy spektroskopii UV

Maciej Jasiński¹ and Joanna Trylska²

¹MISDoMP, Kolegium MISMaP, UW

²Laboratorium Maszyn Biomolekularnych, CENT, UW

Wstęp

Spektroskopia UV, stosowana między innymi do identyfikacji związków chemicznych, czy rozwiązywania zagadnień strukturalnych, jest cennym narzędziem w badaniach biofizycznych. W przypadku kwasów nukleinowych, oddziaływanie światła z zasadami azotowymi dostarcza istotnych informacji na temat struktury i termodynamiki badanych układów. Celem ćwiczenia jest zapoznanie studentów z metodami badawczymi, sprzętem i technikami analizy danych, używanymi aktualnie w badaniach termodynamiki kwasów nukleinowych przy pomocy spektroskopii UV.

1 Oddziaływanie promieniowania ze stanami elektronowymi

Absorpcję promieniowania elektromagnetycznego przez częściowo absorbujący i rozpraszający ośrodek opisuje prawo Lamberta – Beera. Natężenie światła przechodzącego przez materiał zmniejsza się eksponencjalnie,

$$I = I_0 10^{-\varepsilon c l} \quad (1)$$

gdzie I_0 jest natężeniem światła padającego, I natężeniem światła przechodzącego przez próbkę, l drogą, jaką światło pokonuje w materiale, c stężeniem molowym, a ε molarnym współczynnikiem ekstynkcji. Stosunek I/I_0 nazywany jest transmitancją, natomiast $A = \log(I/I_0)$ oznacza absorbancję materiału. Przekształcając powyższe definicje, absorbancję można zapisać jako

$$A = \varepsilon l c \quad (2)$$

Wartość współczynnika ekstynkcji materiału zależy od długości fali padającego promieniowania elektromagnetycznego. Długość fali, przy której występuje największa absorpcja, jest charakterystyczna dla różnych związków i bywa wykorzystywana w analizie do ich identyfikacji.

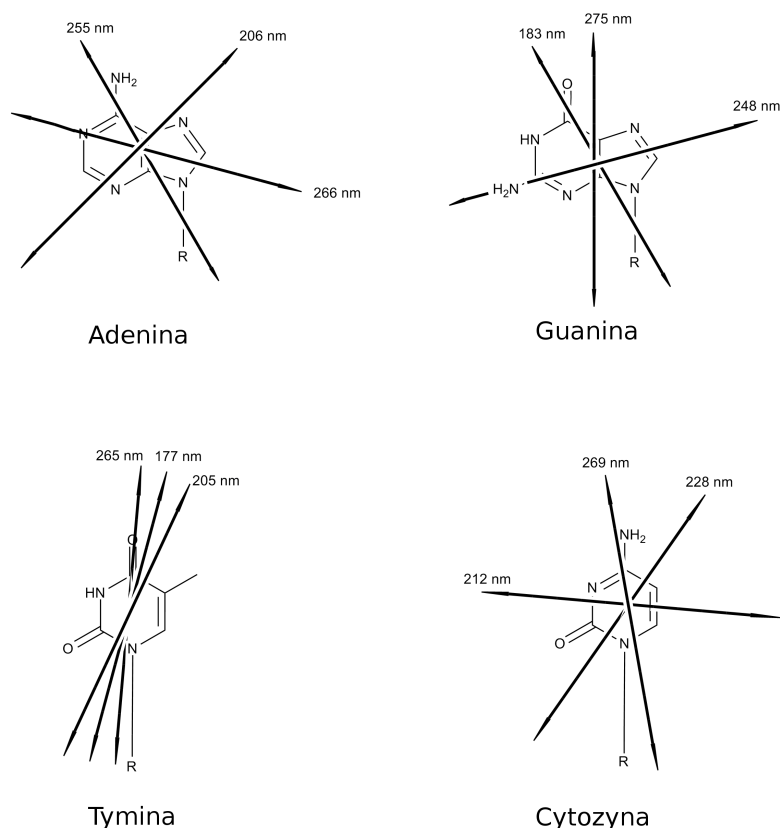
Za silną absorpcję kwasów nukleinowych w zakresie bliskiego nadfioletu odpowiadają głównie zasady purynowe i pirymidynowe. Fosforanowo – cukrowy szkielet DNA (RNA) ma znikomy wpływ na absorpcję światła o długości większej niż 200 nm. Maksimum absorbancji kwasów nukleinowych w zakresie UV przypada na długość fali ok. 260 nm, przy czym współczynnik ekstynkcji przyjmuje wówczas wartości ok $10000 M^{-1} cm^{-1}$.

Zaabsorbowanie przez molekułę promieniowania z zakresu widzialnego lub nadfioletu powoduje zmiany w jej energii elektronowej. W związkach organicznych, takich jak zasady purynowe i pirymidynowe, stany energetyczne elektronów walencyjnych klasyfikuje się wprowadzając trzy typy orbitali molekularnych: σ , π i n . Elektrony σ znajdują się na orbitalach, których oś symetrii pokrywa się z osią wiązania chemicznego. Elektrony π znajdują się na orbitalach, których oś symetrii jest prostopadła do osi wiązania chemicznego. Molekularne orbitale σ i π mogą być wiążące i antywiążące (σ^* , π^*). Elektrony n znajdują się na orbitalach niewiążących. Kwadrat orbitali, zgodnie z mechaniką kwantową, interpretowany jest jako rozkład gęstości ładunku w molekułę.

Przejścia elektronowe powodują zmiany w rozkładzie gęstości ładunku molekuły. Przydatnym parametrem do opisu optycznych właściwości molekuł, jest dipolowy moment przejścia μ . Opisuje on zmianę gęstości ładunków pomiędzy stanem podstawowym i wzbudzonym. Im zmiana ta jest większa, tym większa jest absorpcja promieniowania. Dipolowy moment przejścia jest wielkością wektorową. Jego długość opisuje ilość światła absorbowaną w rozważanym przejściu, natomiast jego kierunek charakteryzuje polaryzację światła, dla której występuje maksimum absorpcji.

Przestrzenne ułożenie dipolowego momentu przejścia w molekułę pozwala na określenie kierunku przejścia elektronowego. W zasadach nukleinowych obserwuje się przejścia elektronowe prostopadłe i równoległe do płaszczyzny molekuły. Ze względu na planarną symetrię molekuł nie są możliwe inne przejścia. Przejścia równoległe do płaszczyzny pierścieni to przejścia typu $\pi - \pi^*$ natomiast przejścia prostopadłe do płaszczyzny pierścieni to przejścia $n - \pi^*$. Przejścia typu $n - \pi^*$ zazwyczaj charakteryzują się znacznie słabszą absorpcją i są trudne do wykrycia z pomiędzy innych silniejszych przejść. Na rys. 1 przedstawione są wybrane dipolowe momenty przejść, stowarzyszone z przejściami elek-

tronowymi w płaszczyźnie pierścieni aromatycznych, zasad azotowych. Szerszy opis zagadnień omawianych w tej części: [1, 2, 4].

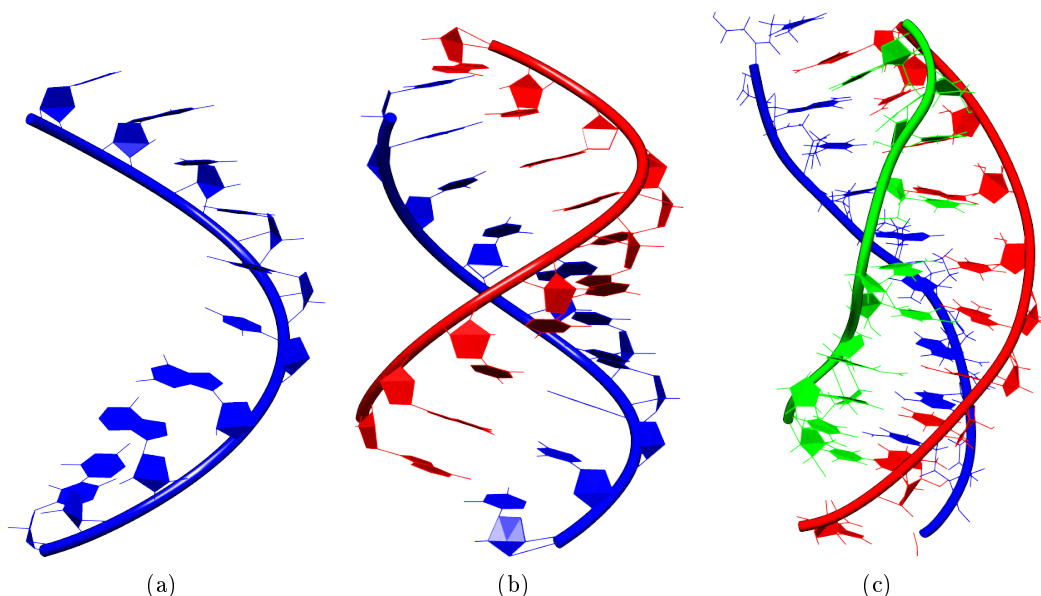


Rysunek 1: Kierunki wybranych dipolowych momentów przejść elektronowych w zasadach nukleinowych. Przy każdym zamieszczona została długość fali światła, dla której występuje maksimum absorpcji. (Kierunki dla uracylu są analogiczne do przedstawionych dla tyminy.)

2 Wpływ struktury kwasów nukleinowych na absorpcję.

Absorpcja światła przez nici kwasów nukleinowych zależy od sumy absorpcji poszczególnych nukleotydów oraz od oddziaływań między nimi. Z tego powodu współczynnik ekstynkcji dla danej długości fali zależy od sekwencji i struktury nici kwasów nukleinowych. Zależność współczynnika ekstynkcji od struktury oznacza, że pomiary absorbancji mogą być wykorzystywane do śledzenia zmian konformacji kwasów nukleinowych (np. do rozróżniania struktur dwuniciowych: rys. 2(b) od pojedynczych nici: rys. 2(a)). Oddziaływania pomiędzy stakującymi zasadami nukleinowymi powodują zmniejszenie absorbancji - nazywane **hipochromizmem**. Podwójna helisa absorbuje mniej światła niż pojedyncze nici, które z kolei absorbują mniej niż mieszanina nie związanych nukleotydów.

Wyjaśnienie tego zjawiska opiera się na mechanizmie indukcji momentów dipolowych. Gdy cząsteczka pochłania światło, następuje w niej zmiana gęstości ładunku. Powstający wówczas dipolowy moment przejścia, indukuje w pobliskich molekułach dipole elektryczne.



Rysunek 2: (a) Pojedyncza nić RNA, posiadająca helikalną strukturę. (b) Podwójna helisa RNA. (c) Kompleks trzech nici kwasów nukleinowych.

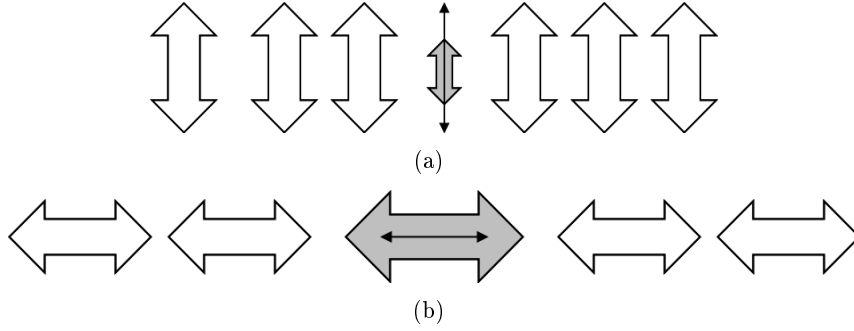
Nowo powstałe dipole elektryczne oddziałują następnie z wywołującym je dipolowym momentem przejścia. Dodatni koniec dipola elektrycznego indukuje w swoim pobliżu ładunki negatywne, a ujemny ładunki pozytywne. W związku z tym, w stakujących nukleobazach, indukowane dipole są zawsze skierowane przeciwnie do dipola związanego z absorpcją światła, powodując zmniejszenie jego długości. W efekcie dipolowe momenty przejść zachodzących w płaszczyźnie pierścieni molekuly, w stakujących nukleobazach, posiadają mniejszą długość niż w przypadku molekuł nie oddziałujących ze sobą (Rys. 3(a)). Ponieważ współczynnik ekstynkcji jest proporcjonalny do kwadratu długości dipolowego momentu przejścia, absorbancja w układach zawierających stakujące zasady nukleinowe, jest mniejsza niż w układach, w których zasady nukleinowe są nieuporządkowane.

Inne ułożenia dipolowych momentów przejść mogą prowadzić do **hiperchromizmu** – wzrostu absorbancji. W przypadku gdy zasady nukleinowe umieszczone są w jednej płaszczyźnie indukowane momenty dipolowe mogą powodować wzrost długości dipolowego momentu przejścia (Rys. 3(b)). Wówczas obserwowany będzie wzrost absorbancji. Efekt hiperchromowy bywa widoczny np. w strukturach trójniciowych (Rys. 2(c)) i pozwala na osobne obserwowanie przejść z układów trójniciowych do dwuniciowych, a następnie dwuniciowych do pojedynczych nici.

Szerszy opis zagadnień omawianych w tej części: [3, 4].

3 Krzywe topnienia, analiza wyników

Zazwyczaj, podczas podgrzewania roztworów wodnych, obserwuje się spadek absorbancji w próbce. Jest on związany z rozcieńczaniem roztworu, podczas zwiększania objętości przez rozpuszczalnik. W zakresie 4 – 100 °C woda zwiększa swoją objętość o około 4 %. Jednak gdy roztwór zawierający nici kwasu nukleinowego jest podgrzewany, wraz ze wzrostem



Rysunek 3: Diagramy przedstawiające schematycznie powstawanie hipochromizmu i hiperchromizmu. (a) Ułożenie indukowanych momentów dipolowych (białe) i dipolowego momentu przejścia (czarny), które powoduje powstanie hipochromizmu (szary). (b) Ułożenie indukowanych momentów dipolowych (białe) i dipolowego momentu przejścia (czarny), które powoduje powstanie hiperchromizmu (szary).

temperatury obserwuje się wzrost absorbancji. Jest to związane z osłabieniem, a następnie zanikiem efektu hipochromowego wraz ze wzrostem temperatury. W roztworach pojedynczych nici kwasów nukleinowych posiadających helikalną strukturę, oddziaływania stakingowe zmniejszają się stopniowo ze wzrostem temperatury, co objawia się łagodnym wzrostem absorbancji. Dla układów dwuniciowych obserwuje się S-kształtną zależność absorbancji od temperatury. Wzrost absorbancji w takich układach jest nagły i stromy, ponieważ równowaga pomiędzy strukturami dwuniciowymi i jednoniciowymi jest w istocie przejściem fazowym. Zależność absorbancji od temperatury nazywa się krzywą topnienia.

Krzywe topnienia charakteryzowane są przez temperaturę topnienia T_m , zakres temperatur, w którym następuje przejście oraz wzrost absorbancji podczas przejścia. Temperaturę topnienia definiuje się jako temperaturę punktu środkowego przejścia fazowego. Procentowy wzrost absorbancji (hiperchromowość, h_r) obliczany jest przy pomocy zmian absorbancji następujących podczas przejścia

$$h_r = 100 \frac{A_S - A_D}{A_D} \quad (3)$$

gdzie A_S oznacza absorbancję przez pojedyncze nici, a A_D absorbancję przez kompleksy dwuniciowe.

Topnienie kompleksów dwuniciowych może być analizowane przy użyciu modelu dwustanowego. Dla roztworu zawierającego struktury dwuniciowe w stanie równowagi z pojedynczymi nićmi, gdy stężenia molowe pojedynczych nici są sobie równe, frakcja kompleksów dwuniciowych, f_D , opisana jest funkcją

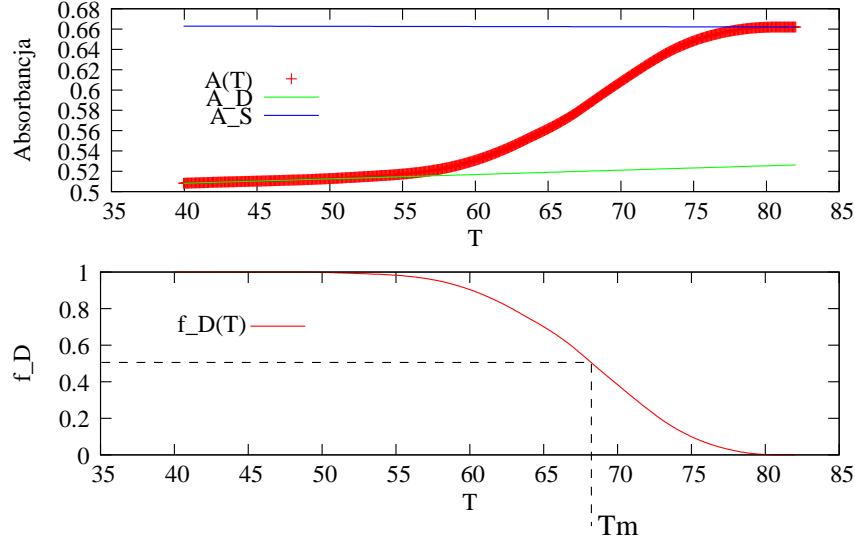
$$f_D = \frac{A - A_S}{A_D - A_S} \quad (4)$$

Funkcja ta przyjmuje wartości w zakresie 0 – 1. Zmiany absorbancji obserwowane są nie tylko w zakresie przejścia fazowego. Absorbancja pojedynczych nici i kompleksów dwuniciowych także zależy od temperatury. W obliczeniach funkcji f_D konieczne jest uwzględnienie tej zależności. W zakresie temperatur spoza przejścia przyjmuje się liniową zależność współczynnika ekstynkcji od temperatury,

$$A_D = a_D T + b_D \quad (5)$$

$$A_S = a_S T + b_S \quad (6)$$

gdzie a i b z odpowiednimi indeksami oznaczają współczynniki prostych dopasowanych przy pomocy regresji liniowej do odpowiednich fragmentów krzywej topnienia. Typową krzywą topnienia wraz z dopasowanymi prostymi bazowymi: A_D i A_S oraz obliczoną na jej podstawie funkcję f_D przedstawiono na rysunku 4. Analiza funkcji f_D oprócz łatwego



Rysunek 4: (górny wykres) Przykładowa krzywa topnienia RNA z dopasowanymi prostymi bazowymi. (dolny wykres) Funkcja frakcji kompleksów dwuniciowych obliczona na podstawie krzywej topnienia z zaznaczoną temperaturą topnienia - T_m .

wyznaczenia temperatury topnienia układu $f_D(T_m) = 0.5$, pozwala także na wyznaczenie parametrów termodynamicznych układu. Dla układów dwuniciowych związek stałej równowagi reakcji, K z funkcją f_D opisany jest przy pomocy następującej relacji:

$$K = \frac{2f_D}{(1 - f_D)^2 c} \quad (7)$$

gdzie c oznacza stężenie molowe jednej z nici tworzących kompleks (zakłada się, że stężenia obu nici są sobie równe). Wykorzystując równanie van't Hoffa

$$\frac{d(\ln K)}{d(1/T)} = -\frac{\Delta H}{R} \quad (8)$$

i tożsamości termodynamiczne

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (9)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (10)$$

możemy uzyskać wartości entalpii ΔH , entropii ΔS i swobodnej energii wiązania ΔG reakcji; R oznacza uniwersalną stałą gazową. Dla układów dwuniciowych, o równych stężeniach molowych składników, słuszne są równania

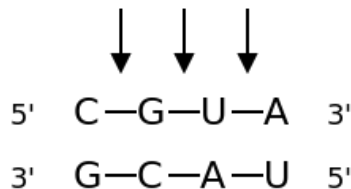
$$\Delta H = -6R \left(\frac{d f_D}{d (1/T)} \right)_{T=T_m} \quad (11)$$

$$\ln K = -\frac{\Delta H}{R} \frac{1}{T} + \frac{S}{R} \quad (12)$$

wiązące dane uzyskane z eksperymentu z wielkościami termodynamicznymi. Szerszy opis zagadnień omawianych w tej części: [5, 6, 7].

4 Teoretyczne przewidywanie właściwości kompleksów kwasów nukleinowych

Właściwości termodynamiczne, kompleksów kwasów nukleinowych, mogą być przewidywane przy użyciu modelu najbliższych sąsiadów (ang. *nearest-neighbor model*). Metoda ta pozwala na wyznaczenie wielkości charakteryzujących układ na podstawie sekwencji tworzących go nici. Model ten opiera się na zbiorze empirycznych reguł i parametrów opisujących właściwości energetyczne fragmentów układu. Oddziaływania pomiędzy nukleotydami z komplementarnych nici, w pewnym stopniu zależą od sąsiadujących z nimi nukleotydów. W związku z tym, obliczając właściwości termodynamiczne dwuniciowego kompleksu, zamiast traktować układ jako sumę oddziaływań między poszczególnymi budującymi go parami zasad, traktuje się go jako zbiór oddziaływań pomiędzy sąsiadującymi nukleotydami. Dla układu na rysunku 5 całkowita energia wiązania w modelu najbliższych



Rysunek 5: Ilustracja rozważania oddziaływań w modelu najbliższych sąsiadów. Strzałkami oznaczano oddziaływania pomiędzy sąsiadującymi bazami.

sąsiadów przedstawiona zostałaby jako suma:

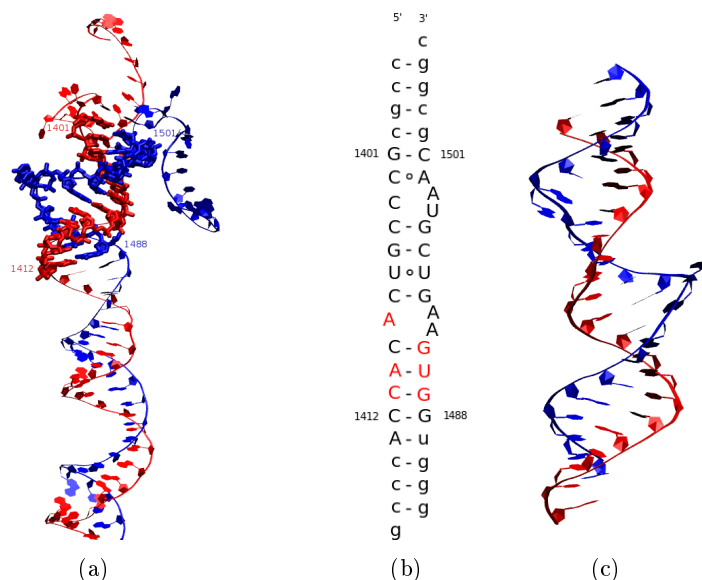
$$\Delta G = \Delta G(CG \text{ koniec}) + \Delta G(CG/GC) + \Delta G(GC/UA) + \Delta G(UA/AU) + \Delta G(AU \text{ koniec}) \quad (13)$$

Baza danych zawierająca parametry modelu najbliższych sąsiadów dla kompleksów RNA znajduje się w Internecie pod adresem <http://rna.urmc.rochester.edu/NNDB>. Zawiera ona dane nie tylko dla układów tworzących klasyczne helisy. Dzięki znajdującym się w niej informacjom możliwe jest także obliczanie właściwości termodynamicznych skomplikowanych struktur zawierających pętle, wybrzuszenia, czy niesymetryczne końce. Na stronach <http://rna.urmc.rochester.edu/NNDB/help.html> i <http://rna.urmc.rochester.edu/NNDB/tutorials.html> można znaleźć praktyczne porady i przykłady wykorzystania metody najbliższych sąsiadów w obliczeniach. Szerszy opis zagadnień omawianych w tej części: [5, 8].

5 Badany układ

Pomiary wykonywane w trakcie zajęć będą przeprowadzane na modelowym fragmencie helisy H44 (Rys. 6(a)) nici 16S rybosomalnego RNA małej podjednostki rybosomu bakterii

E.Coli. Modelowy konstrukt o nazwie HX (Rys. 6(b), 6(c)), odtwarza jeden z funkcjonalnych fragmentów bakteryjnego rybosomu. Jest to fragment miejsca A, które w trakcie translacji bierze udział w powstawaniu par zasad między antykodonem tRNA przenoszącym aminokwas a kodonem mRNA. W badanym fragmencie rRNA znajdują się dwa miejsca wiązania antybiotyków aminoglikozydowych. Przedstawiony konstrukt jest używany w badaniach mających na celu zaprojektowanie nowych substancji antybakteryjnych, których działanie będzie opierać się na selektywnym zaburzaniu pracy rybosomów bakterii.



Rysunek 6: (a) Fragment helisy H44 16S rRNA e.coli (2Z4K.pdb) widziany od strony dostępnej dla rozpuszczalnika. Pogrubiona część to fragment zawarty w modelu HX. (b) Struktura drugorzędowa konstrukt HX. (c) Struktura krystalograficzna modelu HX.

6 Materiał wymagany na kolokwium

1. Podstawowe definicje związane z promieniowaniem elektromagnetycznym
2. Prawo Lamberta – Beera
3. Schemat działania spektrofotometru dwuwiązkowego
4. Budowa chemiczna kwasów nukleinowych
5. Efekt hiperchromowy i hipochromowy
6. Oddziaływania stakingowe

Przed przystąpieniem do realizacji ćwiczenia studenci powinni zapoznać się z pozycjami [5, 6, 7] z bibliografii. Egzemplarze artykułów można uzyskać u prowadzącego ćwiczenie.

7 Przebieg ćwiczenia

1. Zapoznanie się ze spektrometrem absorpcyjnym dwuwiązkowym pracującym w zakresie promieniowania UV-VIS
2. Zapoznanie się z technikami przygotowywania próbek RNA do pomiarów
3. Przeprowadzenie pomiarów absorbancji wyznaczających dokładne stężenia próbek używanych w dalszych pomiarach
4. Wyznaczenie długości fali, dla których w badanym układzie występują największe zmiany absorbancji w zależności od temperatury
5. Wykonanie pomiarów dla układu w różnych warunkach (różne pH, stężenie soli, obecność cząsteczek wiążących się specyficznie do układu; do uzgodnienia z prowadzącym)
6. Wyznaczenie właściwości termodynamicznych przy pomocy analizy krzywych topnienia oraz modelu najbliższych sąsiadów

8 Raport z wykonanego ćwiczenia

Opis ćwiczenia powinien zawierać *Wstęp* uwzględniający ogólne zagadnienia spektroskopowe związane z wykonywanym ćwiczeniem; *Materiały i metody*, w których opisane powinny być zastosowana aparatura, warunki pomiaru, sposoby przygotowania próbek. W części *Wyniki i dyskusja* powinny znaleźć się:

- zarejestrowane krzywe topnienia wraz z opisem i interpretacją
- wyznaczone temperatury topnienia układu w funkcji zmienianych parametrów
- obliczenia entalpii reakcji przy pomocy dwóch metod analizy krzywych topnienia:
 1. Wykorzystując równanie 11
 2. Dopasowując prostą do wykresu $\ln K(1/T)$ (równanie 12)
- porównanie wartości entalpii reakcji i temperatur topnienia uzyskanych z analizy danych eksperymentalnych z wartościami uzyskanymi z obliczeń przy pomocy modelu najbliższych sąsiadów
- komentarz dotyczący przyczyn możliwych niezgodności pomiędzy wynikami doświadczalnymi i teoretycznymi.

Literatura

- [1] Z. Kęcki. *Podstawy Spektroskopii molekularnej*. PWN, Warszawa, 1998.
- [2] J. Sadlej. *Spektroskopia molekularna*. WNT, Warszawa, 2002.
- [3] V. A. Bloomfield et al. *Nucleic acids structures, properties and functions*. University Science Book, 2000.

- [4] Charles R. Cantor and Paul R. Schimmel. *Biophysical Chemistry, Part 2: Techniques for the Study of Biological Structure and Function (Pt. 2)*. W. H. Freeman and Company, 1980.
- [5] J. D. Puglisi and I. Tinoco. Absorbance melting curves of RNA. *Meth. Enzymol.*, 180:304–325, 1989.
- [6] J. L. Mergny and L. Lacroix. Analysis of thermal melting curves. *Oligonucleotides*, 13:515–537, 2003.
- [7] Kenneth J. Breslauer. *Protocols for Oligonucleotide Conjugates: Synthesis and Analytical Techniques (Methods in Molecular Biology)*, chapter Extracting Thermodynamic Data From Equilibrium Melting Curves for Oligonucleotide Order - Disorder Transitions. Humana Press, 1993.
- [8] D. H. Turner and D. H. Mathews. NNDB: the nearest neighbor parameter database for predicting stability of nucleic acid secondary structure. *Nucleic Acids Res.*, 38:D280–282, Jan 2010.
- [9] S. M. Dibrov, J. Parsons, and T. Hermann. A model for the study of ligand binding to the ribosomal RNA helix h44. *Nucleic Acids Res.*, 38:4458–4465, Jul 2010.