

# Исследование комплексообразования акридинового красителя профлавина с дезокситетрарибонуклеозидтрифосфатом 5'-d(TrGrCpA) в водном растворе методом <sup>1</sup>H-ЯМР спектроскопии

Р. Д. Итон<sup>1</sup>, Д. А. Веселков<sup>1</sup>, Л. Н. Дымант, С. Ф. Барановский, С. Г. Осетров, Д. Б. Дэвис<sup>1</sup>, А. Н. Веселков

Севастопольский государственный технический университет Министерства образования Украины 335053, Севастополь, Студгородок

<sup>1</sup> Лондонский университет, Беркбек колледж  
Лондон WC1N 0PP, Великобритания

*Исследовано взаимодействие красителя акридинового ряда профлавина с самокомплементарным дезокситетрарибонуклеозидтрифосфатом 5'-d(TrGrCpA) в водно-солевом растворе методом одномерной и двумерной <sup>1</sup>H-ЯМР спектроскопии (500 МГц). Измерены концентрационные и температурные зависимости протонных химических сдвигов взаимодействующих молекул. Рассмотрены различные модели образования комплексов молекул красителя с тетрауклеотидом, рассчитаны равновесные константы, энтальпии  $\Delta H$  и энтропии  $\Delta S$  реакций образования комплексов состава 1:1, 2:1, 1:2 и 2:2. Выявлены особенности динамического равновесия комплексов различного типа в зависимости от соотношения концентраций красителя и тетрауклеотида. Сделано заключение о преимущественной интеркаляции профлавина в пиримидин-пуриновые TG- и CA-сайты тетрауклеотида. Сравнение закономерностей интеркаляционного взаимодействия профлавина и исследованного ранее фенантридинового красителя бромистого этидия показало, что интенсивность селективного связывания ароматических лигандов с пиримидин-пуриновыми сайтами дезокситетрануклеотидов зависит от их состава и от вида оснований, фланкирующих места посадки лиганда. На основании рассчитанных значений индуцированных химических сдвигов для протонов красителя и данных 2D-NOESY определены наиболее вероятные пространственные структуры 1:2- и 2:2-комплексов профлавина с тетрауклеотидом.*

**Введение.** Акридиновые красители относятся к наиболее изученным представителям биологически активных низкомолекулярных веществ. Благодаря способности связываться с нуклеиновыми кислотами путем интеркаляции акридиновые красители обладают бактериостатическими и мутагенными свойствами [1]. Исследование физической природы сиквенс-специфичности взаимодействия лигандов с короткими фрагментами нуклеиновых кислот по-

зволяет сделать определенные выводы о молекулярном механизме физиологического действия биологически активных веществ при их связывании с ДНК. Экспериментальные результаты свидетельствуют о том, что существует определенная вероятность комплексообразования ароматических лигандов с различными типами последовательностей как с одно-, так и с двухцепочечными [2—8], причем специфика связывания может изменяться при взаимодействии красителя с мономерными и дуплексными формами олигонуклеотидов [6—8]. Это предполагает необходимость проведения таких исследо-

© Р. Д. ИТОН, Д. А. ВЕСЕЛКОВ, Л. Н. ДЫМАНТ,  
С. Ф. БАРАНОВСКИЙ, С. Г. ОСЕТРОВ, Д. Б. ДЭВИС,  
А. Н. ВЕСЕЛКОВ, 1998

ваний с фрагментами нуклеиновых кислот, содержащими всевозможные комбинации оснований в цепи, для получения исчерпывающей информации о характере избирательного связывания лигандов с тем или иным сайтом в олигонуклеотидной последовательности. Установлено [6, 9, 10], что акридиновый краситель профлавин преимущественно взаимодействует с пиримидин-пуриновой CG-последовательностью оснований в тетра-нуклеотидном дуплексе, при этом энергетика интеркаляционного связывания красителя зависит от нуклеотидов, фланкирующих сайты преимущественной посадки лиганда. В данной работе методом одномерной и двухмерной  $^1\text{H}$ -ЯМР спектроскопии (500 МГц) исследовано взаимодействие профлавина с самокомплементарным дезокситетрануклеотидом 5'-d(TrGrCrA) в водно-солевом растворе. Такой олигонуклеотид содержит два участка с пиримидин-пуриновой последовательностью оснований, отличающихся нуклеотидным составом — d(TrG) и d(CrA), к которым профлавин проявляет сиквенс-специфичность взаимодействия в дуплексе. Ранее [8, 11] в идентичных экспериментальных условиях нами изучено связывание фенантридинового красителя бромистого этидия с дезокситетрануклеотидом d(TrGrCrA) в водно-солевом растворе методом 1M- и 2M- $^1\text{H}$ -ЯМР спектроскопии. Сравнительный анализ параметров комплексообразования двух интеркалирующих красителей, имеющих различную структуру хромофоров, с одними и теми же олигонуклеотидными дуплексами важен для установления физической природы сиквенс-специфичности связывания лигандов с определенными нуклеотидными последовательностями.

Условия эксперимента. Профлавин («Sigma», США) (рис. 1) использовали без дополнительной очистки, лиофилизировали из  $\text{D}_2\text{O}$  с изотопной чистотой 99,95 % D («Sigma») и растворяли в дейтерированном 0,1 М фосфатном буфере (pD = 7,1). Концентрацию красителя определяли спектрофотометрически — для профлавина коэффициент экстинкции  $\epsilon = 41000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  ( $\lambda = 444 \text{ nm}$ ) при концентрации красителя  $< 5 \cdot 10^{-4}$  моль/л [12]. Дезокситетрарибонуклеозидтрифосфат 5'-d(TrGrCrA) синтезирован компанией «Oswel DNA Service» (Великобритания). Образец лиофилизировали из  $\text{D}_2\text{O}$  и растворяли в дейтерированном 0,1 М фосфатном буфере, содержащем  $10^{-3}$  моль/л EDTA (pD = 7,1).

1M- и 2M- $^1\text{H}$ -ЯМР спектры измерены на спектрометре «Bruker DMX» с резонансной частотой 500 МГц. Остаточный сигнал НОД насыщался в период детектирования. Химический сдвиг определяли относительно ДСС (2,2-диметил-2-силапен-

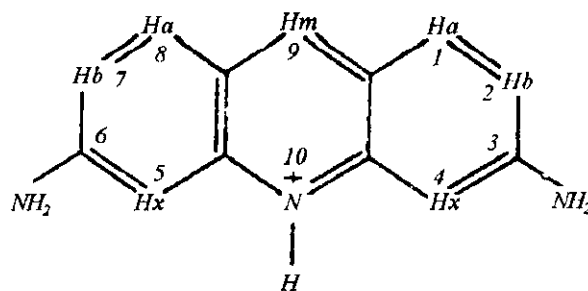
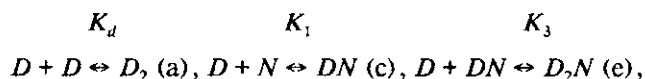


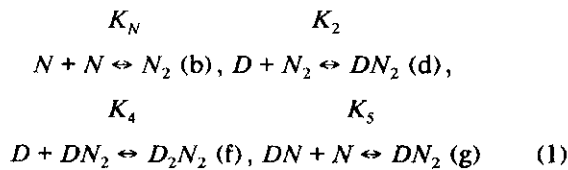
Рис. 1. Структурная формула молекулы профлавина

тан-5-сульфокислота), в качестве внутреннего стандарта использовали ТМА (бромид тетраметиламмония). Измерения проводили в стандартных ампулах с внешним диаметром 5 мм, минимальный объем раствора — 0,5 мл. Концентрационные измерения протонных химических сдвигов молекул выполнены при температуре  $T = 303 \text{ K}$  в интервале концентраций от 3÷4 до 0,1 ммоль/л. Температурные зависимости химических сдвигов протонов молекул в смешанном растворе измерены в диапазоне температур от 283 до 353 К. Двухмерные гомоядерные TOCSY и NOESY эксперименты, использованные для отнесения сигналов необменивающихся протонов молекул и для качественного определения характера комплексообразования красителя с олигонуклеотидом, измеряли при  $T = 303 \text{ K}$ . Условия проведения двухмерных ЯМР экспериментов описаны ранее [6].

Результаты и обсуждение. Предварительное отнесение сигналов протонов профлавина и исследуемого тетра-нуклеотида 5'-d(TrGrCrA) [13] позволило отождествить спектры смешанных растворов и выявить возможные связи ядер молекул красителя и тетрамера.

Измеренные концентрационные зависимости химических сдвигов протонов профлавина в растворе с d(TGCA) представлены на рис. 2. Качественно сходные экспериментальные концентрационные зависимости химических сдвигов наблюдаются и для протонов бромистого этидия в растворе с 5'-d(TrGrCrA) [8]. Для количественного анализа взаимодействия красителя с тетра-нуклеотидом рассмотрена наиболее общая схема образования молекулярных ассоциатов в растворе [8]:





Учтено, что в растворе имеет место динамическое равновесие взаимодействующих молекул, включающее в себя различные процессы образования комплексов красителя с тетрамером, а также реакции самоассоциации молекул. Предусмотрена возможность образования комплекса  $DN_2$  (состава 1:2) профлавиона с тетрануклеотидом двумя различными способами — непосредственное связывание красителя с дуплексом (реакция 1d) и путем взаимодействия мономера тетрануклеотида с комплексом 1:1  $DN$  (реакция 1g), где профлавин играет роль «скрепки» [6]. При использованных в эксперименте концентрациях красителя ( $D_0 \approx 10^{-3}$  М) можно ограничиться процессом димеризации молекул, константа димеризации профлавиона  $K_d$  при  $T = 303$  К принята равной 260 л/моль [14]. Величина константы  $K_N$  самоассоциации тетрануклеотида при  $T = 303$  К составляет 69,8 л на 1 моль дуплекса [13]. Химические сдвиги  $\delta$  рассчитывали с использованием аддитивной модели [6]:

$$\begin{aligned}
 \delta = D/D_0(\delta_m + 2K_dD\delta_d + K_1N\delta_1 + K_NK_2N^2\delta_2 + \\
 + 2K_1K_3DN\delta_3 + 2K_NK_2K_4DN^2\delta_4 + K_1K_5N^2\delta_5). \quad (2)
 \end{aligned}$$

Здесь  $D_0$  — исходная молярная концентрация

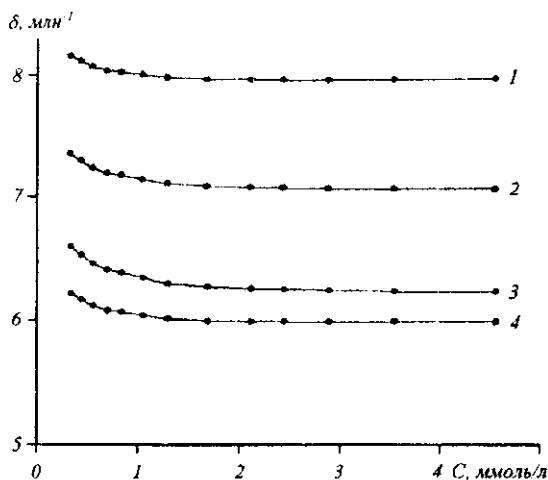


Рис. 2. Экспериментальная зависимость химических сдвигов протонов профлавиона от концентрации тетрануклеотида при постоянной концентрации профлавиона  $D_0 = 0,91 \cdot 10^{-3}$  М ( $T = 303$  К): 1 — Н9; 2 — Н1, Н8; 3 — Н2, Н7; 4 — Н4, Н5

красителя;  $D$  и  $N$  — равновесные молярные концентрации мономеров профлавиона и тетрануклеотида;  $\delta_m, \delta_d, \delta_1, \delta_2, \delta_3, \delta_4, \delta_5$  — протонные химические сдвиги молекулы красителя в мономерной ( $D$ ), димерной ( $D_2$ ) формах и в составе комплексов 1:1 ( $DN$ ), 1:2 ( $DN_2$ , реакция 1d), 2:1 ( $D_2N$ ), 2:2 ( $D_2N_2$ ) и 1:2 ( $DN_2$ , реакция 1g) соответственно. Величины  $\delta_m$  и  $\delta_d$  определены ранее в [14] при исследовании самоассоциации профлавиона в тех же условиях (0,1 М фосфатный буфер). Тогда наблюдаемый химический сдвиг  $\delta$  является функцией неизвестных  $\delta_1$ — $\delta_5, K_1$ — $K_5$ . Такую многопараметрическую задачу решали, как и ранее [6—8], — методом последовательного усложнения модели. Вычислительная процедура нахождения параметров модели, основанная на минимизации квадратичного функционала невязки с использованием концентрационных зависимостей химических сдвигов различных протонов красителя, достаточно подробно описана в [6, 7, 14]. Значения параметров, рассчитанных по общей схеме (1), представлены в табл. 1.

Сравнение равновесных констант образования комплексов 1:1, 2:1, 1:2 и 2:2 профлавиона с дезокситетрануклеотидом d(TGCA) со значениями констант  $K_1$ — $K_5$  для подобных комплексов с бромистым этидием [8] показывает, что качественно они соотносятся друг с другом примерно одинаковым образом. Вместе с тем количественные значения равновесных констант комплексообразования фенантридинового красителя с тетрамером существенно выше, чем акридинового, что согласуется с выводами работы [15]. Можно предположить, что это связано с различным характером интеркаляционного связывания красителей с олигонуклеотидом: профлавин встраивается со стороны большой, а бромистый этидий — со стороны малой бороздки спирали. Высокие значения констант образования комплексов бромистого этидия с тетрамером, по-видимому, определяются наличием у хромофора бромистого этидия массивных боковых заместителей — фенольного кольца и этильной группы, создающих энергетически выгодные константы с остовом олигонуклеотидной последовательности. Вместе с тем величина константы  $K_5$  образования комплекса 1:2 профлавиона с d(TGCA) через «скрепку» значительно выше значения этой константы для подобного комплекса тетрануклеотида с бромистым этидием. Это, очевидно, определяется также наличием у хромофора фенантридинового красителя боковых привесков, создающих определенные стерические препятствия при взаимодействии мономера тетрануклеотида с 1:1-комплексом  $DN$ , где бромистый этидий играет роль «скрепки». Вероят-

Таблица 1

Расчетные значения параметров комплексообразования ( $\delta_i$ , млн<sup>-1</sup>;  $K_i$ , л/моль) профлавина с 5'-d(TrGrCpA) в водном растворе ( $T = 303$  К,  $\rho D = 7,1$ )

Протон	$\delta_1$	$\delta_2$	$\delta_3$	$\delta_4$	$\delta_5$	$\delta_m$	$K_1, 10^3$	$K_2, 10^3$	$K_3, 10^3$	$K_4, 10^3$	$K_5, 10^3$
H9	7,00	8,01	7,40	8,10	7,83	8,76	—	—	—	—	—
H1, H8	6,40	6,94	6,80	7,27	6,94	7,90	1,2±0,2	15,0±2,0	6,5±0,9	17,0±3,0	1,5±0,7
H2, H7	5,60	5,95	5,68	6,34	5,72	7,06	—	—	—	—	—
H4, H5	5,76	5,64	5,02	6,14	5,72	6,86	—	—	—	—	—

ность образования в растворе комплекса 2:2 профлавина как с d(TGCA)-, так и с d(CGCG)-последовательностью весьма велика [6], т. е. связывание второй молекулы красителя с дуплексом d(TGCA) так же выгодно, как и посадка одной молекулы в комплексе 1:2. Этот факт свидетельствует о преимущественной интеркаляции красителя в пиримидин-пуриновую последовательность (d(T-G)- и d(C-A)-сайты), при этом связывание профлавина отвечает модели «исключенного соседа» [16], согласно которой интеркаляция молекулы красителя между соседними парами оснований маловероятна. Данный вывод о местах связывания профлавина с дуплексом d(TGCA) подтверждается 2M-NOE-спектрами, на которых отчетливо наблюдаются межмолекулярные кросс-пики H(2,7)-H2'(G) и H(4,5)-H5(C). Указанные кросс-пики имеют относительно низкую интенсивность, что свидетельствует о достаточной удаленности взаимодействующих протонов в комплексе.

Отметим, что количественные значения констант комплексообразования  $K_2$ ,  $K_4$  профлавина с d(TGCA) несколько отличаются от соответствующих констант при связывании красителя с d(CGCG) [6]. Это предполагает зависимость энергии связывания лиганда от состава оснований в пиримидин-пуриновых участках последовательностей.

Что касается индуцированных химических сдвигов протонов профлавина  $\Delta\delta_i = \delta_m - \delta_i$  (где  $i = 1, 2, 3, 4, 5$  соответствуют типу комплекса), то они соотносятся друг с другом подобно тому, как это имеет место для аналогичных типов комплексов красителя с d(CGCG) [6]. В комплексах профлавина с одиночной нитью тетрауклеотида d(TGCA) взаимные ориентации хромофора красителя и соседних оснований в местах «частично интеркалированного» связывания первой и второй молекул красителя сходны, поскольку  $\Delta\delta_1 \approx \Delta\delta_3$ . Это, оче-

видно, определяется большой конформационной свободой одноцепочечной последовательности. В случае же взаимодействия профлавина с дуплексом тетрауклеотида величины индуцированных химических сдвигов  $\Delta\delta_i$  при связывании двух молекул красителя заметно меньше, чем  $\Delta\delta_2$  при интеркаляции только одной молекулы. Уменьшение экранирования протонов в комплексе 2:2 по сравнению с 1:2 предполагает несколько различную взаимную ориентацию хромофора профлавина и плоскостей пар оснований в этих комплексах — меньшую глубину встраивания красителя между парами оснований в 2:2 по сравнению с комплексом 1:2, а также большее расстояние между парами оснований в местах интеркаляции в комплексе 2:2. Рассчитанные значения индуцированных химических сдвигов протонов профлавина  $\Delta\delta_2$  и  $\Delta\delta_5$  в 1:2-комплексах близки между собой. Это свидетельствует о том, что геометрия 1:2-комплекса не зависит от того, каким путем шло его образование.

По найденным значениям констант реакций (см. табл. 1) было рассчитано относительное содержание молекулярных ассоциатов в растворе в зависимости от  $r = N_2 D_0$  — соотношения исходных концентраций дуплекса тетрауклеотида и красителя (рис. 3). Характерно, что здесь проявляются те же общие закономерности, которые имели место при комплексообразовании профлавина с тетрауклеотидом d(CGCG) [6]. Отметим тот факт, что вклад в общее равновесие различного типа комплексов определяется не только значениями равновесных констант реакций, но зависит существенно и от  $r$ . Качественное объяснение характера зависимостей, представленных на рис. 3, дано в работе [6]. Анализ динамического равновесия при комплексообразовании молекул важен для установления вклада каждого типа комплекса в экспериментально наблюдаемый протонный химический сдвиг и для корректного анализа двухмерных спектров 2M-

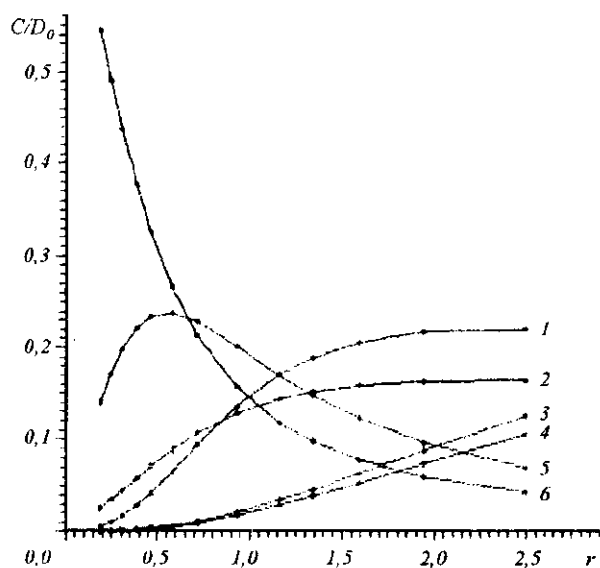


Рис. 3. Относительное содержание молекулярных комплексов в растворе в зависимости от отношения исходных концентраций дуплекса и красителя  $r = N_2/D_0$  ( $D = 0,91 \cdot 10^{-3}$  М,  $T = 303$  К). Комплексы: 1 — 2:2 ( $D_2N_2$ ); 2 — 1:1 ( $DN$ ); 3 — 1:2 ( $DN_2$ , реакция 1d); 4 — 1:2 ( $DN_2$ , реакция 1g); 5 — 2:1 ( $D_2N$ ); 6 — мономер красителя ( $D$ )

NOESY, когда возникает вопрос о расчете структур образующихся комплексов по значениям интенсивностей сигналов NOE [6—8].

**Структура комплексов.** Структуры комплексов профлавина с  $d(TGCA)$  анализировали на основании рассчитанных предельных значений протонных химических сдвигов и данных 2M-NOESY. Использовали модифицированную модель эквивалентных магнитных диполей [6, 7], созданную вследствие аппроксимации квантово-механических кривых экранирования для оснований нуклеиновых кислот [17].

Очевидно, полученные в результате расчетов величины экранирования протонов профлавина в комплексе 1:2 фактически являются средними для двух возможных мест связывания красителя в пиримидин-пуриновые сайты дезокситетрануклеотида  $5'$ - $d(TGCA)$ . Однако можно полагать, что для симметричной молекулы профлавина структуры комплексов 1:2 не должны существенно зависеть от посадки красителя в пиримидин-пуриновые участки  $5'$ - $d(T-G)$  или  $5'$ - $d(C-A)$  тетрануклеотидного дуплекса в отличие от комплексов с бромистым этидием [8], который не имеет подобной симмет-

рии. При расчетах пространственных структур комплексов профлавина с дуплексом  $d(TGCA)$  использовали алгоритм преобразований координат атомов и программу, реализующую этот алгоритм, разработанные в ИТЭБ РАН [18, 19]. Последовательность преобразования координат в двойной спирали отвечала изменению параметров  $\omega$  (пропеллер),  $k$  (излом пары),  $\tau$  (наклон пары),  $\rho$  (крен),  $D_x$  (сдвиг),  $D_y$  (скольжение),  $\Omega$  (закручивание),  $D_z$  (поднятие) [20]. Вычислительная процедура нахождения конформационных параметров интеркалированного комплекса достаточно подробно описана в [7]. На рис. 4 в различных проекциях представлена рассчитанная наиболее вероятная структура участка комплекса 1:2 профлавина с тетрануклеотидом  $5'$ - $d(TGCA)$ , отвечающая интеркаляции красителя в  $5'$ - $d(T-G)$ -сайт тетрамера. Пространственное изображение структуры получено с помощью программы «Mathematica 2.2» (Wol-

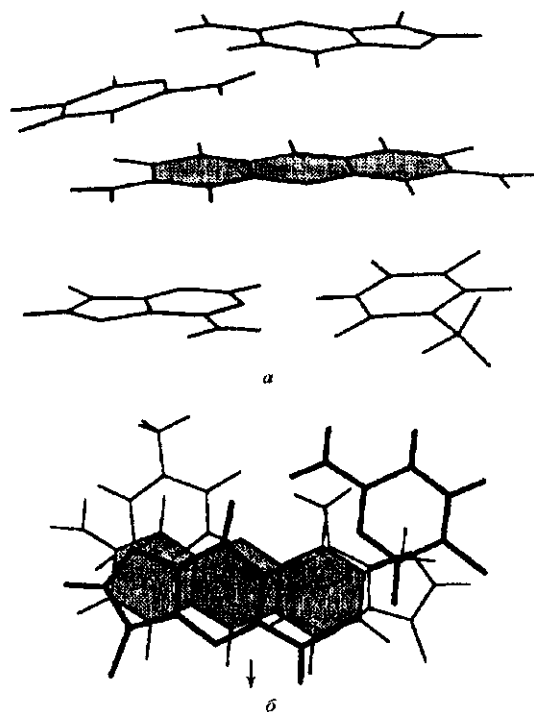


Рис. 4. Расчетная структура участка комплекса 1:2 профлавина с  $5'$ - $d(TGCA)$ , соответствующая интеркаляции красителя в  $TG$ -сайт тетрануклеотида: а — вид на комплекс сбоку со стороны широкой бороздки спирального участка; б — вид на комплекс сверху, стрелка указывает направление к широкой бороздке

gram Res. Ltd). Интеркалированный комплекс характеризуется следующими параметрами спирали:  $D_z = 6,8 \text{ \AA}$ ;  $\Omega = 33^\circ$ ;  $\omega = 4,9^\circ$ ;  $\tau = 5^\circ$ ;  $D_x = 0,09 \text{ \AA}$ ;  $D_y = 0,09 \text{ \AA}$ ;  $\rho = 2,5^\circ$ ;  $k = -2,5^\circ$ . Хромофор красителя располагается перпендикулярно оси спирали на равных расстояниях ( $D = 3,4 \text{ \AA}$ ) от плоскостей верхней и нижней пары оснований в 5'-d(T-G)-сайте. Раскручивание соседних пар спирали в месте интеркаляции составляет  $3^\circ$  ( $\Omega = 33^\circ$ ), что находится в хорошем согласии с данными рентгеноструктурных исследований комплекса d(CpG)<sub>2</sub> + профлавина в кристалле [21] и с результатами теоретических исследований [22].

Рассчитанная наиболее вероятная структура комплекса 2:2 профлавина с дезокситетрануклеотидом представлена на рис. 5. Существенно, что в сравнении с комплексом 1:2 в сайтах комплекса 2:2 несколько увеличилось трансляционные параметры спирали —  $D_z = 7,3 \text{ \AA}$ ;  $D_y = 0,21 \text{ \AA}$ ;  $D_x = 0,21 \text{ \AA}$ . Следует отметить, что в аналогичном комплексе бромистого этидия с дуплексом тетрануклеотида d(TGCA), наоборот, имеет место меньшее значе-

ние параметра  $D_z$ , чем в 1:2-комплексе [7, 8]. Очевидно, наблюдаемые различия связаны со структурными особенностями интеркалирующих лигандов и с различным характером интеркаляционного встраивания красителей в дуплексе олигонуклеотидной последовательности: профлавин интеркалирует со стороны большой, а бромистый этидий — со стороны малой бороздки двойной спирали.

Что же касается конформации дезоксирибозы тетрануклеотида d(TGCA), то в этом случае, так же как и при комплексообразовании тетрамера с бромистым этидием [8], из экспериментальных концентрационных зависимостей протонных химических сдвигов нельзя сделать столь определенных выводов, как это возможно при нахождении взаимной ориентации плоскостей ароматических оснований и хромофора красителя в составе интеркалированного комплекса. В то же время оценки с использованием суммарных констант спин-спиновой взаимодействия для H1'- и H2', H2''-протонов дезоксирибозы [23] дают основание сделать заключение, что пиримидиновые дезоксирибозные остатки находятся преимущественно в C3'-эндо-, а пуриновые — в C2'-эндо-конформациях.

Анализ значений индуцированных химических сдвигов для всех протонов профлавина в комплексе 1:1 красителя с одиночной нитью тетрануклеотида позволяет предположить, что в этом комплексе более вероятно присоединение красителя к нити тетрануклеотида со стороны центрального ароматического кольца, содержащего протон H9, так как экранирование этого протона заметно больше, чем других протонов красителя. Такая ориентация красителя удовлетворяет модели Притчарда и др. [24, 25], согласно которой акридиновый краситель встраивается между двумя соседними основаниями одноцепочечной ДНК и образующийся комплекс стабилизируется электростатическими взаимодействиями между положительно заряженным атомом азота центрального ароматического кольца хромофора и отрицательным фосфатом нуклеотидной цепи. Однако существенно большая конформационная свобода одиночной нити тетрануклеотида в сравнении с дуплексной последовательностью, а также наличие симметрии в молекуле профлавина не позволяют, в отличие от 1:1-комплексов бромистого этидия с дезокситетрануклеотидами [26], конкретизировать структуру такого комплекса.

Вместе с тем большие значения индуцированных химических протонов профлавина в комплексах 1:1 и 2:1 свидетельствуют о том, что расстояние между плоскостями оснований в комплексах красителя с одиночной нитью меньше, чем в комплексе с двойной спиралью.

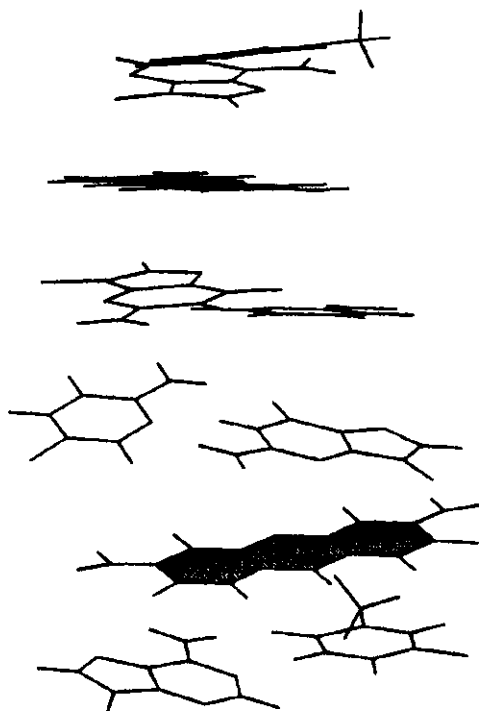


Рис. 5. Расчетная структура комплекса 2:2 профлавина с 5'-d(TGCA). Молекулы красителя интеркалированы в пиримидин-пуриновые TG- и CA-сайты тетрануклеотида. Вид на комплекс сбоку

Термодинамика комплексообразования профлавина с  $d(\text{TpGpCpA})$ . На рис. 6 представлены экспериментальные температурные кривые для химических сдвигов  $\delta_i$  протонов профлавина в растворе с тетрауклеотидом  $d(\text{TGCA})$ . Качественно они сходны с наблюдаемыми температурными зависимостями химических сдвигов протонов красителя в растворе с другими дезокситетрануклеотидными последовательностями [27].

Наблюдаемый химический сдвиг  $i$ -го протона профлавина при температуре  $T$  можно представить в виде [27]

$$\delta_i(T) = f_m(T)\delta_{mi} + f_d(T)\delta_{di} + \sum_{k=1}^4 f_k(T)\delta_{ki}, \quad (3)$$

где  $\delta_{mi}$ ,  $\delta_{di}$ ,  $\delta_1 - \delta_{4i}$  и  $f_m(T)$ ,  $f_d(T)$ ,  $f_1(T) - f_4(T)$  — значения химических сдвигов  $i$ -го протона профлавина и равновесные молярные доли профлавина при температуре  $T$  для его моно- и димерной форм, а также для различных комплексов красителя с тетрауклеотидами. В соотношении (3) предполагается, что величины  $\delta_{mi}$ ,  $\delta_{di}$ ,  $\delta_1 - \delta_{4i}$  не зависят от температуры в исследуемом температурном интервале. Допустимость такого приближения показана ранее [7, 27]. В модели (3) влияние температуры на значение  $\delta$  учитывается тем, что молярные доли

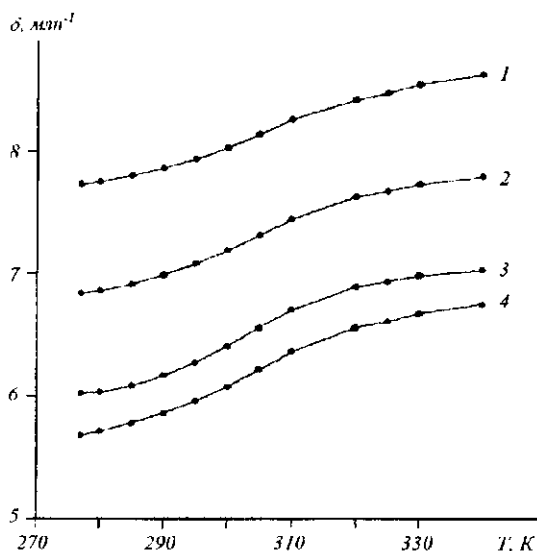


Рис. 6. Экспериментальные зависимости от температуры химических сдвигов протонов профлавина в растворе красителя с  $5'$ - $d(\text{TGCA})$  ( $D_0 = 0,91 \cdot 10^{-3}$  М,  $N_2 = 2,12 \cdot 10^{-3}$  М); 1 — Н9; 2 — Н1, Н8; 3 — Н2, Н7; 4 — Н4, Н5

$f_m(T)$ ,  $f_d(T)$ ,  $f_1(T) - f_4(T)$ , однозначно связанные с равновесными константами образования комплексов, являются функциями температуры. Определение температурных зависимостей для констант равновесия позволяет найти термодинамические параметры комплексообразования — энтальпию ( $\Delta H$ ) и энтропию ( $\Delta S$ ) для различных типов комплексов. Величины  $\Delta H$  и  $\Delta S$ , как и ранее [7, 27], рассчитывали двумя различными способами.

С п о с о б 1. Расчетная методика предусматривает использование параметрических регрессионных уравнений для анализа зависимостей молярных долей от температуры [7, 27]. Для оценки энтальпии и энтропии комплексообразования молекул использовали формализм Вант-Гоффа. На рис. 7 приведены зависимости Вант-Гоффа  $\ln K = f(1/T)$ , по которым определяли термодинамические параметры образования различных комплексов профлавина с тетрамером. Каждая точка на графике получена в результате усреднения параметров  $K_i$ , рассчитанных для различных ароматических протонов красителя; аппроксимирующие прямые проводили по методу наименьших квадратов.

С п о с о б 2. Использовали соотношение (2) для наблюдаемого химического сдвига протонов красителя в растворе с тетрауклеотидом  $d(\text{TGCA})$ , в котором влияние температуры на значение  $\delta(T)$  определяется температурной зависимостью равновесных констант самоассоциации и комплексообразования молекул, согласно соотношению [7, 27]

$$K_i(T) = \exp[\Delta S_i^0/R - \Delta H_i^0/RT], \quad (4)$$

в предположении, что величины  $\Delta S_i^0$  и  $\Delta H_i^0$  не зависят существенным образом от температуры в исследованном диапазоне температур. Минимизация функции невязки экспериментальных и расчетных значений  $\delta(T)$  позволяет найти оптимальные значения термодинамических параметров реакций образования комплексов в растворе. Численная процедура определения таким способом величин энтальпии  $\Delta H_i^0$  и энтропии  $\Delta S_i^0$  образования различных типов комплексов в растворе достаточно подробно описана в [7, 27]. Важно отметить, что термодинамические параметры, найденные двумя различными способами, в пределах погрешности их определения хорошо согласуются. Такая ситуация имела место и при исследовании термодинамики комплексообразования в других системах «олигонуклеотид — краситель» в водном растворе [7, 27]. Усредненные значения энергии Гиббса, энтальпии и энтропии реакций комплексообразования профлавина с дезокситетрануклеотидом  $5'$ - $d(\text{TGCA})$  для 298 К приведены в табл. 2.

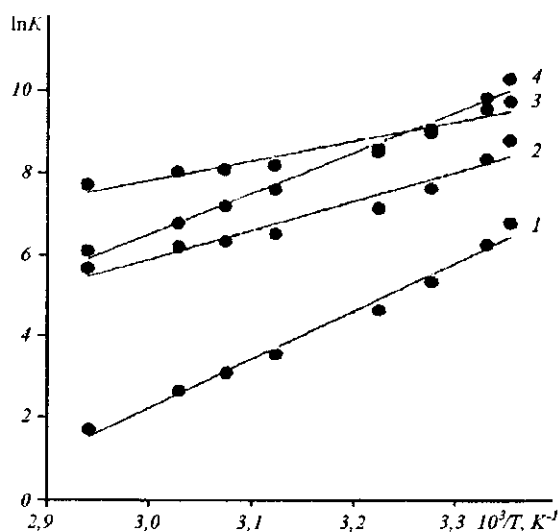


Рис. 7. Зависимость  $\ln K$  от  $1/T$  для реакций комплексообразования профлафина с тетрауклеотидом  $5'$ -d(TGCA); комплексы: 1 — 1:1 (DN); 2 — 2:1 ( $D_2N$ ); 3 — 1:2 ( $DN_2$ ); 4 — 2:2 ( $D_2N_2$ )

Анализ численных значений термодинамических параметров позволяет заключить, что комплексообразование профлафина с d(TGCA), так же как и с d(CGCG), происходит, главным образом, в результате дисперсионных ван-дер-ваальсовых взаимодействий, которые образуются как отрицательной энтальпией, так и отрицательной энтропией [28]. Значительный вклад гидрофобных взаимодей-

ствий наблюдается в случае реакции образования комплекса 1:2 профлафина с дуплексом d(TGCA), характеризующейся малым изменением энтропии. В случае же комплекса 2:2, когда две молекулы лиганда интеркалируют в дуплекс, довольно большие отрицательные значения  $\Delta S$  и  $\Delta H$  по сравнению с комплексом состава 1:2 могут быть связаны с увеличением жесткости спиральной структуры, что дополнительно к дисперсионным взаимодействиям между молекулами приводит к уменьшению энтропии при формировании комплекса [29].

Сравнение термодинамических параметров комплексообразования профлафина и фенантридинового красителя бромистого этидия с одноцепочечными тетрауклеотидными последовательностями [30] при одинаковых экспериментальных условиях показывает, что образование комплексов 1:1 и 2:1 этих красителей с мономером тетрауклеотида характеризуется несколько отличными значениями энтальпии и энтропии. Это, по-видимому, связано с различным типом связывания с одноцепочечной последовательностью акридинового и фенантридинового красителя — профлафин в 1:1-комплексе присоединяется со стороны центрального ароматического кольца (модель Притчарда и др. [24, 25]), а бромистый этидий — со стороны бокового ароматического кольца хромофора [26].

Проведенные исследования комплексообразования дезокситетрануклеотида  $5'$ -d(TpGpCpA) с интеркалирующими лигандами профлавином и бромистым этидием [11, 30] позволяют сделать заключение, что характерные закономерности равновесия молекулярных ассоциатов в растворе, вероятные типы образующихся комплексов являются общими для исследованных лигандов. Интенсивность селективного связывания ароматических ли-

Таблица 2

Термодинамические параметры ( $\Delta G$ ,  $\Delta H$ , кДж/моль;  $\Delta S$ , Дж/моль (К)) реакций образования комплексов профлафина с дезокситетрануклеотидом  $5'$ -d(TpGpCpA) в 0,1 М фосфатном буфере, рD = 7,1

Комплекс	Химическая реакция	$\Delta G$ (298 К)	$\Delta H$	$\Delta S$ (298 К)
	$K_1$			
1:1	$D + N \leftrightarrow DN$	$-(17,6 \pm 0,3)$	$-(95,3 \pm 11,4)$	$-(261 \pm 33)$
	$K_3$			
2:1	$D + DN \leftrightarrow D_2N$	$-(21,7 \pm 0,4)$	$-(51,6 \pm 5,7)$	$-(100 \pm 12)$
	$K_2$			
1:2	$D + N_2 \leftrightarrow DN_2$	$-(23,8 \pm 0,3)$	$-(36,8 \pm 3,3)$	$-(43,6 \pm 4,4)$
	$K_4$			
2:2	$D + DN_2 \leftrightarrow D_2N_2$	$-(24,1 \pm 0,4)$	$-(80,8 \pm 8,1)$	$-(190 \pm 21)$



гандов с пиримидин-пуриновыми сайтами дезокситетрануклеотидной последовательности зависит от их состава и от вида оснований, фланкирующих места преимущественной посадки лиганда. Вместе с тем особенности химической структуры интеркаляторов в значительной степени определяют специфику их связывания как с одиночной, так и с двухспиральной формами нуклеотидных последовательностей, в частности, профлавин интеркалирует со стороны большой, а бромистый этидий — со стороны малой бороздки дуплекса ДНК.

Выражаем благодарность Объединенному исследовательскому центру Лондонского университета за предоставленную возможность в Беркбек колледже использовать для измерений ЯМР-спектрометр 500 МГц.

Р. Д. Итон, Д. О. Веселков, Л. М. Димант, С. Ф. Барановский, С. Г. Осетров, Д. Б. Дэвис, О. М. Веселков

Дослідження комплексоутворення акридинового барвника профлавіну з дезокситетрарибонуклеозидтрифосфатом 5'-d(TpGpCpA) у водному розчині методом  $^1\text{H}$ -ЯМР спектроскопії

Резюме

Досліджено взаємодію барвника акридинового ряду профлавіну з самокомплементарним дезокситетрарибонуклеозидтрифосфатом 5'-d(TpGpCpA) у водно-солевому розчині методом одно- і двомірної  $^1\text{H}$ -ЯМР спектроскопії (500 МГц). Виміряно концентраційні і температурні залежності протонних хімічних зсувів взаємодіючих молекул. Розглянуто різні моделі утворення комплексів молекул барвника з тетра-нуклеотидом, розраховано рівноважні константи, ентальпії  $\Delta H$  та ентропії  $\Delta S$  реакцій утворення комплексів складу 1:1, 2:1, 1:2, 2:2. Виявлено особливості динамічної рівноваги комплексів різного типу в залежності від співвідношення концентрацій барвника і тетра-нуклеотиду. Зроблено висновок про переважну інтеркаляцію профлавіну у пиримидин-пуринові TG- і CA-сайти тетра-нуклеотиду. Порівняння закономірностей інтеркаляційної взаємодії профлавіну та дослідженого раніше феноантридинового барвника бромистого етидію засвідчило, що інтенсивність селективного зв'язування ароматичних лігандів з пиримидин-пуриновими сайтами дезокситетрануклеотидів залежить від їх складу і виду основ, фланкуючих місця посадки ліганда. Базуючись на розрахованих значеннях індукованих хімічних зсувів для протонів барвника та даних 2D-NOESY, визначено найвірогідніші просторові структури 1:2 і 2:2 комплексів профлавіну з тетра-нуклеотидом.

R. A. Eaton, D. A. Veselkov, L. N. Djimant, S. F. Baranovsky, S. G. Osetrov, D. B. Davies, A. N. Veselkov

$^1\text{H}$ -NMR investigation of complexation of acridine dye proflavine with deoxytetra-ribonucleoside triphosphate 5'-d(TpGpCpA) in aqueous solution

Summary

The interaction of acridine dye proflavine with self-complementary deoxytetra-ribonucleoside triphosphate 5'-d(TpGpCpA) in aqueous salt solution has been studied by one- and two-dimensional 500 MHz  $^1\text{H}$ -NMR spectroscopy. Concentration and temperature dependences of proton chemical shifts of the interacting molecules

have been measured. Different schemes of complexation of proflavine with the tetranucleotide have been analysed and the equilibrium constants, enthalpies  $\Delta H$ , entropies  $\Delta S$  of different reactions leading to the formation of 1:1, 1:2, 2:1, 2:2 complexes have been determined. The specific features of the dynamic equilibrium of different complexes as a function of the drug-tetranucleotide ratio have been examined. It is concluded that proflavine intercalates preferentially to pyrimidine-purine TG- and CA-sites of the tetranucleotide sequence. Comparative analysis of the distinctive features of the intercalative binding of proflavine and that of phenanthridinium dye ethidium bromide studied earlier has shown that intensity of selective interaction of aromatic ligands with pyrimidine-purine sequence depends on the base content and type of the bases flanking the binding sites. The most favourable structures 1:2 and 2:2 proflavine-tetranucleotide complexes have been constructed using calculated values of induced chemical shift of dye protons and 2D-NOE spectra.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Gale E. E., Cundliffe E., Reynolds P. E. et al. The molecular basis of antibiotic action.—London: John Wiley, 1981.—500 p.
2. Reinhardt C. G., Krug T. R. A comparative study of ethidium bromide complexes with dinucleotides and DNA: Direct evidence for intercalation and nucleic acid sequence preferences // Biochemistry.—1978.—17.—P. 4845—4854.
3. Feigon J., Leupin W., Denny W. A., Kearns D. R. Binding of ethidium derivatives to natural DNA: a 300 MHz  $^1\text{H}$ -NMR study // Nucl. Acids Res.—1982.—10, N 2.—P. 749—761.
4. Bailey S. A., Graves D. A., Rill R., Marsch G. Influence of DNA base sequence on binding energetics of actinomycin D // Biochemistry.—1993.—32.—P. 5881—5887.
5. Bailey S. A., Graves D. A., Rill R. Binding of actinomycin D to the T(G)nT motif of double-stranded DNA. Determination of the guanine requirement in non-classical, non-GpC binding sites // Ibid.—1994.—33.—P. 11493—11500.
6. Davies D. B., Djimant L. N., Veselkov A. N.  $^1\text{H}$ -NMR structural analysis of the interactions of proflavine with self-complementary deoxytetranucleotides of different base sequence // Nucleos. and Nucleot.—1994.—13.—P. 637—655.
7. Davies D. B., Veselkov A. N. Structural and thermodynamical analysis of molecular complexation by  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy // J. Chem. Soc. Faraday Trans.—1996.—92.—P. 3545—3557.
8. Davies D. B., Karawajew L. N., Veselkov A. N.  $^1\text{H}$  NMR structural analysis of ethidium bromide complexation with self-complementary deoxytetranucleotides 5'-d(ApCpGpT), 5'-d(ApGpCpT) and 5'-d(TpGpCpA) in aqueous solution // Biopolymers.—1996.—38.—P. 745—757.
9. Веселков А. Н., Дэвис Д., Димант Л. Н., Паркес Х. Исследование взаимодействия профлавіна с дезокситетрарибонуклеозидтрифосфатом d(GpCpGpC) методом  $^1\text{H}$  ЯМР спектроскопии // Молекуляр. биология.—1991.—25.—№ 6.—С. 1504—1516.
10. Дэвис Д., Веселков А. Н., Димант Л. Н., Паркес Х. Исследование взаимодействия профлавіна с дезокситетрарибонуклеозидтрифосфатом 5'-d(ApGpCpT) в водном растворе методом одномерной и двумерной  $^1\text{H}$ -ЯМР спектроскопии // Биофизика.—1992.—37, № 1.—С. 23—33.
11. Веселков А. Н., Завьялова О. С., Димант Л. Н., Дэвис Д. Исследование комплексообразования бромистого этидия с самокомплементарным дезоксирибонуклеотидом 5'-d(TGCA) методом  $^1\text{H}$  ЯМР-спектроскопии // Журн. физ. химии.—1996.—70, № 9.—С. 1617—1624.
12. Albert A. The Acridines.—London: Edward Arnold Publ. Ltd., 1966.—604 p.
13. Веселков А. Н., Димант Л. Н., Козинцев В. В. и др.

- Исследование самоассоциации молекул дезокситетрарибонуклеозидтрифосфатов d(TrGpCpA) в водном растворе методом  $^1\text{H}$ -ЯМР спектроскопии // Биофизика.—1995.—40, № 3.—С. 283—294.
14. Veselkov A. N., Djimant L. N., Karawajew L. S., Kulikov E. L. Investigation of the aggregation of acridine dyes in aqueous solution by proton NMR // Stud. Biophys.—1985.—106, N 3.—P. 171—180.
  15. Nelson J. W., Tinoco I., Jr. Intercalation of ethidium ion into DNA and RNA oligonucleotides // Biopolymers.—1984.—23, N 1.—P. 213—233.
  16. McGhee J. D., von Hippel P. H. Theoretical aspects of DNA-protein interactions. Cooperative and noncooperative binding of large ligands to one dimensional homogeneous lattice // J. Mol. Biol.—1974.—86.—P. 469—489.
  17. Giessner-Prettre C., Pullman B. Quantum mechanical calculation of NMR chemical shifts in nucleic acids // Quart. Rev. Biophys.—1987.—20, N 3/4.—P. 113—172.
  18. Полтев В. И., Теплухин А. В. Взаимодействие оснований и конформационные проявления последовательностей повторяющихся нуклеотидов // Молекуляр. биология.—1987.—21, № 1.—С. 102—115.
  19. Poltev V. I., Teplukhin A. V. Conformational implication of some nucleotide sequence // Int. J. Quant. Chem.—1989.—35.—P. 91—102.
  20. Dickerson R. E. Definitions and nomenclature of nucleic acid structure parameters // J. Biomol. Struct. and Dynam.—1989.—6, N 4.—P. 627—634.
  21. Neidle S., Achari A., Taylor G. L. et al. Structure of a dinucleoside phosphate-drug complex as model for nucleic acid-drug interaction // Nature.—1977.—269, N 5626.—P. 304—307.
  22. Berman H. M., Neidle S., Stodola R. K. Drug-nucleic acid interactions: Conformational flexibility at the intercalation site // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1978.—75, N 2.—P. 828—832.
  23. Searle M. S., NMR studies of drug-DNA interactions // Progr. NMR Spectroscopy.—1993.—25.—P. 403—480.
  24. Pritchard N. J., Blake A., Peacocke A. R. Modified intercalation model for the interaction of aminoacridines and DNA // Nature.—1966.—212.—P. 1360—1361.
  25. Kapuscinsky J., Darzynkiewicz Z. Intercalation of acridine drugs with single-stranded DNA // J. Biomol. Struct. and Dynam.—1987.—5.—P. 127—143.
  26. Davies D. B., Baranovsky S. F., Veselkov A. N. Structural and thermodynamical analysis of drug binding to single-stranded DNA oligomers // J. Chem. Soc. Faraday Trans.—1997.—93.—P. 1559—1572.
  27. Веселков А. Н., Дэвис Д., Дымант Л. Н. Термодинамический анализ взаимодействия акридинового красителя профлавина с дезокситетрануклеотидами различной последовательности оснований по данным  $^1\text{H}$  ЯМР // Молекуляр. биология.—1992.—26, № 4.—С. 780—792.
  28. Ross P. D., Subramanian S. Thermodynamics of protein association reaction: forces contributing to stability // Biochemistry.—1981.—20.—P. 3096—3102.
  29. Reinert K. E. Antracycline binding induced DNA stiffening, bending and elongation. Stereochemical implications from viscometric investigation // Nucl. Acids Res.—1983.—11.—P. 3411—3430.
  30. Веселков А. Н., Завьялова О. С., Дымант Л. Н. и др. Анализ комплексообразования фенантридинового красителя бромистого этидия с дезокситетрануклеотидом 5'-d(TrGpCpA) // Журн. физ. химии.—1997.—71, № 1.—С. 24—29.

Поступила в редакцию 10.04.97