

Berenil과 d(CGTATACG)₂ Duplex의 결합에 관한 핵자기공명연구

許性浩* · 金銀姬 · 鄭宰準[†]

충남대학교 자연과학대학 생화학과

[†]기초과학지원연구소 자기공명그룹

(1997. 7. 28 접수)

NMR Study on Binding Berenil to a d(CGTATACG)₂ Duplex

Sungho Huh*, Eunhee Kim, and Chaejoon Cheong[†]

Department of Biochemistry, Chungnam National University, Taejon 305-764, Korea

[†]Magnetic Resonance Group, Korea Basic Science Institute, Taejon 305-333, Korea

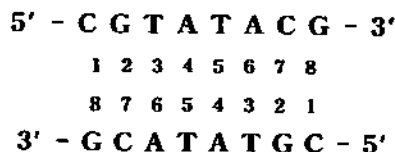
(Received July 28, 1997)

DNA는 생물학적 기능을 수행하는 과정에서 여러 종류의 단백질과 선택적 또는 비선택적으로 결합한다. DNA중합효소, 박테리아 HU단백질과 DNase I은 비선택적으로 DNA에 결합하나, 유전자 발현의 조절에 관여하는 많은 단백질들은 매우 선택적으로 DNA와 결합한다. 결합반응에서 수소결합 상보성 (hydrogen bonding complementarity), 전자적 상보성 (electronic complementarity), 입체장애 (steric hindrance), 국부구조 (local structure), 그리고 수화상태 (hydration) 등이 선택특이성에 영향을 주는 것으로 알려져 있으며 이들은 모두 DNA의 염기서열과 직접적인 관계를 가지고 있다.^{1,2} 따라서 DNA와 단백질사이의 결합반응에 관한 연구는 DNA의 생물학적 기능의 정확한 규명을 위해 매우 중요하다고 생각된다. 따라서 본연구에서는 특정 리간드가 DNA에 결합했을 때 나타나는 DNA 구조의 변화를 관찰하고자 하였다. Model oligonucleotide로 사용된 d(CGTATACG)는 DNA합성기(ABI 391 model)를 사용하여 β -cyanoethyl phosphoramidite chemistry법으로 합성한 다음 dialysis법으로 정제하였다. 리간드로는 분자 양 끝에 amidino기를 가지고 있으면서 DNA 이중나선의 minor groove에 결합하는 berenil분자를 선택하였다. Berenil[1,3-bis(4'-amidinophenyl) triazene]은 약한 세포독성과 antiviral 특성을 나타내는 화합물로서 bovine trypanosomiasis의 치료제로 이용되고 있는 물질이다(Fig. 1).³ Berenil과 이중나선 DNA사이의 염기

서열 특이적(base-sequence specific)결합반응은 DNase I과 hydroxy radical footprinting방법에 의해서 확인된 바 있으며,⁴ d(CGCGAATTCGCG)₂와 d(GCAATTGC)₂를 모형 DNA로 이용한 연구 결과에 의하면 berenil은 DNA minor groove의 5'-AAT-3' 부분에 선택적으로 결합하는 것으로 알려져 있다.⁵⁻⁸ 최근에는 이 분자가 A-T 염기쌍이 많은 DNA의 minor groove에 결합할 뿐만 아니라 intercalation도 할 수 있다는 주장이 제기되어 논란이 되고 있다.^{9,10}

리간드에 의한 DNA형태의 변화를 관찰하기 위해 ¹H NMR기법과 2-Dimensional Nuclear Overhauser

Model Oligonucleotide



Berenil

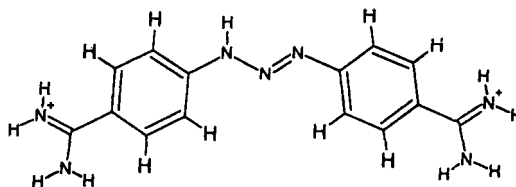


Fig. 1. Model oligonucleotide and berenil.

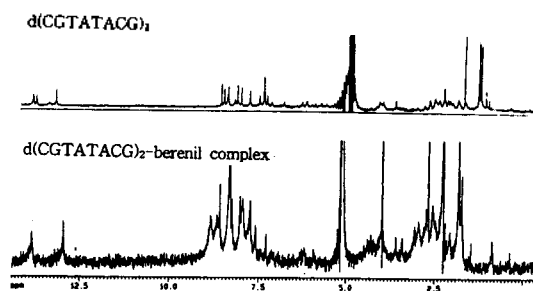


Fig. 2. ^1H NMR spectra of $d(\text{CGTATACG})_2$ and its berenil complex.

Enhancement Spectroscopy(2-D NOESY)를 이용하였는데, 후자는 대략 5 Å 이내의 가까운 핵들 사이의 nuclear Overhauser enhancement(NOE)의 세기로부터 핵간 거리를 구하는 목적으로 많이 이용된다.¹¹

동결건조된 $d(\text{CGTATACG})_2$ 는 100 mM NaCl이 포함된 20 mM phosphate buffer(pH 7.0) 450 μL 에 녹여 여기에 50 μL 의 D_2O 를 가한 다음 NMR실험에 사용하였고, berenil- $d(\text{CGTATACG})_2$ 복합체는 같은 방법으로 용액을 준비하되 두 화합물의 mole비가 1:1이 되도록 하였다. 먼저 $d(\text{CGTATACG})_2$ 와 $d(\text{CGTATACG})_2$ -berenil 복합체의 ^1H NMR spectra를 비교하면 berenil에 의해 imino수소와 염기 수소(base proton)의 공명신호들이 상당히 변화되었음을 바로 알 수 있다(Fig. 2). 누클레오타이드의 교환가능한 수소핵(exchangeable proton)들은 순차적 NOE connectivity와 여러 온도에서 관찰된 수소핵 공명신호의 선평에 의해, 교환불가능한 수소핵(nonexchangeable proton)들은 순차적 NOE connectivity를 참고하여 지정(assignment)하였다(Table 1).

2-dimensional NOESY 스펙트럼중 imino 수소핵들의 공명신호들을 살펴보면 G2와 T3 imino 수소핵들 사이에서만 NOE가 관찰되었고 이들은 berenil결합의 영향을 받지 않았다. 그러나 T5 imino 수소핵의 공명신호는 berenil과 결합한 후에 상당히 약해졌을 뿐만 아니라 chemical shift도 downfield 방향으로 0.35 ppm 움직였다. 이는 T3 imino 수소핵이 berenil 결합 후 같은 방향으로 0.16 ppm 움직인 것에 비하면 상당히 큰 변화로서 이는 T5 imino 수소가 berenil 결합부위에 위치하거나 또는 T3 imino 수소보다 결합부위에 더 가까운 곳에 위치함을 의미한다(Fig. 3).

Table 2는 $d(\text{CGTATACG})_2$ 와 berenil- $d(\text{CGTATACG})_2$

Table 1. Assignments of ^1H NMR signals of a $d(\text{CGTATACG})_2$ duplex (ppm from a TMS signal)

nuclei	$d(\text{CGTATACG})_2$	berenil complex	difference
C1H5	5.95	5.72	-0.23
C1H6	7.70	7.53	-0.17
G2H8	8.04	8.04	0.00
T3H6	7.33	7.38	+0.05
T3CH3	1.56	1.61	+0.05
A4H2	7.33	7.54	+0.21
A4H8	8.40	8.39	-0.01
T5H6	7.24	7.09	-0.15
T5CH3	1.51	1.53	+0.02
A6H2	7.45	7.77	+0.32
A6H8	8.29	8.10	-0.19
C7H5	5.36	5.31	-0.05
C7H6	7.32	7.23	-0.09
G8H8	7.93	7.83	-0.10
C1H1'	5.79	5.71	-0.08
G2H1'	6.04	5.99	-0.05
T3H1	5.78	5.66	-0.12
A4H1'	6.30	5.98	-0.32
T5H1'	5.65	4.60	-1.05
A6H1'	6.20	4.77	-1.43
C7H1'	5.65	4.75	-0.87
G8H1'	6.17	6.09	-0.08
C1H2'	2.11	1.85	-0.26
G2H2'	2.73	2.74	+0.01
T3H2'	2.26	2.26	0.00
A4H2'	2.71	2.51	-0.20
T5H2'	2.09	1.85	-0.24
A6H2'	2.69	2.34	-0.35
C7H2'	1.91	-	-
G8H2'	2.38	2.32	-0.06
C1H2''	2.51	2.34	-0.17
G2H2''	2.86	2.84	-0.02
T3H2''	2.59	2.49	-0.10
A4H2''	3.00	2.72	-0.28
T5H2''	2.47	2.04	-0.43
A6H2''	2.86	2.58	-0.28
C7H2''	2.31	-	-
G8H2''	2.62	2.65	+0.03
G2NH	12.78	12.53	-0.25
T3NH	13.45	13.78	+0.33
T5NH	13.30	13.96	+0.66

복합체의 염기수소핵들사이의 순차적 NOE의 상대적인 intensity를 보이고 있다. A-또는 B-DNA 군에 속하는 DNA에서 같은 가닥의 이웃하는 염기수소들 사이의 거리는 대략 4~5 Å 정도인 것으로 X-ray 회절 실험 결과로부터 알려져 있다.¹² 본 실험에서 구해진

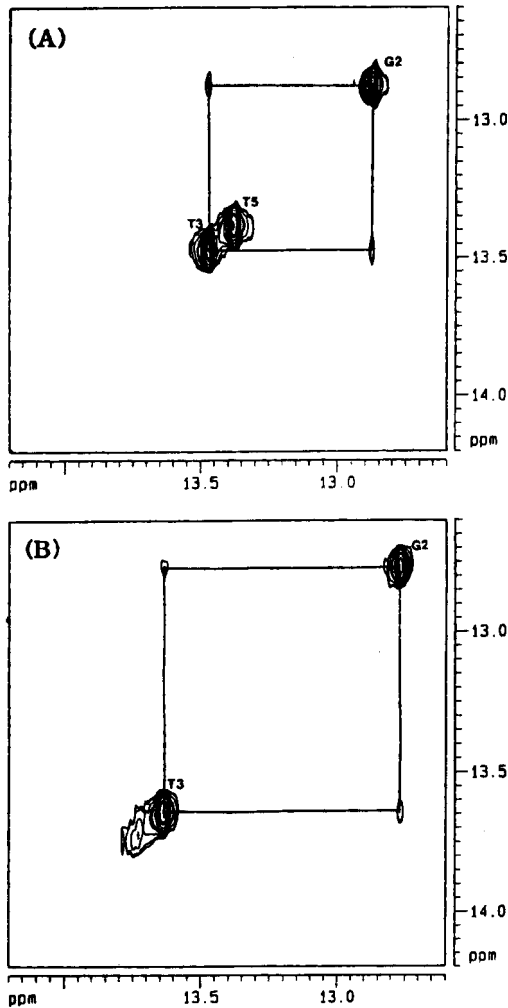


Fig. 3. Imino proton region of 2-D NOESY of d(CGTATACG)₂ (A) and its berenil complex (B).

2-D NOE spectra에서는 G2H8과 T3H6, A4H8과 T5H6, 그리고 A6H8과 C7H6사이에서 비교적 강한 NOE를 보였는데 이는 이중나선의 helical parameter 중 작은 rotation angle이나 roll angle 또는 비정상적인 tilt angle로 인해 이들 염기수소들 사이의 거리가 일반적인 A- 또는 B-DNA군의 경우보다 가까워졌음을 의미한다. Berenil-d(CGTATACG)₂ 복합체에서는 C7H6와 G8H8사이의 NOE connectivity는 전혀 관찰되지 않았으나 그외의 모든 순차적 NOE connectivity는 뚜렷하게 관찰되었다. 이는 berenil에 의해 d(CGTATACG)₂ 이중나선의 3'-terminal 부분인 C7H6와 G8H8사이의 거리가 5 Å이상으로 멀어졌음을

Table 2. The comparison of the sequential NOE intensity

Base protons showing d(CGTATACG) ₂ sequential NOE contact	d(CGTATACG) ₂	-berenil complex
C1H6/G2H8	^a	++
G2H8/T3H6	+++	++
T3H6/A4H8	+++	+++
A4H8/T5H6	+++	+++
T5H6/A6H8	+	++
A6H8/C7H6	+++	++
C7H6/G8H8	++	-

^a(+++), (++) and (+) denote strong, medium and weak NOE contact, respectively. And (-) denotes no NOE contact was observed.

보여준다. 그리고 G2H8과 T3H6, A6H8과 C7H6사이의 거리는 berenil에 의해 조금 더 멀어졌으며, C1H6와 G2H8, T5H6와 A6H8사이의 거리는 오히려 가까워졌음을 알 수 있다.

A- 및 B-DNA의 deoxyribose H1'은 같은 뉴클레오타이드의 염기수소(pyrimidine계 염기의 H6 또는 purine계 염기의 H8)로부터 약 3.6~3.8 Å의 거리에 있으며,¹² 또 3'방향과 이웃하는 뉴클레오타이드의 염기수소(H6 또는 H8)와 4.6 Å(A-DNA) 또는 3.5 Å(B-DNA)정도의 거리에 위치하고 있어 순차적 NOE connectivity를 뚜렷하게 보인다. 이러한 H1'의 특성은 H1'과 염기수소들의 지정(assignment)에 흔히 이용된다. Fig. 4는 H1'과 H6 또는 H8사이의 NOE connectivity를 보이고 있다. 이중나선 d(CGTATACG)₂에서 H1'은 동일 뉴클레오타이드의 염기수소와 3'방향으로 이웃하는 뉴클레오타이드의 염기수소사이에서 대체로 거의 비슷한 세기의 NOE를 보였으나 T3H1'은 T3H6보다는 A4H8사이에서 더 강한 NOE를 보였고, T5와 C7의 H1'은 3'방향의 이웃한 base의 수소보다 동일 nucleotide의 base수소와 더 강한 NOE connectivity를 보였다. 그리고 7.25 ppm과 8.25 ppm에서 C1H5와 강한 NOE를 나타내는 peak가 관찰되는데 이는 C1NH₂의 두 수소에 의한 것으로서 각각 guanine과의 수소결합에 관여하지 않는 수소와 수소결합에 관여하는 수소에 의한 것이다. Berenil이 결합하면서 H1'과 염기수소들의 chemical shift와 이들사이의 NOE가 상당히 변하였다. 특히 T5, A6와 C7의 H1'의 chemical shift는 거의 1 ppm 또는 그 이상의 큰 폭으로 upfield 방향으로 이동하였다. 이러한 현상은 d

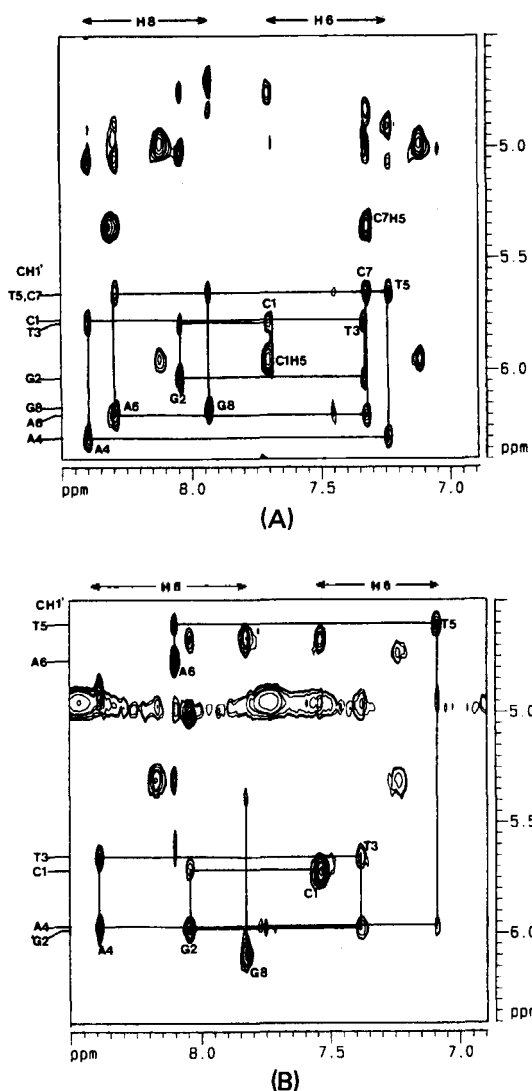


Fig. 4. Sequential NOE connectivities between H1' and base protons of d(CGTATACG)₂ (A) and its berenil complex (B).

(GCAATTGC)₂와 d(CGCGAATTCGCG)₂에서도 관찰되었는데^{6,7} 이 결과들을 종합하면 octamer에서는 5번과 6번 위치, 그리고 dodecamer에서는 7번과 8번 위치의 H1'가 berenil과의 반응에 의해 비교적 심하게 chemical shift가 upfield로 이동됨을 알 수 있었다. Berenil 결합 후 A4H1'과 T5H6, A6H1'과 C7H6사이의 NOE가 눈에 띄게 약화되었으나, 다른 H1'이 관여하는 NOE에서는 변화가 거의 관찰되지 않았다(Table 3).

이상의 결과에서 d(CGTATACG)₂에 berenil이 결

Table 3. The comparison of NOE intensity between the base proton and the deoxyribose H1'

Protons showing NOE contacts	d(CGTATACG) ₂	d(CGTATACG) ₂ -berenil complex
C1H6/C1H1'	++ ^a	+++
C1H1'/G2H8	++	++
G2H8/G2H1'	+++	+++
G2H1'/T3H6	+++	++
T3H6/T3H1'	++	++
T3H1'/A4H8	+++	+++
A4H8/A4H1'	+++	+++
A4H1'/T5H6	+++	+
T5H6/T5H1'	+++	+++
T5H1'/A6H8	++	++
A6H8/A6H1'	+++	+++
A6H1'/C7H6	+++	+
C7H6/C7H1'	+++	++
C7H1'/G8H8	++	++
G8H8/G8H1'	+++	+++

^a(+++), (++) and (+) denote strong, medium and weak NOE contact, respectively.

합하면 A4, T5와 A6의 세 뉴클레오타이드 수소들과 C7H1'이 심하게 영향을 받는 것을 알 수 있었다. A4H2와 A6H2는 berenil에 의해 chemical shift가 downfield방향으로, T5H6와 A6H8는 upfield방향으로 움직였으며, T3와 T5의 imino 수소는 berenil에 의해 downfield방향으로, G2의 imino 수소는 upfield방향으로 이동하였다. 또한 A4, T5와 A6의 H1', H2과 H2' 수소들은 모두 upfield 방향으로 크게 변하는 것이 관찰되었다. 이는 berenil의 benzene고리와 뉴클레오타이드 수소의 상대적 위치에 따른 benzene고리의 ring current효과 때문일 것이나 정확한 설명은 더 많은 실험이 수행된 후에 가능할 것으로 생각된다. 관찰된 NOE 세기로부터 핵간 거리를 정성적으로 추정하면 A4H1'과 T5H6사이, A6H1'과 C7H6사이의 거리가 berenil과의 결합에 의해 비교적 큰 폭으로 증가하였음을 알 수 있다. 이들 실험결과만으로는 berenil-d(CGTATACG)₂복합체의 구체적인 conformation과 helical parameter들의 값을 알 수 없으나, 실험결과를 기초한 정성적인 판단에 의한다면 berenil은 d(CGTATACG)₂의 4, 5, 6위치인 -ATA-부분의 minor groove에 결합하는 것으로 생각된다.

이 논문은 1995년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었음.

인용문헌

1. Record, Jr., M. T.; Mazur, S. J.; Melancon, P.; Rose, J. H.; Shaner, S. L.; Unger, L. *Ann. Rev. Biochem.* **1981**, *50*, 997.
2. von Hippel, P. H.; Berg, O. G. in *Protein-Nucleic Acid Interaction*; Saenger, W.; Heinemann, U.; Eds.; Macmillan Press: London, 1989; p 1.
3. Clercq, D.; Dann, O. *J. Med. Chem.* **1980**, *23*, 787.
4. Portugal, J.; Waring, M. *J. Eur. J. Biochem.* **1987**, *167*, 281.
5. Zimmer, C.; Wähnert, U. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1986**, *47*, 31.
6. Yoshida, M.; Banville, D. L.; Shafer, R. H. *Biochemistry* **1990**, *29*, 6585.
7. Lane, A. N.; Jenkins, T. C.; Brown, T.; Neidle, S. *Biochemistry* **1991**, *30*, 1372.
8. Hu, S.; Weisz, K.; James, T. L.; Shafer, R. H. *Eur. J. Biochem.* **1992**, *204*, 31.
9. Pilch, D. S.; Kirolos, M. L.; Lieu, X.; Plum, G. E. Breslauer, K. J. *Biochemistry* **1995**, *34*, 9962.
10. Yoo, S.; Huh, S.; Shin, J.; Cheong, C. *Bull. Korean Chem. Soc.* **1966**, *17*, 109.
11. Jeener, J.; Meier, B. H.; Bachmann, P.; Ernst, R. R. *J. Chem. Phys.* **1979**, *71*, 4546.
12. Wüthrich, K. *NMR of Proteins and Nucleic Acids*; John Wiley and Sons: New York, 1986; p 214.