

А. Н. Веселков, Л. Н. Дымант, П. А. Болотин,
С. Ф. Барановский, Д. А. Веселков, Д. Шипп, Д. Дэвис

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БРОМИСТОГО ЭТИДИЯ С САМОКОМПЛЕМЕНТАРНЫМ ДЕЗОКСИТЕТРАНУКЛЕОТИДОМ 5'-d(A)₃CrGrT) В ВОДНОМ РАСТВОРЕ МЕТОДОМ ¹H-ЯМР СПЕКТРОСКОПИИ

Изучено комплексообразование красителя бромистого этидия (3,8-диамино-6-фенил-5-этил-фенантридин) с самокомплементарным дезокситетрарибонуклеозидтрифосфатом 5'-d(A)₃CrGrT) в водно-солевом растворе методом одномерной (500 МГц) и двухмерной (600 МГц) ¹H-ЯМР спектроскопии. Двухмерная гомоядерная ПМР спектроскопия (2M-NOESY) использована для качественного анализа характера взаимодействия бромистого этидия с тетра nukлеотидом. Измерены концентрационные зависимости протонных химических сдвигов молекул при фиксированной температуре (T=298 K). Рассмотрены различные схемы комплексообразования молекул красителя с тетра nukлеотидом, учитывающие разные молекулярные ассоциаты в растворе. Определены равновесные константы реакций и предельные значения химических сдвигов протонов бромистого этидия в составе комплексов. Проанализировано относительное содержание комплексов различного типа в растворе и выявлены особенности динамического расщепления в зависимости от соотношения концентраций красителя и тетра nukлеотида. На основе полученных данных сделано заключение о преимущественной интеркаляции бромистого этидия в пиримидин-пуриновый участок тетра nukлеотидной последовательности (CG-сайт) в дуплексной форме подобно изученному ранее акридинового красителю профлавицу. Встраивание бромистого этидия происходит со стороны малой канавки дуплекса, в отличие от профлавицина, интеркалирующего из большого желобка двойной спирали. Построена наиболее вероятная структура 1:2 красителя с тетра nukлеотидом в растворе по расчетным значениям индуцированного химического сдвига протонов бромистого этидия и данным 2M-NOE-спектров.

Введение. Анализ взаимодействия ароматических красителей, отличающихся структурой хромофоров и боковыми группами, с олигонуклеотидами различных последовательностей оснований в цепи дает возможность получить определенные сведения о физической природе специфичности связывания лигандов [1]. Ранее [2] нами было изучено связывание акридинового красителя профлавицина с самокомплементарным дезокситетрарибонуклеозидтрифосфатом 5'-d(A)₃CrGrT) в водно-солевом растворе (0,1 М фосфатный буфер в D₂O) методом одномерной и двухмерной ¹H-ЯМР спектроскопии. В настоящей работе в тех же условиях исследовали образование комплексов фенантридинового красителя бромистого этидия с данной олигонуклеотидной последовательностью. Сравнительный анализ параметров комплексообразования двух типичных интеркаляторов, существенно отличающихся по характеру взаимодействия с фрагментами нуклеиновых кислот (профлавицин встраивается в двухспиральную структуру ДНК со стороны большой, а бромистый этидий — со стороны малой канавки), важен для понимания специфики связывания ароматических лигандов с тем или иным сайтом в олигонуклеотидной цепи. Экспериментальные исследования [3—5] свидетельствуют о преимущественном взаимодействии бромистого этидия с определенными последовательностями оснований в коротких олигонуклеотидных дуплексах, при этом интенсивность связывания лиганда в различных сайтах уменьшается в ряду: пиримидин — пуриин > пуриин — пуриин > пиримидин — пиримидин > пуриин — пиримидин. Однако при

© А. Н. ВЕСЕЛКОВ, Л. Н. ДЫМАНТ, П. А. БОЛОТИН, С. Ф. БАРАНОВСКИЙ, Д. А. ВЕСЕЛКОВ, Д. ШИПП, Д. ДЭВИС, 1995

интеркаляции бромистого этидия в более длинные олигонуклеотидные дуплексы не наблюдается столь определенной сиквенс-специфичности взаимодействия лиганда [6]. В работе [7] показано, что катион этидия связывается также с одноцепочечными нуклеиновыми кислотами, но значительно слабее, чем с двухспиральными молекулами. Несмотря на общепризнанность интеркаляционной модели связывания бромистого этидия с ДНК, в сообщении [8] на основе результатов, полученных методом молекулярного моделирования, предложена альтернативная внешняя модель связывания бромистого этидия в большой канавке ДНК, которая, по мнению авторов, может реализоваться *in vivo* при концентрациях, используемых в фармакологии.

Следует отметить, что в растворе (особенно в случае коротких олигонуклеотидов) имеет место сложное динамическое равновесие взаимодействующих молекул и их комплексов, отвечающее равновесным процессам самоассоциации молекул олигонуклеотидов и красителя и взаимодействию молекул лиганда как с одноцепочечной, так и с двухспиральной олигонуклеотидной последовательностью. Среди различных экспериментальных методов исследования подобных многокомпонентных систем ЯМР спектроскопия является наиболее эффективным, так как позволяет наряду с анализом равновесия в растворе определить на атомарном уровне и структуры образующихся молекулярных комплексов. В данной работе процессы комплексообразования бромистого этидия с дезокситетрануклеотидом 5'-d(ApCpGpT) изучали в водном растворе методом одномерной и двумерной ^1H -ЯМР спектроскопии (500 и 600 МГц). Использованный тетрануклеотид содержит один участок с пиримидин-пуриновой и два с пурин-пиримидиновой последовательностью оснований, что дает возможность сравнительного анализа сиквенс-специфичности связывания лиганда с различными сайтами последовательности. Следует отметить, что равновесная константа самоассоциации тетрануклеотида d(ACGT) при комнатной температуре (293 К) достаточно мала и составляет $K_A = (160 \pm 30)$ л/моль дуплекса [9]. Оценки показывают, что при таком значении константы K_A доля молекул в дуплексной форме в растворе составляет $\approx 20\%$ при исследуемых концентрациях тетрануклеотида. Можно ожидать, что концентрация мономеров тетрануклеотида и их комплексов с красителем остается преобладающей и в присутствии бромистого этидия, несмотря на то, что последний стабилизирует двухспиральную структуру тетрамера. Таким образом, при исследовании комплексообразования бромистого этидия с d(ACGT) следует учитывать возможности избирательного связывания красителя с определенными сайтами тетрамера как в дуплексной, так и в мономерной формах.

Материалы и методы. Бромистый этидий («Sigma», США) растворяли в D_2O с изотопной чистотой 99,95 % D («Sigma») и лиофилизировали. Затем взвешенное количество лиганда растворяли в дейтерированном 0,1 М фосфатном буфере (pD=7,1). Концентрацию красителя определяли спектрофотометрически: для бромистого этидия коэффициент экстинкции $\epsilon = 5860 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ($\lambda = 480 \text{ nm}$) [10]. Дезокситетрарибонуклеозидтрифосфат 5'-d(ApCpGpT) синтезирован компанией «Oswel DNA services» (Великобритания). Образец также лиофилизировали из D_2O и растворяли в дейтерированном 0,1 М фосфатном буфере.

Все одномерные протонные спектры ЯМР измерены на импульсном спектрометре «JEOL GSX 500» с резонансной частотой 500 МГц. Остаточный сигнал HOD насыщался в период детектирования. В процессе концентрационных исследований долю бромистого этидия поддерживали постоянной в растворе, что обеспечивали последовательным добавлением свежеприготовленного раствора бромистого этидия заданной концентрации в исходную смесь тетрануклеотида и красителя. Методика проведения эксперимента достаточно подробно описана в [1]. Данные гомоядерной корреляционной спектроскопии (2M-NOESY) использовали для качественного определения характера комплексообразования красителя с олигонуклеотидом. Спектры 2M-NOESY измерены на им-

пульсном спектрометре «Bruker AMX» (600 МГц). Исследуемые образцы предварительно дегазировали, продувая их азотом в течение 20÷÷30 мин. Спектры 2M-NOESY регистрировали при T=298 К с использованием стандартной последовательности импульсов при ширине спектров SW=4800 Гц, 4096 точек в период детектирования (t_2), 512 приращений времени эволюции (t_1) и при двух временах смешивания $\tau_{m1}=90$ мс и $\tau_{m2}=200$ мс. Период восстановления составлял 2 с, импульсную последовательность при каждом t_1 повторяли 16 раз. Стабилизацию температуры в процессе измерений осуществляли BVT-терморегулятором. Одномерные и двухмерные спектры измеряли в стандартных ампулах с внешним диаметром 5 мм, минимальный объем раствора — 0,5 мл. Химический сдвиг определяли относительно ДСС (2,2-диметил-2-силапентан-5-сульфоокислота), в качестве внутреннего стандарта использовали ТМА (бромид тетраметил-аммония).

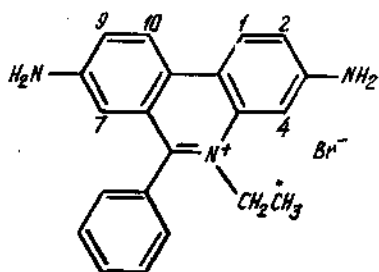


Рис. 1. Структурная формула катиона бромистого этидия

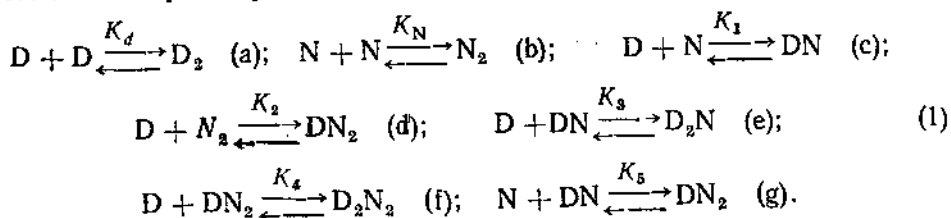
Результаты и обсуждение. Структурная формула катиона этидия (3,8-диамино - 6-фенил-5-этил-фенантридин) с указанием необменивающихся протонов хромофора красителя представлена на рис. 1. Отнесение сигналов всех необменивающихся протонов в ПМР спектре бромистого этидия получено ранее [11] на основании двухмерных гомоядерных COSY- и NOESY-экспериментов. Как и многие другие ароматические красители, бромистый этидий образует в

растворе межмолекулярные комплексы благодаря стэкинг-взаимодействию хромофоров красителя, константа димеризации бромистого этидия равна $K=(176\pm 8) \text{ M}^{-1}$ при T=294 К (0,1 М фосфатный буфер) [11]. Отнесение сигналов в спектре ПМР тетра nukлеотида 5'-d(ApCpGpT) также получено на основании двухмерных гомоядерных COSY- и NOESY-экспериментов [9]. Предварительно выполненные отнесения сигналов протонов тетра nukлеотида и красителя позволили отождествить спектры смешанных растворов и выявить возможные связи ядер молекул бромистого этидия и тетрамера. Отметим, что положение сигналов протонов в суммарном спектре достаточно надежно определяется по характеру изменения интенсивности сигналов в процессе титрования при постоянной концентрации красителя. На рис. 2 представлен спектр 2M-NOE (600 МГц) раствора бромистого этидия с тетра nukлеотидом 5'-d(ApCpGpT), полученный при времени смешивания $\tau_m=200$ мс. Существенно, что в 2M-NOE-спектре наблюдаются межмолекулярные кросс-пики малой интенсивности между орто-протонами красителя и протоном H1' (C), что отчетливо видно на рис. 3, иллюстрирующем расширение контурного 2M-NOE в области слабого поля. На спектре (см. рис. 3) внутримолекулярные связи между различными протонами показаны пунктирными линиями, а межмолекулярные — сплошными. Этот результат свидетельствует о встраивании бромистого этидия в CG-сайт тетрамера со стороны малой канавки двухспирального дуплекса, где располагаются протоны H1' дезоксирибозы [12].

Измеренные концентрационные зависимости химических сдвигов бромистого этидия в смешанном растворе приведены на рис. 4. Качественный анализ кривых (см. рис. 4) свидетельствует о том, что изменения химических сдвигов протонов красителя в процессе титрования происходят существенно медленнее, когда отношение исходных концентраций дуплекса и лиганда $r=N_0/D_0 \geq 1$. Это предполагает образование в подобных условиях преимущественно комплекса 1 : 2 одной молекулы бромистого этидия с двумя нитями тетра nukлеотида.

Для количественного анализа взаимодействия красителя с тетра nukлеотидом применена следующая схема образования молекулярных

ассоциатов в растворе:



В предлагаемой схеме комплексообразования вследствие малости исходных концентраций сделано допущение об определяющей роли двухкомпонентных взаимодействий в растворе. Учтено, что в растворе

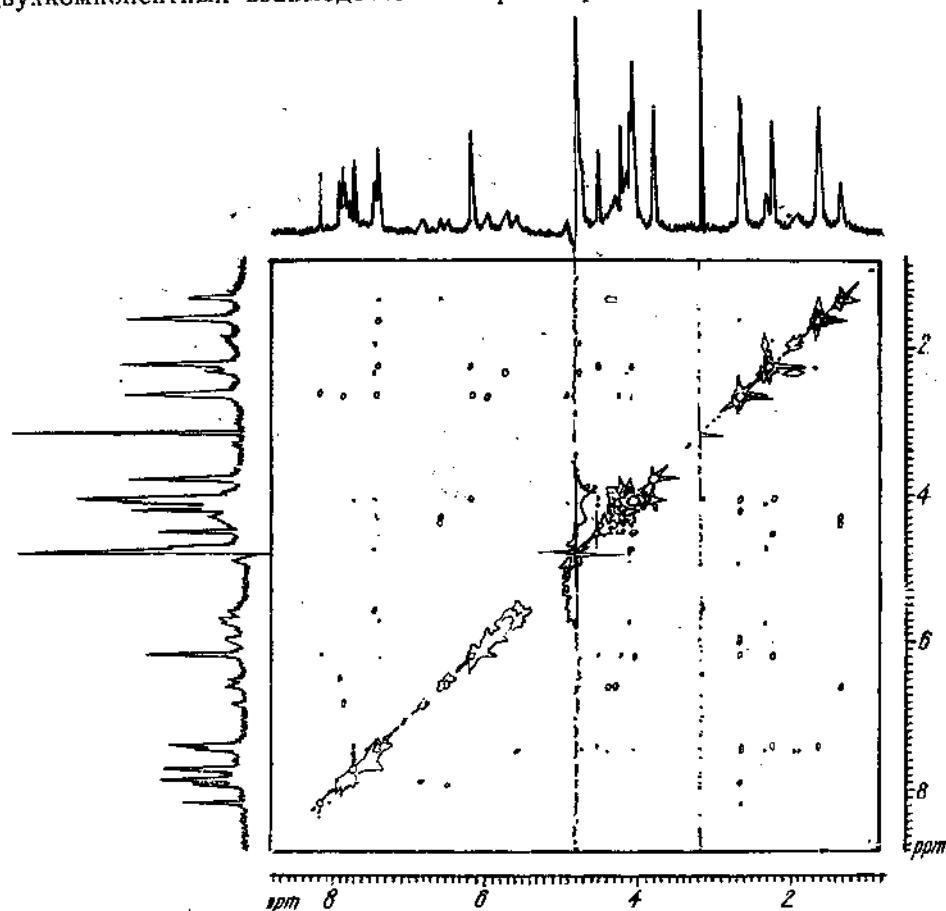


Рис. 2. 2M-NOE-спектр (600 МГц, $\tau_m=200$ мс) раствора бромистого этидия с дезокситетрануклеотидом 5'-d(ApCpGpT) при исходных концентрациях красителя $D_0=1,23 \cdot 10^{-3}$ моль/л, тетрауклеотида $N_0=2,14 \cdot 10^{-3}$ моль/л ($T=298$ К)

имеет место динамическое равновесие взаимодействующих молекул, включающее в себя различные процессы образования комплексов красителя с тетрамером, а также реакции самоассоциации молекул. Предусмотрена возможность образования 1:2-комплекса DN_2 бромистого этидия с тетрауклеотидом двумя различными способами — непосредственное связывание красителя с дуплексом (1 d) и путем взаимодействия мономера тетрауклеотида с 1:1-комплексом DN (1 g), где бромистый этидий играет роль «скрепки». Следует отметить, что при связывании профлавина с d(ACGT) расчет по моделям, в которых пренебрегали реакцией (1 g) образования 1:2-комплекса через «скрепку», не приводил к удовлетворительным результатам [2]. Что касается самоассоциа-

ции бромистого этидия, то при использованных в эксперименте концентрациях красителя можно ограничиться процессом димеризации молекул. Применительно к условиям эксперимента ($T=298\text{ K}$) константа димеризации K_d с учетом ее зависимости от температуры принята рав-

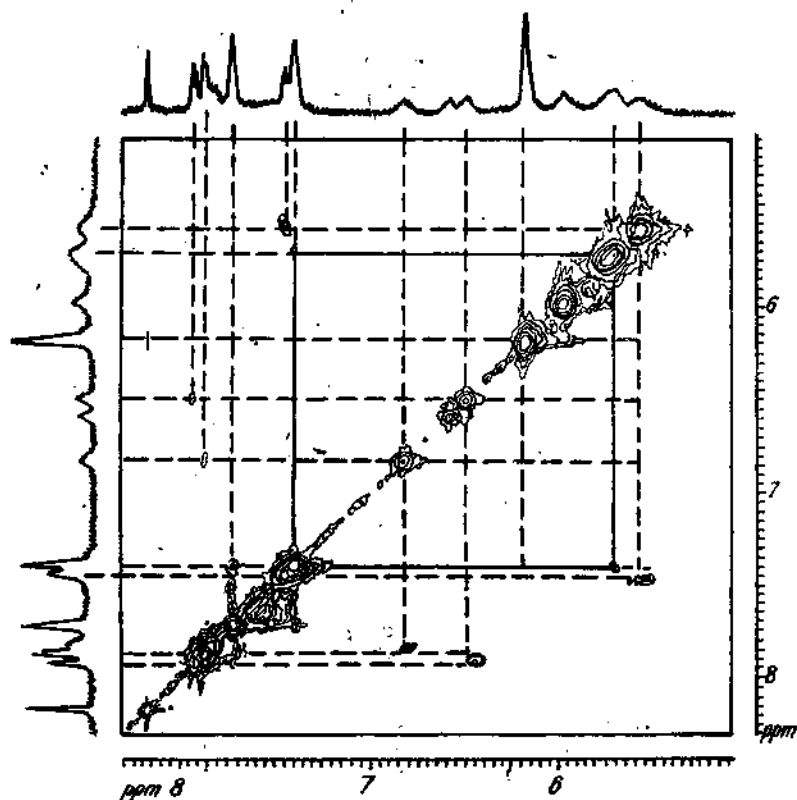


Рис. 3. Расширение контурного 2М-NOESY-спектра ($\tau_m=200$ мс) раствора бромистого этидия с дезокситетрануклеотидом 5'-d(ApCpGpT) в области слабого поля ($D_0=1,23 \cdot 10^{-3}$ моль/л, $N_0=2,14 \cdot 10^{-3}$ моль/л, $T=298\text{ K}$). Межмолекулярные взаимодействия показаны сплошными линиями

ной 149 л/моль [11]. Величина константы K_N самоассоциации тетра-нуклеотида при $T=298\text{ K}$ составляет 102 л на 1 моль дуплекса [9].

Учитывая законы действующих масс для реакций (1) и закон сохранения массы, получаем систему уравнений:

$$2(K_d + K_1K_2N + K_NK_3K_4N^2)D^2 + (1 + K_1N + K_NK_3N^2 + K_1K_5N^3)D - D_0 = 0; \quad (2)$$

$$2(K_N + K_NK_3D + K_NK_3K_4D^2 + K_5K_1D)N^2 + (1 + K_1D + K_1K_2D^2)N - N_0 = 0,$$

где D_0 , N_0 — исходные молярные концентрации красителя и тетра-нуклеотида; D и N — равновесные молярные концентрации мономеров бромистого этидия и тетра-нуклеотида соответственно.

Химические сдвиги δ рассчитывали с использованием аддитивной модели:

$$\delta = D/D_0(\delta_m + 2K_dD\delta_d + K_1N\delta_1 + 2K_1K_2DN\delta_2 + K_NK_3N^2\delta_3 + 2K_NK_3K_4DN^2\delta_4 + K_1K_5N^2\delta_5). \quad (3)$$

Здесь δ_m , δ_d , δ_1 , δ_2 , δ_3 , δ_4 и δ_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 δ_m и δ_d можно считать известными. Они были определены ранее [11] при исследовании самоассоциации бромистого этидия исходя из концентрационных зависимостей протонных химических сдвигов красителя в тех же условиях (0,1 М фосфатный буфер). Тогда на-

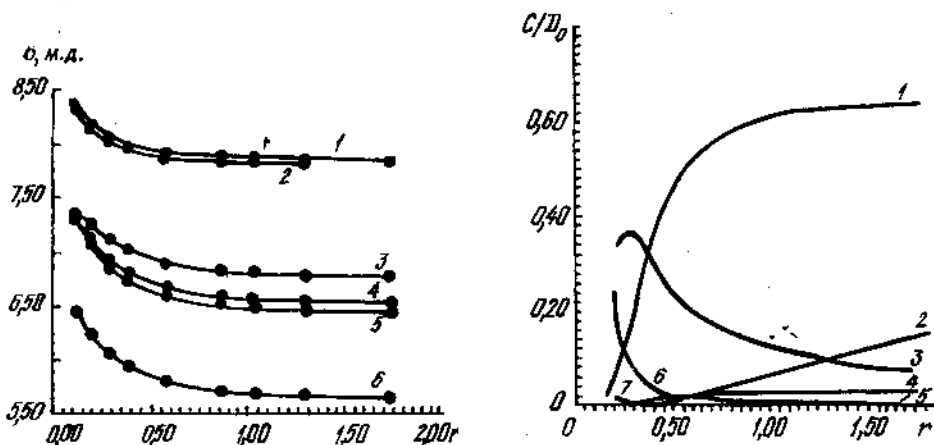


Рис. 4. Зависимость химических сдвигов протонов бромистого этидия от отношения исходных концентраций тетрануклеотида в дуплексной форме и красителя $r = (N_0/D_0)$ при постоянной концентрации бромистого этидия $D_0 = 1,23 \cdot 10^{-3}$ моль/л и $T = 298$ К: 1 — Н1; 2 — Н10; 3 — Н9; 4 — Н4; 5 — Н2; 6 — Н7

Рис. 5. Относительное содержание молекулярных комплексов в растворе в зависимости от $r = N_0/D_0$ при $D_0 = 1,23 \cdot 10^{-3}$ моль/л, $T = 298$ К: 1 — 1:1 комплекс (DN); 2 — 1:2 комплекс (DN₂), реакция (1 d); 3 — 2:1 комплекс (D₂N); 4 — 2:2 комплекс (D₂N₂); 5 — 1:2 комплекс (DN₂), реакция (1 g); 6 — мономер бромистого этидия (D); 7 — димер бромистого этидия (D₂)

блюдаемый химический сдвиг δ является функцией неизвестных $\delta_1 \div \delta_5$, $K_1 \div K_5$, а также D и N , которые могут быть найдены из системы уравнений (2). Такую многопараметрическую задачу целесообразно решать методом последовательного усложнения модели [13]: в качестве первоначального приближения использовали четырехпараметрическую модель (схема I), включающую в себя реакции (1 a) и (1 b) самоассоциации красителя и тетрануклеотида, а также реакции (1 c) и (1 e) образования комплексов 1:1 и 2:1 красителя с мономером тетрануклеотида, содержание которого в растворе выше, чем дуплекса, при исследуемой температуре. Процедура вычисления параметров модели, основанная на минимизации квадратичного функционала невязки с использованием экспериментальных концентрационных зависимостей химических сдвигов различных протонов красителя, достаточно подробно описана в [1, 14]. Усредненные значения рассчитанных параметров по схеме I представлены в таблице. В следующих расчетных схемах, проанализированных в развитие схемы I, дополнительно учтены равновесная реакция (1 d) образования комплекса 1:2 красителя с дуплексом тетрануклеотида (схема II); реакция (1 f) формирования комплекса 2:2 с двумя молекулами красителя в дуплексе (схема III) и в общей схеме IV — реакция (1 g) формирования 1:2-комплекса через «скрепку». Такое последовательное рассмотрение равновесных процессов в растворе позволяет использовать в качестве начального приближения параметров при поиске минимума невязки те значения, которые были найдены по более простым схемам. Из таблицы видно, что учет дополнительных реакций (переход от схемы I к схеме IV) закономерно приводит к уменьшению равновесных констант комплексообразования $K_1 \div K_4$ и к небольшому изменению δ_i ($i = 1, 2, 3, 4$). Таким образом, усложнение схем комплексообразования в растворе не оказывает значительного влияния на величины предельных химических сдвигов красителя в составе комплексов, т. е. параметров, используемых для анализа молекулярных структур. Отметим, что в процессе расчетов были проана-

Расчетные значения параметров (δ , млн^{-1} и K , 10^3 л/моль) комплексообразования бромистого этидия с 5'-d(ACGT) в водном растворе ($T=298$ K, $pD=7,1$)

Прогноз	δ_1	δ_2	δ_3	δ_4	δ_5	δ_6	δ_7	δ_m	K_1	K_2	K_3	K_4	K_5	
I														
H1	7,80	—	8,06	—	—	—	—	8,69	—	—	—	—	—	—
H10	7,79	—	8,02	—	—	—	—	8,63	—	—	—	—	—	—
H9	6,71	—	7,16	—	—	—	—	7,66	—	—	—	—	—	—
H4	6,45	—	6,98	—	—	—	—	7,55	(126±45)	—	(36,5±12,1)	—	—	—
H2	6,20	—	6,93	—	—	—	—	7,48	—	—	—	—	—	—
H7	5,50	—	6,11	—	—	—	—	6,67	—	—	—	—	—	—
II														
H1	7,81	7,84	8,05	—	—	—	—	8,69	—	—	—	—	—	—
H10	7,79	7,86	8,01	—	—	—	—	8,63	—	—	—	—	—	—
H9	6,60	7,15	7,16	—	—	—	—	7,66	—	—	—	—	—	—
H4	6,40	6,68	6,98	—	—	—	—	7,55	(76±22)	(130±9)	(24±6)	—	—	—
H2	6,09	7,04	6,95	—	—	—	—	7,48	—	—	—	—	—	—
H7	5,33	6,05	6,13	—	—	—	—	6,67	—	—	—	—	—	—
III														
H1	7,82	7,67	8,04	8,40	—	—	—	8,69	—	—	—	—	—	—
H10	7,79	7,77	8,01	7,86	—	—	—	8,63	—	—	—	—	—	—
H9	6,60	7,05	7,16	7,15	—	—	—	7,66	—	—	—	—	—	—
H4	6,24	6,64	6,99	7,01	—	—	—	7,55	(70±23)	(125±8)	(21,4±5,3)	(42,5±4,2)	—	—
H2	6,05	6,96	6,96	6,98	—	—	—	7,48	—	—	—	—	—	—
H7	5,26	6,01	6,13	6,01	—	—	—	6,67	—	—	—	—	—	—
IV														
H1	7,81	7,70	8,04	8,50	7,68	—	—	8,69	—	—	—	—	—	—
H10	7,79	7,80	8,01	7,88	7,79	—	—	8,63	—	—	—	—	—	—
H9	6,61	6,84	7,16	6,89	7,06	—	—	7,66	(69,6±20,3)	(124±8)	(21,1±3,9)	(41,3±4,6)	(0,011±0,003)	—
H4	6,24	6,64	6,99	7,01	6,64	—	—	7,55	—	—	—	—	—	—
H2	6,05	6,96	6,96	6,98	6,96	—	—	7,48	—	—	—	—	—	—
H7	5,27	5,96	6,13	6,01	6,01	—	—	6,67	—	—	—	—	—	—

лизируются также другие последовательные схемы образования комплексов в растворе, включающие различные комбинации наиболее значимых реакций из системы (1). Во всех рассмотренных случаях рассчитанные значения параметров комплексообразования в пределах погрешности их определения совпадали с приведенными в таблице.

Сравнение рассчитанных равновесных констант образования комплексов 1:1, 1:2 (1 d), 2:1, 2:2 и 1:2 (1 g) бромистого этидия с дезокситетрануклеотидом d(ACGT) со значениями констант K_1 – K_5 для подобных комплексов этого же тетрануклеотида с профлавином [1, 2] показывает их качественное отличие. Прежде всего обращает на себя внимание тот факт, что количественные значения равновесных констант комплексообразования K_1 и K_2 , K_3 и K_4 рассматриваемого тетрамера с фенантридиновым красителем бромистым этидием существенно выше, чем с акридиновым красителем профлавином, что согласуется с выводами работы [6]. Можно предположить, что высокие значения констант образования таких комплексов связаны с наличием у хромофора бромистого этидия объемных боковых заместителей — фенольного кольца и этильной группы, которые создают энергетически выгодные константы с остовом олигонуклеотидной последовательности. Вместе с тем значение константы образования 1:2-комплекса через «скрепку» на два порядка меньше такового K_5 связывания профлавина с исследуемым тетрануклеотидом. Это, очевидно, также определяется наличием у хромофора бромистого этидия объемных боковых групп, которые создают определенные стерические препятствия при взаимодействии мономера тетрануклеотида с 1:1-комплексом DN, где бромистый этидий играет роль «скрепки». Характерно, что равновесные константы $K_3 < K_1$ и $K_4 < K_2$, т. е. связывание второй молекулы бромистого этидия как с одиночной нитью, так и с дуплексом имеет явно отрицательно кооперативный характер. По-видимому, краситель преимущественно встраивается в центральный C—G-участок тетрамера, поэтому присоединение еще одной молекулы бромистого этидия как к одиночной нити тетрануклеотида, так и к дуплексу маловероятно.

Этот вывод качественно подтверждается и расчетными значениями предельных значений протонных химических сдвигов в составе комплексов. Значения индуцированных химических сдвигов протонов бромистого этидия $\Delta\delta_i = \delta_m - \delta_i$, где величина $i=1, 2, 3, 4$ отвечает типу комплекса, для всех протонов в комплексах с одной молекулой красителя как с одиночной нитью ($\Delta\delta_1$), так и с дуплексом ($\Delta\delta_2$) превышают таковые $\Delta\delta_3$ и $\Delta\delta_4$ для соответствующих комплексов с двумя молекулами красителя. Очевидно, что расчетные значения $\Delta\delta_3$ в 2:1-комплексе и $\Delta\delta_4$ в 2:2-комплексе являются средними для двух связанных с тетрануклеотидом молекул красителя. Если предположить встраивание одной молекулы бромистого этидия в центральный C—G-участок, что подтверждается и результатами 2M-NOESY-спектроскопии, то другая молекула присоединяется, по всей вероятности, снаружи путем вертикального стэкинга к концевым нуклеотидам, поскольку экранирование ее протонов уменьшается. Из таблицы видно, что расчетные значения химических сдвигов протонов бромистого этидия δ_2 и δ_5 в 1:2-комплексе, так же как и при комплексообразовании профлавина с d(ACGT) [2], практически одинаковые. Это свидетельствует о том, что геометрия данного комплекса не зависит от того, каким путем шло его образование.

По найденным значениям констант реакций (схема IV) было рассчитано относительное содержание молекулярных ассоциатов в растворе в зависимости от $r = N_0/D_0$ — соотношения исходных концентраций дуплекса тетрануклеотида и красителя (рис. 5). Характерно, что здесь во многом проявляются те же общие закономерности, которые имели место при комплексообразовании профлавина с рассматриваемым тетрануклеотидом [2]. Среди них прежде всего следует отметить тот факт, что вклад в общее равновесие различного типа комплексов определяется не только значениями равновесных констант реакций, но и

существенно зависит от r . При малых r ($<0,5$) велика относительная концентрация комплексов 1:1 и 2:1 красителя с мономером тетра-нуклеотида (кривые 1, 3), так как содержание тетрамера d(ACGT) в дуплексной форме, как отмечалось выше, при исследуемой температуре незначительно. С ростом r наблюдается возрастание доли 1:2-комплекса, формирующегося как вследствие непосредственного связывания бромистого этидия с дуплексом (кривая 2), так и через «скрепку» (кривая 5), несмотря на очень малое значение равновесной константы K_s . Последнее обусловлено высокой вероятностью образования такой структуры по мере увеличения концентрации мономеров тетра-нуклеотида. Важно отметить, что, как и в [2], максимумы на концентрационных кривых для 1:1- и 2:1-комплексов наблюдаются при значениях r , близких к стехиометрическим соотношениям исходных концентраций красителя и тетра-нуклеотида для соответствующих типов комплексов. Качественное объяснение такого хода зависимостей дано в работе [1].

Анализ динамического равновесия при комплексообразовании молекул существен для установления вклада каждого типа комплекса в экспериментально наблюдаемый протонный химический сдвиг и для корректной интерпретации двумерных спектров 2M-NOESY, когда возникает вопрос о расчете структур образующихся комплексов по значениям интенсивностей сигналов NOE. Подобная проблема существует не только для случая интеркалирующих красителей, но и для лигандов с внешним типом связывания при их встраивании как в большую, так и малую канавки спирали [15]. Вместе с тем, в подавляющем большинстве опубликованных работ по связыванию лигандов с короткими олигонуклеотидами интерпретация экспериментальных результатов ЯМР проводится без соответствующего количественного анализа (см., например, [12]).

Геометрические структуры комплексов. Структуры комплексов бромистого этидия с d(ACGT) анализировали на основании рассчитанных предельных значений протонных химических сдвигов и данных 2M-NOESY. Из таблицы видно, что значения $\Delta\delta_i = \delta_m - \delta_i$, определяющие индуцированные химические сдвиги протонов красителя в области сильного поля, находятся в пределах (0,2÷1,4) для рассмотренных типов комплексов, что свидетельствует о значительном экранирующем влиянии азотистых оснований на все протоны бромистого этидия и предполагает интеркаляционное встраивание красителя между плоскостями оснований тетра-нуклеотида. Квантово-механические расчеты [16] показывают, что кольцевые токи азотистых оснований нуклеиновых кислот дают основной вклад ($\sim 70\%$) в экранирование ядер соседних молекул в сравнении с локальными диа- и парамагнитными эффектами и поляризуемостью связей. Для расчета химических сдвигов, вызванных кольцевыми токами, обычно применяют модель эквивалентного диполя [17], в которой действие круговых токов заменяется эквивалентным действием магнитных диполей, помещенных в центр каждого ароматического кольца молекулы. Соответствующим подбором величин магнитных моментов диполей и введением аппроксимирующих соотношений для учета дополнительного экранирования, не связанного с круговыми токами, можно получить достаточно точную оценку общего экранирования ядер азотистыми основаниями. Индуцированные химические сдвиги протонов красителя тогда могут быть рассчитаны следующим образом:

$$\Delta\delta = \sum_j \mu_j f(R, \varphi) (1 - 3 \cos^2 \Theta_j / r_j^3), \quad (4)$$

где μ_j — магнитный момент эквивалентного диполя j -го ароматического кольца азотистого основания; r_j — расстояние от j -го диполя до рассматриваемого протона; Θ_j — угол между направлением поля и вектором r_j ; $f(R, \varphi)$ — параметрическое регрессионное соотношение в виде многочлена для аппроксимации квантово-механических кривых экранирования; R, φ — полярные координаты в системе отсчета, связанной с

осью двойной спирали и плоскостью, в которой располагается хромофор ароматической молекулы красителя.

В настоящей работе рассчитывали экранирование протонов бромистого этидия нуклеотидными парами С:G и G:C в интеркалированном комплексе при вариации конформационных параметров спирали. Использовали алгоритм преобразований координат атомов и программу, реализующую этот алгоритм, разработанные в ИТЭБ РАН [18]. Последовательность преобразований координат при расчетах индуцированных химических сдвигов протонов красителя по соотношению (4) отвечала изменению параметров TW (пропеллер), BL (излом пары), TL

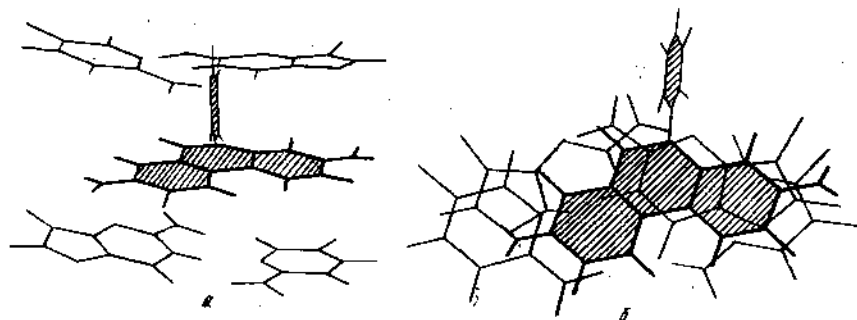


Рис. 6. Расчетная геометрическая структура участка комплекса 1:2 бромистого этидия с 5'-d(ApCpGpT), соответствующая интеркаляции красителя в d(CG)-сайт тетра-нуклеотида: а — вид на комплекс сбоку, со стороны широкой канавки спирального участка (хромофор и фенольное кольцо красителя заштрихованы); б — вид на молекулярный комплекс сверху перпендикулярно плоскостям оснований и хромофору красителя. Стрелка указывает направление к широкой канавке спирали.

(наклон пары), RL (крен), D (сдвиг), SL (скольжение), τ (закручивание), H (поднятие) [18], которые соответствуют параметрам ω , K , τ , ρ , D_x , D_y , Ω , D_z новой номенклатуры [19]. Структуры интеркалированных комплексов анализировали минимизацией квадратичного функционала невязки значений индуцированных протонных химических сдвигов, полученных из экспериментальных концентрационных зависимостей (таблица) и рассчитанных по соотношению (4) при вариации параметров спирали. В процессе вычислений параметры изменялись в пределах, соответствующих А- и В-семействам двойной спирали. На рис. 6 представлена в различных проекциях рассчитанная таким образом наиболее вероятная структура участка комплекса 1:2 бромистого этидия с тетра-нуклеотидом d(ACGT), отвечающая интеркаляции красителя в d(CG)-сайт тетрамера со стороны узкой канавки дуплекса. Пространственное изображение структуры получено с помощью программы «Mathematica 2.0» (Wolfram Res. Ltd). Длины связей и валентные углы в структуре молекулы бромистого этидия, необходимые для проведения расчетов, взяты из работы [20]. Интеркалированный комплекс характеризуется следующими параметрами спирали: $D_z=6,8 \text{ \AA}$; $\Omega=11^\circ$; $\omega=4,1^\circ$; $\tau=-4,4^\circ$; $D_x=0,47 \text{ \AA}$; $D_y=-0,45 \text{ \AA}$; $\rho=2,5^\circ$; $K=6^\circ$. Хромофор красителя располагается перпендикулярно оси спирали на равных расстояниях (3,4 Å) от плоскостей верхней и нижней пары оснований в CG-сайте. Результаты расчетов показали, что наиболее сильное влияние на экранирование отдельных протонов красителя оказывают расстояние между парами оснований в составе интеркалированного комплекса (D_z) и угол спирального вращения (Ω). Раскручивание соседних пар спирали в месте интеркаляции составляет 25° ($\Omega=11^\circ$), что хорошо согласуется как с данными рентгеноструктурных исследований подобного комплекса в кристалле [20], так и с результатами теоретических исследований [21, 22].

Что касается дезоксирибозы тетра-нуклеотида, то о ее конформации на основании проведенного анализа нельзя судить столь определенно, как о взаимной ориентации плоскостей ароматических оснований и

хромофора красителя в составе интеркалированного комплекса. Оценки с использованием суммарных констант спин-спинового взаимодействия для H1' и H2', H2'' протонов дезоксирибозы [23] позволяют сделать заключение о том, что пиримидиновые дезоксирибозные остатки находятся преимущественно в C3'-эндо-, а пуриновые — C2'-эндо-конформациях, что согласуется с ранее опубликованными экспериментальными и теоретическими результатами [20, 22].

Анализ значений индуцированных химических сдвигов для всех протонов бромистого этидия в комплексе 1:1 красителя с одиночной нитью тетра nukлеотида свидетельствует о том, что для этого комплекса более вероятно присоединение красителя к нити тетра nukлеотида со стороны ароматического кольца, содержащего протоны H2 и H4, так как значения $\Delta\delta(H2)$ и $\Delta\delta(H4)$ несколько больше, чем $\Delta\delta(H7)$ и $\Delta\delta(H9)$. Подобная ориентация красителя удовлетворяет стерическим условиям, поскольку фенольное кольцо, находящееся вне плоскости хромофора лиганда, создаст определенные препятствия для его встраивания между основаниями одиночной нити тетра nukлеотида со стороны протонов H7 и H9. Большие значения индуцированных химических сдвигов протонов бромистого этидия в 1:1-комплексе указывают на то, что расстояние между плоскостями оснований цитозина и гуанина в комплексе красителя с одиночной нитью меньше, чем в комплексе с двойной спиралью. Заметим, что такой же результат для 1:1-комплекса имеет место и при взаимодействии профлавина с дезокситетрануклеотидами [1, 2].

Проведенные исследования комплексообразования дезокситетрануклеотида 5'-d(ApCpGpT) с интеркалирующими лигандами — бромистым этидием и профлавином [2] позволяют сделать вывод о том, что характерные закономерности равновесия молекулярных ассоциатов в растворе, вероятные типы образующихся комплексов, специфика связывания красителей как с одиночной, так и двухспиральной формами нуклеотидных последовательностей, несмотря на существующую общность, в значительной степени определяются особенностями химической структуры интеркалирующих лигандов.

Авторы благодарны Британскому Совету за частичное финансирование (А. Н. В) экспериментальных исследований и Объединенному исследовательскому центру Лондонского университета — за использование для измерений ЯМР-спектрометра (500 МГц) в Беркбек-колледже.

*О. Н. Веселков, Л. М. Димант, П. О. Болотин,
С. Ф. Барановский, Д. О. Веселков, Д. Шипп, Д. Девис*

ДОСЛІДЖЕННЯ ВЗАЄМОДІЇ БРОМИСТОГО ЕТИДІЮ З САМОКОМПЛЕМЕНТАРНИМ ДЕЗОКСИТЕТРАНУКЛЕОТИДОМ 5'-d (ApCpGpT) У ВОДНОМУ РОЗЧИНІ МЕТОДОМ ¹H-ЯМР СПЕКТРОСКОПІЇ

Резюме

Вивчено комплексоутворення барвника бромистого етидію (3,8-діаміно-6-феніл-5-етил-фенантрин) з самокомплементарним дезокситетрарибонуклеозидтрифосфатом 5'-d (ApCpGpT) у водно-солевому розчині методом одновимірної (500 МГц) і двовимірної (600 МГц) ¹H-ЯМР спектроскопії. Двовимірну гомодерну ПМР спектроскопію (2M-NOESY) використано для якісного аналізу характеру взаємодії бромистого етидію з тетра nukлеотидом. Виміряно концентраційні залежності протонних хімічних зсувів молекул при фіксованій температурі (T=298 K). Розглянуто різноманітні схеми комплексоутворення молекул барвника з тетра nukлеотидом, які враховують різні молекулярні асоціати у розчині. Визначено рівноважні константи реакцій і граничні значення хімічних зсувів протонів бромистого етидію у складі комплексів. Проаналізовано відносний вміст комплексів різного типу у розчині і виявлено особливості динамічної рівноваги в залежності від співвідношення концентрацій барвника і тетра nukлеотиду. На основі отриманих даних зроблено висновок щодо переважної інтеркаляції бромистого етидію у пиримидин-пуринову ділянку тетра nukлеотидної послідовності (CG-сайт) у дуплексній формі подібно до вивченого раніше акридинового барвника профлавіна.

Вбудовування бромистого етидію відбувається з боку малої канавки дуплексу на відміну від профлавіна, інтеркалюючого з великого жолобка подвійної спіралі. Побудовано найвірогіднішу структуру 1:2 барвника з тетрануклеотидом у розчині виходячи з розрахованих значень індукованого хімічного зсуву протонів бромистого етидію і даних 2M-NOE-спектрів.

A. N. Veselkov, L. N. Djimant, P. A. Bolotin,
S. F. Baranovsky, D. A. Veselkov, D. Shipp, D. B. Davies

INVESTIGATION OF THE INTERACTION OF ETHIDIUM BROMIDE
WITH SELF COMPLEMENTARY DEOXYTETRANUCLEOTIDE 5'-d (ApCpGpT)
IN AQUEOUS SOLUTION BY THE METHOD OF ^1H NMR SPECTROSCOPY

Summary

Complex formation between dye ethidium bromide (3,8-diamino-6-phenyl-5-ethyl-phenanthridinium) and self-complementary deoxytetra-ribonucleoside triphosphate 5'-d (ApCpGpT) in aqueous salt solution has been studied by method of one-dimensional (500 MHz) and two-dimensional ^1H NMR spectroscopy (600 MHz). Two-dimensional homonuclear ^1H NMR spectroscopy was used for qualitative analysis of the nature of interactions of ethidium bromide with tetranucleotide. Concentration dependences of proton chemical shifts of the molecules have been measured at fixed temperature ($T=298\text{ K}$). Different schemes of complex formation between dye molecules and tetranucleotide have been examined taking into account various molecular associations in solution. Analysis of the relative content of different types of complexes has been made and special features of dynamic equilibrium have been revealed as a function of both the dye and tetranucleotide concentrations. The present analysis leads to the conclusion that ethidium bromide binds preferentially to pyrimidine-purine sequence (CG-site) of the tetranucleotide duplex similar to the observed proflavine-(ApCpGpT) binding studied earlier. Ethidium bromide intercalates from the minor groove of the double helix in contrast to proflavine which binds from the major groove. The most favourable structure of the 1:2 complex of dye with the tetranucleotide has been constructed using calculated values of induced chemical shifts of ethidium bromide protons in conjunction with intermolecular NOEs.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Davies D. B., Djimant L. N., Veselkov A. N. ^1H NMR structural analysis of the interactions of proflavine with self-complementary deoxytetranucleotides of different base sequence // *Nucleosides and Nucleotides*.—1994.—13, N 1—3.—P. 637—655.
2. Весселков А. Н., Дэвис Д., Дымант Л. Н., Паркес Х. Исследование взаимодействия профлавіна с дезокситетрарибонуклеозидтрифосфатом d (ApCpGpT) в водном растворе методом ^1H -ЯМР спектроскопии // *Биополимеры и клетка*.—1991.—7, № 6.—С. 5—15.
3. Kastrup R. V., Young M. A., Krugh T. R. Ethidium bromide complexes with self-complementary deoxytetranucleotides. Demonstration and discussion of sequence preferences in the intercalative binding of ethidium bromide // *Biochemistry*.—1978.—17, N 12.—P. 4855—4863.
4. Feigon J., Leupin W., Denny W. A., Kears D. R. Binding of ethidium derivatives to natural DNA: a 300 MHz ^1H NMR study // *Nucl. Acids Res.*—1982.—10, N 2.—P. 749—761.
5. Dahl K. S., Pardi A., Tinoco I., Jr. Structural effects on the circular dichroism of ethidium ion-nucleic acid complexes // *Biochemistry*.—1982.—21, N 8.—P. 2730—2737.
6. Nelson J. W., Tinoco I., Jr. Intercalation of ethidium ion into DNA and RNA oligonucleotides // *Biopolymers*.—1984.—23, N 1.—P. 213—233.
7. Kreishman G. P., Chan S. I. Binding of ethidium bromide to single-stranded nucleic acids // *J. Mol. Biol.*—1971.—61, N 1.—P. 45—58.
8. Monaco R. R., Hausheer F. H. Binding site of ethidium cation in the major groove of B-form DNA // *J. Biomol. Struct. and Dyn.*—1993.—10, N 4.—P. 675—680.
9. Весселков А. Н., Дэвис Д., Дымант Л. Н. и др. 1M- и 2M-Н ЯМР исследование самоассоциации дезокситетрарибонуклеозидтрифосфатов различной последовательности оснований в водном растворе // *Биополимеры и клетка*.—1991.—7, № 5.—С. 15—22.
10. Baldini G., Varani G. The role of the solvent on the binding of ethidium bromide to DNA in alcohol-water mixtures // *Biopolymers*.—1985.—25, N 10.—P. 2187—2208.
11. Весселков А. Н., Дымант Л. Н., Барановский С. Ф. и др. Исследование самоассоциации бромистого етидия в водном растворе методом ^1H -ЯМР спектроскопии // *Хим. физика*.—1994.—13, № 11.—С. 72—80.

12. Gao X., Patel D. Antitumour drug-DNA interactions: NMR studies of echinomycin and chromomycin complexes // *Quart. Revs Biophys.*— 1989.— 22, N 2.— P. 93—138.
13. Веселков А. Н., Дэвис Д., Дымант Л. Н., Паркес К. Исследования взаимодействия профлавина с дезокситетрарибонуклеозидтрифосфатом d(GpCpGpC) методом Н-ЯМР спектроскопии // *Молекуляр. биология.*— 1991.— 26, № 6.— С. 1504—1516.
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. Jenkins T. C., Lane F. N., Neidle S., Brown D. G. NMR and molecular modelling studies of the interaction of berenil and pentamidine with d(CGCAAATTTGCG) // *Eur. J. Biochem.*— 1993.— 213.— P. 1175—1184.
16. Giessner-Prettre C., Pullman B. Quantum mechanical calculations of NMR chemical shifts in nucleic acids // *Quart. Revs Biophys.*— 1987.— 20, N 3/4.— P. 113—172.
17. Abraham R. J. The application of aromatic ring currents in the elucidation of drug-ligand and metallo-porphyrin complexations // *Nuclear magnetic resonance spectroscopy in molecular biology.*— Dordrecht, 1978.— P. 461—479.
18. Полтев В. Н., Теплухин А. В. Взаимодействие оснований и конформационные проявления последовательностей повторяющихся нуклеотидов // *Молекуляр. биология.*— 1987.— 21, № 1.— С. 102—115.
19. Dickerson R. E. Definitions and nomenclature of nucleic acid structure parameters // *J. Biomol. Struct. and Dyn.*— 1989.— 6, N 4.— P. 627—634.
20. Jain S. C., Tsai C.-C., Sobell H. M. Visualization of drug-nucleic acid interactions at atomic resolution. II. Structure of an ethidium / dinucleoside monophosphate crystalline complex ethidium: 5'-iodocytidyl-(3'-5')-guanosine // *J. Mol. Biol.*— 1977.— 14, N 2.— P. 317—331.
21. Lybrand T., Kollman P. Molecular calculations on the interaction of ethidium cation with double-helical DNA // *Biopolymers.*— 1985.— 24, N 8.— P. 1863—1879.
22. Chen K.-X., Gresh N., Pullman B. A theoretical exploration of conformational aspects of ethidium bromide intercalation into a d(CpG) minihelix // *Ibid.*— 1987.— 26, N 3.— P. 831—848.
23. Searitz M. S. NMR studies of drug-DNA interactions // *Progr. NMR Spectr.*— 1993.— 25.— P. 403—480.

Севастополь. гос. техн. ун-т
Лондон. ун-т, Беркбек-колледж

Получено 19.09.94