

Оценка динамического беспорядка в олигонуклеотидах ДНК с помощью низкочастотной спектроскопии комбинационного рассеяния

А.Ю. Сосоров,^{1,2,3,*} О.Д. Паращук,¹ А.А. Трубицын,¹ Н.О. Дубинец,^{2,4} И.В. Чичерин,⁵ Д.Ю. Паращук¹

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, физический факультет.

Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 2

²Институт синтетических полимерных материалов им. Н.С. Ениколопова Российской академии наук

Россия, 117393, Москва, Профсоюзная ул. 70

³Институт биоорганической химии

им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

⁴Центр фотохимии РАН, ФНИЦ «Кристаллография и Фотоника» РАН

Россия, 119421, Москва, Новаторов ул. 7А

⁵Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет

Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

(Поступила в редакцию 11.12.2023; после доработки 29.12.2023; подписана в печать 09.01.2024)

Степень компактизации ДНК в различных областях клеточного ядра определяет, должны ли в них экспрессироваться гены и протекать другие важнейшие клеточные процессы, например репликация и репарация ДНК. В связи с этим весьма актуально развитие подходов к экспериментальной оценке компактности ДНК в ядрах клеток, а также её индикатора — динамического беспорядка — степени тепловой флуктуации положения и взаимной ориентации молекулярных фрагментов. В настоящей работе на примере одноцепочечных олигонуклеотидов гуанина и цитозина, а также их двуцепочечной комбинации показано, что динамический беспорядок в ДНК может быть оценен на основе данных низкочастотной спектроскопии комбинационного рассеяния (КР). Впервые измерены спектры КР олигонуклеотидов в широком диапазоне, включающем низкочастотную ($10\text{--}200\text{ см}^{-1}$) и высокочастотную ($200\text{--}2000\text{ см}^{-1}$) области. Обнаружено, что низкочастотная интенсивность КР максимальна в одноцепочечном олигоцитозине и минимальна в двуцепочечном олигонуклеотиде, в полном согласии с величинами динамического беспорядка, оцененными из расчётов методом молекулярной динамики. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности применения низкочастотной спектроскопии КР для оценки динамического беспорядка и компактности ДНК. Ожидается, что использование такой техники должно способствовать пониманию ключевых клеточных процессов и обуславливающих их физических механизмов, которое необходимо для развития передовых методов молекулярной биофизики и клеточной биологии.

PACS: 87.15.M УДК: 577

Ключевые слова: нуклеиновые кислоты, хроматин, биофизика, колебательная спектроскопия, клеточное ядро.

DOI: [10.55959/MSU0579-9392.79.2420402](https://doi.org/10.55959/MSU0579-9392.79.2420402)

ВВЕДЕНИЕ

ДНК играет важнейшую роль в жизнедеятельности всех организмов, обеспечивая хранение и передачу наследственной информации. В эукариотических клетках молекулы ДНК общей длиной свыше метра упакованы в ядре диаметром в несколько микрометров, т.е. ДНК сильно компактизована. Компактность ДНК варьируется в различных областях клеточного ядра, определяя участие этих областей (а соответственно, и записанных в них генов) в жизненно важных клеточных процессах — транскрипции, репликации и репарации ДНК [1]. Эти процессы интенсивно протекают в областях со слабой компактностью ДНК (области эухрома-

тина), где молекула относительно легко доступна для взаимодействия с ферментами; напротив, более компактная ДНК (входящая в состав гетерохроматина) слабо вовлечена в перечисленные процессы [1, 2]. Компактность ДНК может быть разной в разные моменты жизни клетки и существенно изменяться под воздействием различных факторов. Вместе с тем, несмотря на многолетние интенсивные исследования, отсутствует чёткое представление о структуре клеточного ядра, в частности о взаимосвязи между образуемыми в нём микро- и наноструктурами (с различной степенью компактности ДНК) и функционированием клетки [3]. Поскольку от правильной и своевременной реализации генетической информации зависит существование и функционирование клеток, тканей и органов, а значит и здоровье организма, изучение компактности ДНК в ядре, её динамики, а также факторов, влияющих на их изменение, весьма важно как в фундамен-

* E-mail: sosorev@physics.msu.ru

тальном, так и в прикладном аспекте.

Для изучения структуры клеточного ядра, в частности компактности ДНК в различных его областях, часто применяются различные методы определения конформации хроматина, например Hi-C [4], при которых ядро разрушается, ДНК сшивается и разрезается на фрагменты, а потом эти фрагменты анализируются. Такие крайне инвазивные методы не позволяют исследовать динамику структуры ядра при различных клеточных процессах. Менее инвазивными являются методы флуоресцентной микроскопии со сверхвысоким пространственным разрешением [5]. Однако для реализации этих методов требуется введение в ядро клетки флуоресцентных меток или красителей, что может влиять на протекание внутриклеточных процессов и затруднять интерпретацию результатов.

В отличие от вышеприведённых методов, различные техники колебательной спектроскопии — инфракрасная, терагерцовая, спектроскопия комбинационного рассеяния (КР) и неупругого нейтронного рассеяния — позволяют получить ценную информацию о конформации молекул и межмолекулярных взаимодействиях [6–12] без разрушения клетки или введения в клетку вспомогательных веществ. Низкочастотная (НЧ) область колебательного спектра ($<200\text{ см}^{-1}$) наиболее важна для этой цели, поскольку НЧ-полосы в молекулярных системах соответствуют колебаниям молекул как целого или их больших фрагментов и поэтому весьма чувствительны к упаковке молекул и межмолекулярным взаимодействиям [13]. Однако в то время как высокочастотная (ВЧ, $>200\text{ см}^{-1}$) КР-спектроскопия широко применяется для решения задач молекулярной и клеточной биологии, НЧ КР-спектроскопия в этой области применяется относительно редко. Известно несколько работ [14–23], в которых исследовали НЧ-спектры КР ДНК и РНК. В большинстве работ в НЧ-спектре КР сухой ДНК наблюдался широкополосный сигнал (примерно до 150 см^{-1}), а поверх него — весьма широкая полоса с центром в районе $20\text{--}30\text{ см}^{-1}$ [16, 21, 22]. Более детальный анализ позволил выделить слабые полосы на ~ 60 и $\sim 100\text{ см}^{-1}$ [17, 18]. В работе [21] впервые были представлены экспериментальные и теоретические спектры КР транспортной и рибосомной РНК в широком диапазоне, включающем НЧ- и ВЧ-области. В НЧ-спектрах ниже 100 см^{-1} выявлены две отдельные полосы, одна из которых ($30\text{--}40\text{ см}^{-1}$), по-видимому, соответствует колебанию п-стека нуклеозидов, а другая ($70\text{--}80\text{ см}^{-1}$) — вращательной либрации азотистых оснований и сжатию/растяжению водородных связей между комплементарными нуклеотидами. Практически во всех работах, за исключением [17, 21], внимание авторов было сосредоточено на частотах характеристических полос. Однако в работах [17, 21] было показано, что интенсивность НЧ КР ДНК значительно (на порядок) выше, чем ВЧ-интенсивность. Примечательно, что для схожих с ДНК по первичной структуре, но раз-

личающихся по вторичной и третичной структуре биомолекул — транспортной и рибосомной РНК — НЧ- и ВЧ-интенсивности оказались сравнимы [21].

Недавно на примере молекулярных кристаллов органических полупроводников было показано [23–26], что относительная интенсивность НЧ КР молекулярной системы связана со степенью динамического беспорядка в ней — тепловой флуктуации положений и взаимной ориентации молекул или их фрагментов относительно положений равновесия. Действительно, интенсивность КР различных колебательных мод определяется тем, насколько сильно данное колебание модулирует поляризуемость системы [27]. Для НЧ-мод, многие из которых являются либрациями (вращательными колебаниями), степень модуляции поляризуемости напрямую связана с амплитудой колебаний, т.е. с динамическим беспорядком. Чем выше интенсивность НЧ КР, тем сильнее динамический беспорядок. Поскольку измерение абсолютной интенсивности НЧ КР технически крайне затруднительно, в работах [23–25] было предложено в качестве дескриптора динамического беспорядка использовать отношение интегральной НЧ-интенсивности КР к интегральной ВЧ-интенсивности, делённой на частоту: $R = \int_{\text{LF}} I d\omega / \int_{\text{HF}} (I/\omega) d\omega$. Таким образом, был предложен способ количественной оценки интенсивности тепловых флуктуаций положений атомов на основе спектроскопии КР. В работе [24] была показана эффективность такого дескриптора для поиска органических полупроводников с низким динамическим беспорядком и, как следствие, высокой подвижностью заряда. В работе [21] высказано предположение, что более высокая интенсивность НЧ КР ДНК по сравнению с транспортной и рибосомной РНК обусловлена большей флуктуацией положений атомов в первой, что было подтверждено с помощью компьютерного моделирования. Это может быть связано с важным структурным отличием РНК от ДНК — наличием гидроксильной группы в 2'-положении рибозы, стабилизирующей более плотную А-форму двойной спирали по сравнению с менее плотной В-формой, наиболее часто наблюдаемой у ДНК.

В отличие от кристаллов органических полупроводников, биомолекулы, в частности ДНК и РНК, обычно не обладают трансляционной симметрией, связанной со смещением атомов на характерные межатомные расстояния. Поэтому в терминах физики конденсированных сред биомолекулы в первом приближении можно рассматривать как системы с сильным статическим беспорядком положений атомов — по аналогии с аморфными твердыми телами. Для выделения беспорядка в биомолекулах, связанного с тепловым движением атомов, представляется целесообразным по аналогии с кристаллами органических полупроводников использовать термин «динамический беспорядок», понимая под ним интенсивность тепловых флуктуаций положений атомов на пикосекундных временах. Эту интенсивность можно количественно охарактеризо-

вать среднеквадратичным отклонением координат атомов σ_r от среднего значения (RMSD). Подчеркнём, что при таком определении динамического беспорядка в него не включены различные типы движений на временных масштабах дольше 10 пс и короче 0.1 пс, где первые связаны со сравнительно медленными конформационными переходами биомолекул, а вторые — главным образом с колебаниями химических связей (валентными, деформационными, изгибными и т.д.). Существенно, что эти оба типа «быстрых» и «медленных» колебаний не дают информации о компактности молекулы. Отметим, что при таком определении динамический беспорядок отличен от т.н. внутренней неупорядоченности биомолекул, отвечающей их спонтанным конформационным переходам [28]. Как и в кристаллах органических полупроводников, динамический беспорядок в молекулах нуклеиновых кислот существенно влияет на их свойства, в частности на транспорт заряда [29].

В настоящей работе показано, что интенсивность НЧ КР может быть использована для оценки динамического беспорядка в образцах ДНК, различающихся по нуклеотидному составу и топологии (одноцепочечная/двухцепочечная). Для этого измерены спектры КР в широком частотном диапазоне, включающем НЧ- и ВЧ-область, ДНК-олигонуклеотидов: 20-нуклеотидных одноцепочечных цитозина (Ц20) и гуанина (Г20) и их двухцепочечной комбинации Г20:Ц20. Выявлено существенное уменьшение НЧ-интенсивности КР и, как следствие, дескриптора динамического беспорядка R в ряду Ц20–Г20–Г20:Ц20. Результаты молекулярно-динамического моделирования показывают, что именно в этом направлении уменьшается интенсивность тепловых флуктуаций положений атомов, что можно объяснить усилением межмолекулярных взаимодействий. Таким образом, можно сделать вывод, что для биомолекул, как и для органических полупроводников, динамический беспорядок может быть количественно оценен на основе НЧ-спектропии КР.

1. МЕТОДИКА

Получение олигонуклеотидов ДНК

Одноцепочечные гомополимеры, состоящие из последовательно соединённых 20 остатков гуанина или цитозина, были синтезированы на заказ в компании «Евроген» (Россия) на приборе Applied Biosystems ABI 3900. Двухцепочечные сополимеры были получены путем смешивания водных эквивалентных растворов комплементарных олигонуклеотидов и последующего высушивания до сухого остатка при нагревании на приборе Savant SpeedVac DNA 130 (Thermo Scientific). Далее сухой остаток размещался на стеклянной подложке.

Измерение КР-спектров

Для исследования спектров КР-образцов использовался КР-микроскоп inVia (Renishaw). В качестве

источника возбуждения использовался He–Ne лазер (633 нм, максимальная мощность 20 мВт). Деградация образцов при использовании 100% мощности лазера не наблюдалась, поэтому все эксперименты проводились с использованием максимальной мощности. Количество накоплений выбиралось в зависимости от интенсивности сигнала КР. Время накопления составляло 1 с, число накоплений 60, спектры регистрировались в 6 различных точках образца, затем производилось усреднение спектров по числу точек. НЧ-спектры были получены из измерений КР в диапазоне 10–450 см^{-1} (далее — «первая серия измерений»), ВЧ-спектры — из измерений КР в диапазоне 100–3500 см^{-1} (далее — «вторая серия измерений»). Для регистрации ВЧ-спектров использовались краевые фильтры рэлеевского излучения, которые позволяют регистрировать спектры КР в диапазоне от 100 до 10000 см^{-1} . Для измерения НЧ-спектров КР в диапазоне от 10 см^{-1} и более использовался двойной монохроматор (NExT, Renishaw). Поскольку с помощью NExT-фильтра необходимо пространственно отфильтровать лазерную линию, при каждом его использовании проверялась юстировка зеркал, щелей и линз, входящих в NExT-фильтр, и контролировалась форма лазерного пучка, поступающего с образца. Провалы в НЧ-спектрах на 18, 25 и 160 см^{-1} являются артефактами измерений, связанными с наличием пылинок на зеркалах NExT-фильтра. Обработка спектров, в частности вычитание фона, осуществлялась в программе WiRE 3.4 с помощью встроенного метода интерполяции кубическими полиномами. Из всех спектров в диапазоне 10–3500 см^{-1} вычитали непрерывный широкополосный фон. Все спектры, помимо широкополосного непрерывного фона, содержали широкополосный НЧ-сигнал в диапазоне 10–200 см^{-1} , вследствие чего процедура вычитания фона в ВЧ- и НЧ-областях несколько различалась: в диапазоне 200–3500 см^{-1} (часть диапазона второй серии измерений) производили интерполяцию непрерывного широкополосного фона набором кубических полиномов; полученную таким образом интерполяционную функцию далее экстраполировали в диапазон 10–200 см^{-1} . Спектры в диапазоне 10–200 см^{-1} были проанализированы как при наличии НЧ широкополосного сигнала, так и после его вычитания (также методом интерполяции кубическими полиномами) с целью анализа отдельных КР-полос в НЧ-области. Для сшивания НЧ- и ВЧ-спектров в области перекрытия диапазонов двух серий измерений выбирали наиболее интенсивные полосы в диапазоне 100–450 см^{-1} , интенсивность которых умножали на такой коэффициент, чтобы интенсивности полос стали равны интенсивностям в максимуме этих же полос, измеренных в диапазоне 100–2000 см^{-1} . При этом положение полос и соотношение интенсивностей во всей области перекрытия хорошо согласуется в обеих сериях измерений спектров КР. Спектр КР, сшитый таким образом из двух серий измерений и содержащий НЧ- и ВЧ-области, да-

лее нормировали на интегральную интенсивность в диапазоне 200–2000 см^{-1} , а также на время и число накоплений.

Молекулярно-динамическое моделирование

Для моделирования компактности упаковки олигомеров было выполнено молекулярно-динамическое (МД) моделирование одноцепочечных молекул ДНК Ц20 и Г20 с конформацией сахара-фосфатного остова, характерной для В-формы ДНК ($C2'$ эндо), а также двухцепочечной молекулы ДНК в В-форме, состоящей из 20 пар гуанин-цитозин (Г20:Ц20) (см. рис. 1). В начале, используя базу данных азотистых оснований в программе HyperChem, были построены модели вышеописанных цепочек. Далее последовательно выполнены процедуры минимизации геометрии всей системы (метод наискорейшего спуска), NVT-релаксация (постоянное количество частиц, объём и температура) длительносью 100 пс (шаг 2 фс, количество шагов: 50 000, термостат Берендсена) и NPT-релаксация (постоянные количество частиц, давление и температура) длительносью 2 нс (шаг 2 фс, количество шагов 1 000 000, баростат Парринелло-Рахмана). Моделирование выполняли в периодических кубических ячейках в водном растворе, для электронной нейтральности системы в ячейки были добавлены противоионы натрия. Использовался программный пакет Gromacs [30] и силовое поле Amber [31].

2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

2.1. Компьютерное моделирование олигонуклеотидов

В результате выполнения МД-моделирования исследуемых одно- и двухцепочечных олигонуклеотидов были получены структуры, приведённые на рис. 1. Для оценки динамического беспорядка для каждой системы были рассчитаны среднеквадратичные отклонения (RMSD) на один нуклеотид на всей заключительной NPT-траектории моделирования. Так как NPT-релаксация выполнена для большого числа шагов (1 000 000) длительносью 2 фс каждый, то можно утверждать, что после первых сотен шагов система находится в равновесии, что подтверждается на рис. 2 (графики выходят на насыщение после 300–400 шагов). Зависимости среднеквадратичного отклонения для всей цепочки ДНК от шага моделирования представлены на рис. 2. Как видно из этого рисунка, среднеквадратичное отклонение для Г20 ниже, чем для Ц20, а для Г20:Ц20 пары ниже, чем у Г20 и Ц20. Средние значения RMSD на последней наносекунде моделирования (стационарный режим МД) составляют 0.196, 0.116 и 0.085 нм для Ц20, Г20 и Г20:Ц20 соответственно. Более низкое среднеквадратичное отклонение для Г20, по сравнению с Ц20, можно объяснить тем, что в первом гуаниновые основания, обладая большей площадью сопряжённой системы, по сравнению с цитозином, взаимодействуют меж-

ду собой «лицом к лицу» (π -стэкинг) более сильно. Такие взаимодействия препятствуют флуктуациям положений атомов. Это проявляется в более линейной структуре гуанинового олигонуклеотида, в то время как для цитозинового олигонуклеотида наблюдаются «изломы» (см. рис. 1 а, б). В паре Г20:Ц20 водородные связи между комплементарными гуанином и цитозином ещё более увеличивают энергию взаимодействий между основаниями. В результате динамический беспорядок в паре Г20:Ц20 оказывается ниже, чем в одноцепочечных нуклеотидах.

2.2. Экспериментальные спектры КР

На рис. 3, а приведены экспериментальные спектры КР плёнок одноцепочечных олигонуклеотидов дезоксицитозина и дезоксигуанина, а также их двухцепочечной комбинации. Спектры нормированы на интегральное значение интенсивности, рассчитанное по области 200–2000 см^{-1} . В таблице приведены наиболее интенсивные пики спектров КР Г20, Ц20, Г20:Ц20 и соответствующие им молекулярные колебания. Как видно из приведённых данных, ВЧ-спектры Ц20 и Г20 содержат одинаковые характеристические КР-моды, характерные также для молекул ДНК и РНК [9–11, 22]: 783 и 1094 см^{-1} , соответствующие колебанию О–Р–О составляющей сахара-фосфатного остова (в моду на 783 также даёт вклад сжатие и растяжение кольца цитозина); 1002; 1530 см^{-1} , отвечающая растяжению колец цитозина и гуанина. Также в каждом спектре наблюдаются свои индивидуальные моды, в Ц20 — моды, ответственные за колебания азотистого основания цитозина, а в спектре Г20 — гуанина. ВЧ-спектр Ц20 имеет наиболее интенсивные моды на отстройках 592 и 631 см^{-1} (моды цитозина), 882 см^{-1} (внеплоскостная деформация цитозина), 1235–1290 см^{-1} (моды колебаний кольца цитозина), 1625 см^{-1} , положения которых соответствуют литературным данным [9–11, 22]. Наиболее интенсивные индивидуальные моды в ВЧ-спектре Г20 находятся на отстройках 684 см^{-1} (дыхательное колебание кольца гуанина); 1170, 1320–1340, 1401 см^{-1} — моды гуанина; 1416 см^{-1} (ножничное колебание водорода в пентозе); 1482 и 1573 см^{-1} (колебания растяжения кольца гуанина) [9–11, 22]. Большинство перечисленных мод также наблюдались и нами ранее в спектрах молекул ДНК и РНК [21]. Таким образом, мы наблюдаем в ВЧ-спектрах Г20 и Ц20 хорошее соответствие положений мод с литературными данными.

ВЧ-спектр двухцепочечной комбинации Г20:Ц20 содержит как индивидуальные моды Ц20 (592, 631, 882, 1235–1290 см^{-1}) и Г20 (684, 1170, 1320–1340, 1401, 1416, 1573 см^{-1}), так и общие для обоих спектров моды (782, 1002, 1094, 1530 см^{-1}). При переходе от одноцепочечных молекул к двухцепочечной частоты мод в основном остаются практически неизменными (см. рис. 3, а и рис. 4), за исключением нескольких мод, смещённых в КР-спектре двухцепочечной комбинации.

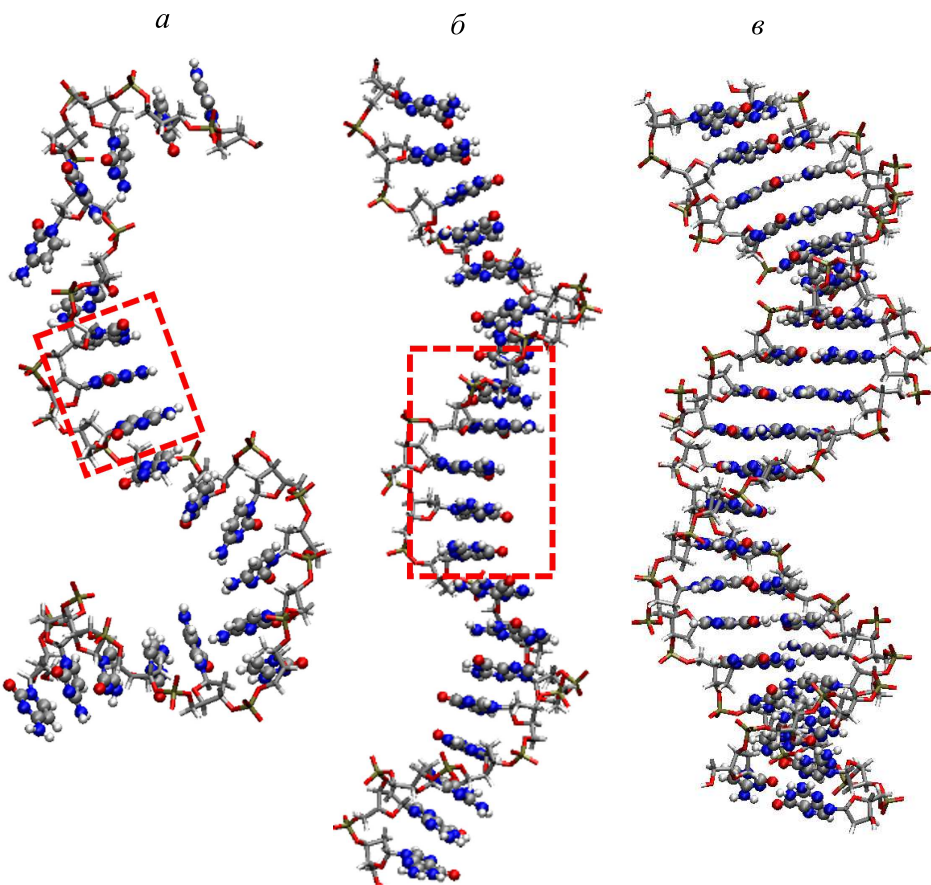


Рис. 1. Структуры исследуемых олигомеров ДНК (20 оснований в каждой цепочке) после 2 нс молекулярно-динамического моделирования: Ц20 (а), Г20 (б), Г20:Ц20 (в). Серым цветом обозначены атомы углерода, синим — азота, красным — кислорода, белым — водорода. Красным пунктиром на панелях (а,б) показан π -стекинг азотистых оснований

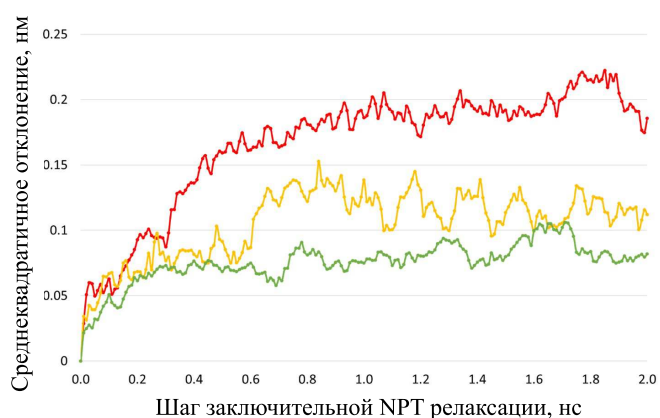


Рис. 2. Среднеквадратичные отклонения (RMSD) на один нуклеотид для Ц20 (красный), Г20 (жёлтый) и Г20:Ц20 (зелёный), полученные в результате моделирования методом МД

чечной молекулы в НЧ-область относительно положений в спектре одноцепочечных молекул: положение общей для спектров Г20 и Ц20 моды 1530 см^{-1} в спектре Г20:Ц20 и Ц20 смещено на 5 см^{-1} ; моды гуанина 1573 см^{-1} в спектре Г20:Ц20 — на 4 см^{-1} относительно Г20, моды цитозина на 631 см^{-1} — на

2 см^{-1} относительно Ц20. Возможно, смещение КР-полос в область низких частот при переходе к двухцепочечной молекуле связано с увеличением эффективной массы азотистых оснований за счёт появления водородных связей между азотистыми основаниями двух цепей.

При переходе от одноцепочечных молекул к двухцепочечной интенсивности ВЧ-мод в основном уменьшились. Такое уменьшение интенсивности связано в первую очередь со вдвое меньшей концентрацией азотистых оснований каждого из типов в двуцепочечной молекуле по сравнению с одноцепочечными. Однако для полос на 592 (Ц20), 684 и 1170 (Г20), 1235 – 1290 (Ц20) см^{-1} интенсивности уменьшились в среднем в 3 раза в спектре Г20:Ц20 по сравнению со спектром соответствующей одноцепочечной молекулы, т.е. оказались существенно меньше полусуммы интенсивностей для спектров Ц20 и Г20 (см. рис. 4). Это можно объяснить уменьшением амплитуды соответствующих колебаний при появлении дополнительных связей, удерживающих цепочки в паре Г20:Ц20. Напротив, для трёх мод гуанина (1401 , 1416 и 1573 см^{-1}) интенсивность выросла примерно в 2 раза. Это можно объяснить улучшением сопряжения в гуаниновом основании вследствие его планаризации, вызванной

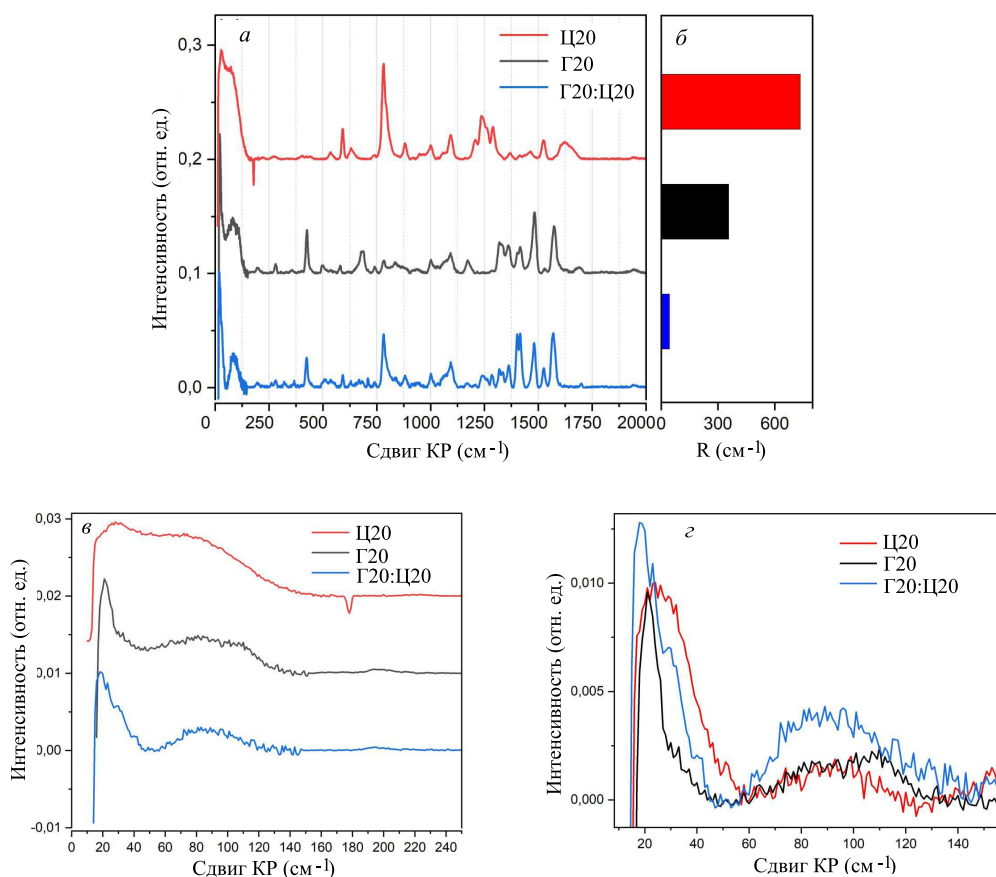


Рис. 3. *a* — Экспериментальные спектры КР-олигонуклеотидов: Ц20 (красный), Г20 (чёрный) и Г20:Ц20 (синий); *б* — рассчитанные из экспериментальных спектров значения дескриптора динамического беспорядка R ; *в, г* — экспериментальные НЧ-спектры КР-олигонуклеотидов: Ц20 (красный), Г20 (чёрный) и Г20:Ц20 (синий) с НЧ широкополосного сигнала (*в*) и с вычтенным НЧ широкополосным сигналом (*г*)

взаимодействиями с соседними основаниями в двойной спирали.

Полосы с центром на отстройке 782 см^{-1} и плечом на 792 см^{-1} в ранее измеренных спектрах ДНК [10, 21] соответствуют как колебанию PO_2 составляющей сахаро-фосфатного остова (792 см^{-1}), так и сжатию и растяжению кольца цитозина (782 см^{-1}). Действительно, мы наблюдаем, что в спектре Ц20 интенсивность моды с центром на 782 см^{-1} больше примерно в 8 раз, чем в спектре Г20. Поскольку в Г20 нет цитозина, наблюдаемая в этом спектре мода на 784 см^{-1} вероятно отвечает лишь колебанию группы PO_2 сдвинутому по частоте в область меньших отстроек в этой молекуле. В спектре Г20:Ц20 интенсивность моды на 782 см^{-1} примерно в два раза меньше, чем в спектре Ц20, что указывает на основной вклад в интенсивность этой моды в спектре Г20:Ц20 сжатия-растяжения кольца цитозина. Моде растяжения колец цитозина и гуанина на 1525 см^{-1} в спектре Г20 слабее по интенсивности примерно в 3 раза, чем в спектре Ц20 и Г20:Ц20, на основании чего можно сделать вывод, что больший вклад в соответствующую по-

лосу спектра вносит цитозин, а не гуанин.

НЧ-спектры Г20 и Ц20 содержат низкочастотный широкополосный сигнал (НЧШПС) в области отстроек ниже 150 см^{-1} , поверх которого наблюдаются более узкие характеристические пики. НЧШПС наблюдался ранее в спектрах ДНК и РНК [21]; его наличие в спектрах биомолекул [16, 17, 19, 32] можно объяснить большим числом степеней свободы, мягкостью биомолекул, а также низкой степенью симметрии. Более подробно НЧ-спектры трех олигонуклеотидов представлены в на рис. 3, *в, г*. В спектре Г20 наблюдается мода на отстройке 21 см^{-1} , а также широкая полоса в диапазоне $60\text{--}140\text{ см}^{-1}$, в спектре Ц20 — мода на 28 см^{-1} и широкий пик в области $60\text{--}120\text{ см}^{-1}$. В спектре Г20:Ц20 наблюдается мода на отстройке 18 см^{-1} и широкая полоса в диапазоне $60\text{--}140\text{ см}^{-1}$, а также менее интенсивный пик в виде плеча на отстройке 29 см^{-1} . Таким образом, НЧ-спектр двуцепочечной молекулы по аналогии с ВЧ-спектром содержит моды, наблюдаемые в отдельных спектрах одноцепочечных молекул Ц20 и Г20 (см. рис. 3, *в, г*). Мы

Таблица. Положения полос КР для Г20, Ц20 и Г20:Ц20 и соответствующие им молекулярные колебания. Обозначения: * — положение наблюдаемой КР-полосы соответствует приведенному значению, $\pm n$ — положение смещено от указанного значения на n см⁻¹

Сдвиг КР, см ⁻¹	Г20	Ц20	Г20:Ц20	Тип колебания	Источник
18			*	π -стекнуклеозидов (pendulums-nucleoside vibrations)	[18, 33, 35, 36]
21	*			π -стек нуклеозидов (pendulums-nucleoside vibrations)	[18, 33, 35, 36]
23			*	π -стек нуклеозидов (pendulums-nucleoside vibrations)	[18, 33, 35, 36]
28		*		π -стек нуклеозидов (pendulums-nucleoside vibrations)	[18, 33, 35, 36]
29			*	π -стек нуклеозидов (pendulums-nucleoside vibrations)	[18, 33, 35, 36]
40			*		
60–140		*		Внеплоскостные либрации азотистых оснований (out-of-plane H-bond) / сжатие-растяжение водородных связей (in-plane H-bondstretch)	[18, 23, 37]
197	*		*		
260			*		
280	*		*		
320			*		
354	*				
367			*		
424	*		*		
592		*	*		
631		*	-2	Колебание Ц (631)	[9]
669	*		*	Дыхание кольца Г (ringbreath, 669)	[11]
684	*		*	Дыхание кольца Г (682)	[10]
782	*	*	*	Дыхание кольца Ц (782-792)	[11]
836	*		*	О-Р-О (836)	[10]
882		*	*	Внеплоскостное колебание Ц (876)	[9]
1002	*	-1	*		
1094	-1	*	*	Симм. валентное колебание (symm. stretch) PO2 (1093)	[10]
1173	*		*	Колебание кольца Г (1173-1180)	[11]
1237		*	*		
1259		*	*	Колебание кольца Ц (1257)	[10]
1289	-5	*	-5		
1320 -1330	*		*	Колебание Г (1304-1342)	[11]
1361	*		+2	Колебание Г (1369)	[11]
1401	*		*		
1416	*		*	Колебание Г (1420)	[22]
1482	*		-1	Растяжение кольца (ringstretch) Г (1486)	[10]
1525	+5	*	*	Растяжение кольца Г (1532)	[9]
1573	*		-4	Колебание кольца Г (1577)	[10]

полагаем, что моды на отстройке 28 см⁻¹ в Ц20, 21 см⁻¹ в спектре Г20, 18 и 29 см⁻¹ в Г20:Ц20 могут быть приписаны коллективному колебанию π -стека нуклеозидов вдоль оси цепочки/спирали относительно сахара-фосфатного остова (helixmode [18]/pendulums-nucleosidevibrations [35, 36]/interhelicalmode [33]), соответствующему пику на 18–33 см⁻¹, наблюдаемым в спектре молекул А-, В-, С-, Z-ДНК [18, 33–36]. Смещение частоты этой полосы в КР-спектре двуцепочечной молекулы

в область малых отстроек может быть связано с увеличением эффективной массы при переходе от одноцепочечной молекулы к двуцепочечной. Моды, подобные наблюдаемым во всех трёх спектрах в области 60–140 см⁻¹, встречаются также в спектрах А-ДНК и В-ДНК в работах [18, 21, 37], где они отнесены к внеплоскостным либрациям азотистых оснований (out-of-plane H-bondbend) и сжатию-растяжению водородных связей между азотистыми основаниями (in-plane H-bondstretch) [18].

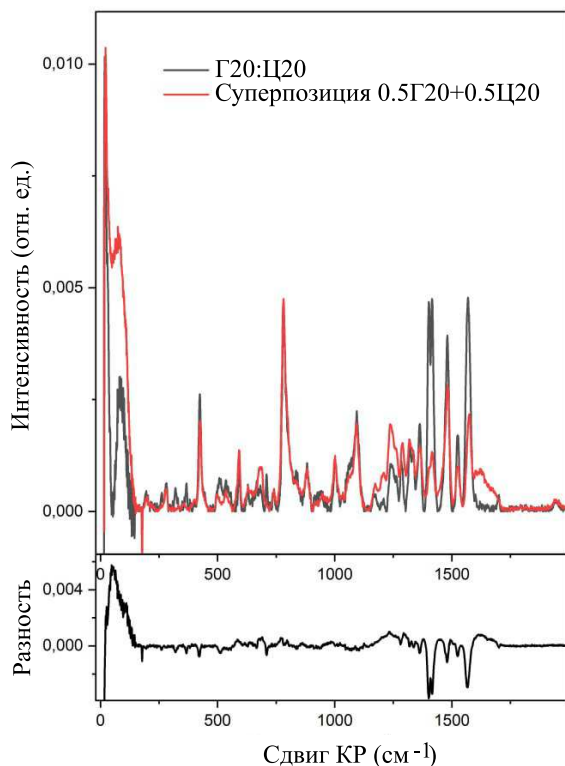


Рис. 4. Экспериментальные НЧ-спектры КР-олигонуклеотида: Г20:Ц20 (черный) и суперпозиция (красный) спектров КР-олигонуклеотидов Ц20 и Г20. На вставке представлена разность приведенных спектров

2.3. Связь интенсивности НЧ КР и динамического беспорядка

Как следует из рис. 3, *a*, относительная интенсивность НЧ-сигнала КР в спектре Г20 меньше, чем в Ц20, и значительно уменьшается для двуцепочечной молекулы по сравнению с одноцепочечными. Соответственно в направлении Ц20–Г20–Г20:Ц20 убывают и рассчитанные на основе спектров КР значения дескриптора динамического беспорядка R (рис. 3, *b*). Согласно гипотезе о связи НЧ КР и интенсивности тепловых флуктуаций, в таком же направлении должна уменьшаться и последняя. Действительно, значения R коррелируют с рассчитанными средними значениями RMSD (см. рис. 2 и рис. 5), что подчёркивает перспективность использования НЧ КР для экспериментальной оценки интенсивности тепловых флуктуаций в биомолекулах. Уменьшение интенсивности тепловых флуктуаций в ряду Ц20–Г20–Г20:Ц20, как было отмечено выше, может быть связано с увеличением энергии взаимодействия нуклеотидов между собой за счёт π -стэкинговых взаимодействий и водородных связей. Отдельно стоит подчеркнуть, что для всех исследованных олигонуклеотидов интенсивность НЧ значительно меньше, чем для плазмидной ДНК, исследованной в работах [17, 21]. В олигонуклеотидах НЧ- и ВЧ-интенсивности сравнимы (см. рис. 3, *a*), а в ДНК НЧ-интенсивность превышает

ет ВЧ-интенсивность на порядок величины [17, 21]. Это объясняется более плотной упаковкой коротких олигонуклеотидов при образовании плёнки и, следовательно, более сильным ограничением движения их атомов (динамического беспорядка) за счёт взаимодействий между нуклеотидами.

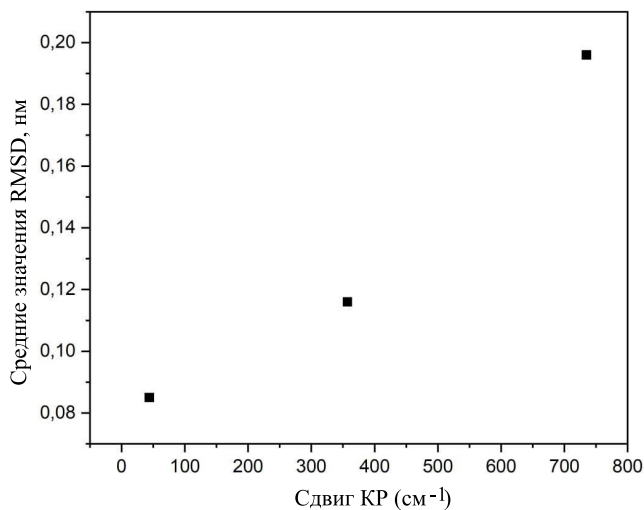


Рис. 5. Корреляция среднего значения RMSD, полученного из МД, и значений R , полученных из экспериментальных спектров КР

Динамический беспорядок в биомолекулах определяется их компактностью: чем более компактна молекула, тем меньше динамический беспорядок. Мы предполагаем, что в свете вышеописанных результатов, НЧ-спектроскопия КР может быть применена и для установления степени их компактности через оценку динамического беспорядка. В частности, данные НЧ КР-микроспектроскопии могут предоставить информацию о компактности ДНК в различных областях клеточного ядра, которая, как указано во Введении, играет ключевую роль в протекании важнейших клеточных процессов. Поскольку спектр НЧ КР одноцепочечной и двуцепочечной ДНК существенно различается, НЧ КР спектроскопия потенциально может выявлять области, где происходит активная транскрипция или репликация, при которых двойная спираль ДНК на некоторое время расплетается. Примечательно, что данные КР-микроспектроскопии можно получать в режиме реального времени и в живой клетке, т.е. зондировать компактность *in vivo*. Полученная информация поможет пролить свет на динамику хроматина — ДНК-белкового комплекса — в различных клеточных процессах. Подобных работ до настоящего времени не проводилось, а НЧ КР-микроспектроскопии применялась лишь для выявления распределения различных молекул [38, 39]: анализировалось наличие или отсутствие полос, в то время как относительная интенсивность НЧ-мод не исследовалась, что не позволяло провести оценку динамического беспорядка.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые получены спектры КР плёнок одноцепочечных олигонуклеотидов цитозина (Ц20) и гуанина (Г20) и двуцепочечных олигонуклеотидов гуанин-цитозин (Г20:Ц20) в широком частотном диапазоне, включающем НЧ- и ВЧ-области. Показано, что интенсивность КР в НЧ-области существенно ниже для Г20, чем для Ц20, а для двуцепочечного олигонуклеотида Г20:Ц20 она существенно ниже, чем для обоих одноцепочечных. Расчёты методом молекулярной динамики показали, что именно в такой последовательности (от Ц20 к Г20 и Г20:Ц20) уменьшается динамический беспорядок; рассчитанные из спектров КР значения дескриптора динамического беспорядка коррелируют с RMSD координат атомов из моделирования. Для всех исследованных олигонуклеотидов НЧ-интенсивность КР значительно меньше, чем для ранее исследованной плазмидной ДНК, что связано с их более плотной упаковкой при плёнокообразовании. Таким образом, полученные результаты показывают, что НЧ-интенсивность спектра КР биомолекул коррелиру-

ет с динамическим беспорядком, т.е. может быть использована для количественной оценки интенсивности тепловых флуктуаций положений атомов в них. В свою очередь, интенсивность тепловых флуктуаций определяется степенью компактности биомолекулы, что может позволить зондировать компактность в разных точках клеточного ядра в различные моменты времени с помощью НЧ КР-микроспектроскопии, отслеживая изменения структуры ядра при важнейших клеточных процессах. Получаемые с помощью такой техники результаты должны существенно углубить представление о протекании таких процессов, а также физических механизмах, вовлечённых в них, что будет способствовать развитию передовых методик молекулярной биофизики и клеточной биологии.

Исследование проведено при поддержке Программы развития МГУ (грант № 23А-Ш04-02). Эксперименты по КР-спектроскопии проведены на оборудовании, поставленном в рамках Программы развития МГУ. Расчёты выполнены на базе Межведомственного суперкомпьютерного центра РАН.

- [1] Альбертс Б., Хопкин А., Джонсон А. и др. *Основы молекулярной биологии клетки*. М.: Лаборатория знаний, 2023.
- [2] Alabert C., Groth A. // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **13**. 153. (2012).
- [3] Razin S.V., Gavrilov A.A. // *Epigenetics*. **9**. 653. (2014).
- [4] Lieberman-Aiden E., van Berkum N.L., Williams L. et al. // *Science*. **326**. 289. (2009).
- [5] Xu J., Liu Y. // *Front. Cell Dev. Biol.* **9**. 653077. (2021).
- [6] Diem M., Boydston-White S., Chiriboga L. // *Appl. Spectr.* **53**. 148. (1999).
- [7] Kassem A., Abbas L., Coutinho A. et al. // *Front. Microbiol.* **14**. 1304081. (2023).
- [8] Globus T.R., Woolard D.L., Khromova T. et al. // *J. Biol. Phys.* **29**. 89. (2003).
- [9] Hobro A.J., Rouhi M., Blanch E.W., Conn G.L. // *Nucleic Acids Research*. **35**. 1169. (2007).
- [10] Cornicchi E., Capponi S., Marconi M. et al. // *Eur. Biophys. J.* **37**. 583. (2008).
- [11] Benevides J.M., Overman S.A., Thomas G.J. // *J. Raman Spectrosc.* **36**. 279. (2005).
- [12] Shipp D.W., Sinjab F., Notingher I. // *Adv. Opt. Photon.* **9**. 315. (2017).
- [13] Bērziņš K., Fraser-Miller S.J., Gordon K.C. // *Int. J. Pharmaceutics*. **592**. 120034. (2021).
- [14] Urabe H., Sugawara Y., Ataka M. et al. // *Biophys. J.* **74**. 1533. (1998).
- [15] Kalanoor B.S., Ronen M., Oren Z. et al. // *ACS Omega*. **2**. 1232. (2017).
- [16] Urabe H., Tominaga Y. // *Biopolymers*. **21**. 2477. (1982).
- [17] Gorelik V.S., Pyatyshev A.Yu. // *Phys. Wave Phenom.* **22**, 252. (2014).
- [18] Lamba O.P., Wang A.H.-J., Thomas G.J.Jr. // *Biopolymers*. **28**. 667 (1989).
- [19] Edwards G., Liu C. // *Phys. Rev. A*. **44**. 2709. (1991).
- [20] Weidlich T., Lindsday S. // *J. Phys. Chem.* **92**. 6479. (1988).
- [21] Сосорев А.Ю., Парашчук О.Д., Харланов О.Г. и др. // *Письма в ЖЭТФ*. **116**. 333. (2022).
- [22] Erfurth S.C., Kiser E.J., Peticolas W.L. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **69**. 938. (1972).
- [23] Vener M.V., Parashchuk O.D., Kharlanov O.G. et al. // *Adv. Electron. Mater.* **7**. 2001281. (2021).
- [24] Kharlanov O.G., Maslennikov D.R., Feldman E.V. et al. // *Adv. Electron. Mater.* **7**. 2100579. (2021).
- [25] Sosorev A.Yu., Parashchuk O.D., Tukachev N.V. et al. // *Phys. Chem. Chem. Phys.* **23**. 15485. (2021).
- [26] Sosorev A.Yu., Vener M.V., Kharlanov O.G. et al. // *J. Phys. Chem. C*. **127**. 17948. (2023).
- [27] Lee S.Y. // *J. Chem. Phys.* **78**. 723. (1998).
- [28] Uversky V.N. // *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. **166**. 1. (2019).
- [29] Gutiérrez R., Caetano R., Woiczikowski B. et al. // *Phys. Rev. Lett.* **102**. 208102. (2009).
- [30] Abraham M.J., Murtola T., Schulz R. et al. // *SoftwareX*. **1**. 19. (2015).
- [31] Cornell W.D., Cieplak P., Bayly C.I. et al. // *J. Am. Chem. Soc.* **117**. 5179. (1995).
- [32] González-Jiménez M., Ramakrishnan G., Tukachev N.V. et al. // *Phys. Chem. Chem. Phys.* **23**. 13250. (2021).
- [33] Urabe H., Hayashi H., Tominaga Y. et al. // *J. Chem. Phys.* **82**. 531. (1985).
- [34] Painter P.C., Mosher L., Rhoads C. // *Biopolymers*. **20**. 243. (1981).
- [35] Perepelytsya S.M., Volkov S.N. // *Eur. Phys. J. E*. **31**. 201. (2010).
- [36] Bubon T.L., Perepelytsya S.M. // *Eur. Phys. J. E*. **44**. 84. (2021).
- [37] Urabe H., Tominaga Y. // *J. Phys. Soc. Jap.* **50**. 3543. (1981).

- [38] Ren L., Raanan D., Hurwitz I. et al. // *Optics Express*. **27**. 35994. (2019).
 [39] Ren L., Hurwitz I., Raanan D. et al. // *Optica*. **6**. 52. (2019).

Assessment of dynamic disorder in DNA oligonucleotides using low-frequency Raman spectroscopy

A.Y. Sosorev^{1,2,3,a}, O.D. Parashchuk¹, A.A. Trubitsyn¹, N.O. Dubinets⁴, I.V. Chicherin¹,
 D.Y. Paraschuk¹

¹*Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University. Moscow 119991, Russia*

²*Enikopolov Institute of Synthetic Polymeric Materials of RAS. Moscow 117393, Russia*

³*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, of RAS. Moscow 117997, Russia*

⁴*FSRC «Crystallography and Photonics» of RAS. Moscow 119421, Russia*

⁵*Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University. Moscow 119991, Russia*

E-mail: ^asosorev@physics.msu.ru

The degree of DNA compaction in various regions of the cell nucleus determines whether the corresponding genes should be expressed, and whether other important cellular processes, such as DNA replication and repair, should take place. However, approaches to the experimental assessment of the compactness of DNA in cell nuclei, as well as its indicator, dynamic disorder — thermal fluctuations in the position and mutual orientation of molecular fragments — are practically not developed. In this paper, using single-stranded oligonucleotides guanine and cytosine, as well as their double-stranded combination as an example, we show that dynamic disorder in DNA can be estimated using low-frequency Raman spectroscopy. For the first time, the Raman spectra of oligonucleotides were measured in a wide range including the low-frequency and high-frequency regions. It was found that the low-frequency Raman intensity is maximal for single-stranded oligocytosine and minimal in double-stranded oligonucleotide, in full agreement with the magnitude of dynamic disorder estimated from the molecular dynamics simulations. The results obtained indicate the prospects of using low-frequency Raman spectroscopy to assess the dynamic disorder and compactness of DNA. It is expected that the use of such a technique should contribute to the understanding of key cellular processes and their underlying physical mechanisms, which is necessary for the development of advanced methods of molecular biophysics and cell biology.

PACS: 87.15.M

Keywords: nucleic acids, chromatin, biophysics, vibrational spectroscopy, cell nucleus.

Received 11 December 2023.

English version: *Moscow University Physics Bulletin*. 2024. **79**, No. . Pp. .

Сведения об авторах

1. Сосорев Андрей Юрьевич — канд. физ.-мат. наук, науч. сотрудник; тел.: (495) 939-22-28, e-mail: sosorev@physics.msu.ru.
2. Парашук Ольга Дмитриевна — канд. физ.-мат. наук, ассистент; тел.: (495) 939-22-28, e-mail: olga_par@physics.msu.ru.
3. Трубицын Артём Алексеевич — студент; тел.: (495) 939-22-28, e-mail: trubitsyn.aa18@physics.msu.ru.
4. Дубинец Никита Олегович — канд. физ.-мат. наук, мл. науч. сотрудник; тел.: (495) 939-22-28, e-mail: nikita.dubinets@gmail.com.
5. Чичерин Иван Владимирович — канд. биол. наук, науч. сотрудник; тел.: (495) 939-54-85, e-mail: i.v.chicherin@gmail.com.
6. Парашук Дмитрий Юрьевич — доктор физ.-мат. наук, профессор; тел.: (495) 939-22-28, e-mail: paras@physics.msu.ru.