

# Анализ взаимодействия антибиотика дауномицина с дезокситетрануклеотидом 5'-d(TrGrCpA) в водном растворе методом ЯМР-спектроскопии

А. Н. Веселков, Р. Дж. Итон<sup>1</sup>, С. Ф. Барановский, С. Г. Осетров, В. И. Пахомов, П. А. Болотин, Л. Н. Дымант, Д. Б. Дэвис<sup>1</sup>

Севастопольский государственный технический университет Министерства просвещения Украины  
Студгородок, Севастополь, 335053, Украина

<sup>1</sup> Беркбек колледж Лондонского университета  
Гордон Хауз, 29, Лондон WC1N 0PP, Великобритания

*Методом одномерной и двумерной (2M-TOCSY и 2M-NOESY) гомоядерной ПМР-спектроскопии и гетероядерной 2M-<sup>1</sup>H-<sup>31</sup>P-ЯМР-спектроскопии (500 МГц) исследовано комплексообразование антибиотика дауномицина с дезокситетрануклеотидом 5'-d(TrGrCpA) в водно-солевом растворе. По измеренным концентрационным и температурным зависимостям протонных химических сдвигов молекул рассчитаны равновесные константы реакций, относительное содержание различных типов комплексов в зависимости от концентраций и температуры и термодинамические параметры  $\Delta H$  и  $\Delta S$  комплексообразования молекул. Анализ полученных результатов позволяет сделать вывод о том, что местами преимущественной посадки дауномицина являются триплетные нуклеотидные последовательности. Связывание второй молекулы дауномицина как с одоцепочечной, так и с дуплексной формой тетрамера носит выраженный антикооперативный характер. Построена наиболее вероятная пространственная структура комплекса 1:2 антибиотика с дезокситетрануклеотидом по расчетным значениям предельных значений химических сдвигов протонов дауномицина в составе комплекса и данным 2M-NOE.*

**Введение.** Дауномицин относится к используемым в клинической практике антиопухолевым препаратам антрациклиновой группы антибиотиков. Их биологическая активность в значительной степени обусловлена наличием тетрагидротетрацендионного хромофора, содержащего три копланарных шестичленных кольца (рис. 1). Известно, что эффективность дауномицина как химиотерапевтического агента заключена в его способности связываться с ДНК и ингибировать при этом синтез ДНК и РНК [1, 2].

В настоящее время считается, что дауномицин взаимодействует с ДНК за счет интеркаляции [1, 2]. На основе данных рентгеноструктурного анализа волокон комплексов ДНК с дауномицином пер-

воначально была построена модель комплексообразования, согласно которой аминсахарное кольцо антибиотика располагается в большой бороздке ДНК [3] так, что положительно заряженный атом азота находится вблизи отрицательно заряженной фосфатной группы ДНК. Предполагалось, что электростатическое взаимодействие положительно заряженного атома N(3') аминсахарного остатка с фосфатом полинуклеотидного остова играет значительную роль в стабилизации интеркаляционного комплекса. Однако впоследствии [4, 5] при исследовании кристаллических структур дауномицин — дезоксиолигонуклеотид был обнаружен несколько иной механизм интеркаляции, когда аминсахарное кольцо располагается в малой бороздке ДНК, а аминогруппа дауномицина расположена довольно далеко от фосфатов остова ДНК и, следовательно, электростатическое взаимодействие между ними практически не влияет на стабильность комплек-

© А. Н. ВЕСЕЛКОВ, Р. ДЖ. ИТОН, С. Ф. БАРАНОВСКИЙ,  
С. Г. ОСЕТРОВ, В. И. ПАХОМОВ, П. А. БОЛОТИН,  
Л. Н. ДЫМАНТ, Д. Б. ДЭВИС, 1999

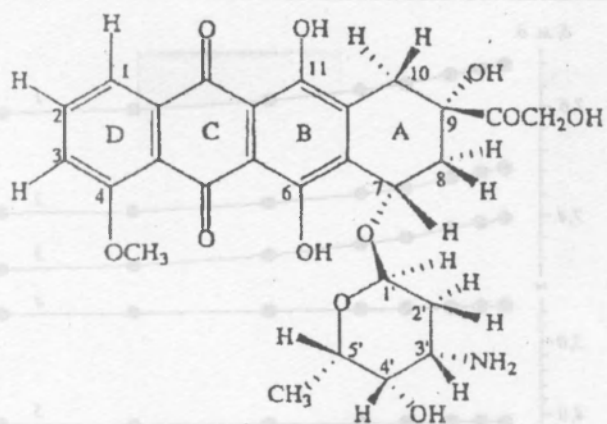


Рис. 1. Структурная формула молекулы дауномицина

сов. Интересно отметить, что в одной из первых работ [6] по исследованию спектров кругового дихроизма водных растворов дауномицина с ДНК и классических интеркаляторов — аминокридинов с ДНК было сделано предположение о том, что способы интеркаляции красителей и антибиотика существенно различны. Кроме того, по экспериментальным данным, антрациклиновый антибиотик дауномицин не проявляет столь явной и однозначной сиквенс-специфичности при взаимодействии с ДНК, как это имеет место для ряда других интеркалирующих лигандов. Так, сведения о селективном связывании дауномицина с синтетическими дезоксиолигонуклеотидами довольно противоречивы [7] и можно лишь сделать вывод о том, что антибиотик дауномицин преимущественно связывается с полинуклеотидами, содержащими чередующиеся пурин-пиримидиновые (пуг-пуг) последовательности оснований в цепи [8]. Теоретический анализ [9, 10] сиквенс-специфичности взаимодействия дауномицина с ДНК также дает противоречивые результаты. Экспериментальные исследования, проведенные с нативной ДНК в растворе [11], свидетельствуют о наличии GC-пар оснований в местах преимущественного связывания дауномицина. В работе [12] показано, что местами преимущественной посадки антибиотика дауномицина являются триплеты, содержащие две соседние GC-пары оснований различной последовательности, фланкированные AT-парой оснований. Однако следует отметить, что требование наличия А- или Т-оснований с 5'-конца триплета не является абсолютным [12].

В настоящей работе методом одномерной и двухмерной  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектроскопии (500 МГц) ис-

следовано комплексобразование антрациклинового антибиотика дауномицина с дезокситетрануклеотидом 5'-d(ТрGpCpA) в водном растворе.

Выбор олигонуклеотида обусловлен тем, что тетрамер имеет один пуг-пуг-сайт (d(G-C)) и два пуг-пуг-сайта (d(T-G) и d(C-A)) в последовательности. При этом рассматриваемый дезокситетрануклеотид содержит триплетные последовательности, соответствующие местам преимущественного связывания антибиотика, обнаруженным в работе [12]. Ранее [13, 14] в тех же экспериментальных условиях, что и в настоящей работе, изучено связывание акридинового красителя профлавина и фенантридинового красителя бромистого этидия с рассматриваемым дезокситетрануклеотидом 5'-d(ТрGpCpA) методом  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектроскопии. Это послужило основой для сравнительного анализа структур комплексов, а также термодинамических параметров комплексобразования, что важно для выяснения природы сиквенс-специфичности связывания лигандов с ДНК.

**Методика.** Дауномицин («Sigma», США) использовали без дополнительной очистки, лиофилизировали из  $\text{D}_2\text{O}$  с изотопной чистотой 99,95 % D и растворяли в дейтерированном 0,1 М фосфатном буфере (pD 7,1), содержащем  $10^{-4}$  моль/л ЭДТА. Концентрацию антибиотика определяли спектрофотометрически — для дауномицина коэффициент экстинкции  $\epsilon = 11500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  ( $\lambda = 480 \text{ nm}$ ) [15].

Дезокситетрарибонуклеозидтрифосфат 5'-d(ТрGpCpA) синтезирован компанией «OSWEL DNA SERVICE» (Великобритания). Образцы олигонуклеотида также лиофилизировали из  $\text{D}_2\text{O}$  и растворяли в дейтерированном 0,1 М фосфатном буфере, содержащем  $10^{-4}$  моль/л ЭДТА. 1М- и 2М- $^1\text{H}$ -ЯМР-спектры измерены на спектрометре «Bruker DRX» с резонансной частотой 500 МГц. Химические сдвиги необменивающихся протонов измеряли относительно внутреннего стандарта ТМА (бромид тетраметиламмония). Методика приготовления образцов и проведения эксперимента описана в [13, 14, 16].

Концентрационные измерения протонных химических сдвигов молекул выполнены при двух температурах (303 и 323 К) в интервале концентраций тетрануклеотида от 3,58 до 0,06 ммоль/л и постоянном процентном содержании дауномицина в растворе (0,783 ммоль/л). Температурные зависимости химических сдвигов протонов молекул в смешанном растворе измерены в диапазоне температур от 278 до 338 К. Двухмерные гомоядерные эксперименты TOCSY, NOESY и ROESY, использованные для отнесения сигналов необменивающихся протонов молекул и для качественного опре-

деления характера комплексообразования антибиотика с олигонуклеотидом, проводили при  $T = 303$  К. Для анализа  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$ -спиновой системы использован метод HMBSC (heteronuclear multiple bond correlation — гетероядерная корреляция дальнего порядка, распространяющаяся на несколько химических связей) [17]. Температуру образца в процессе эксперимента поддерживали с помощью терморегулятора BVT-3000.

Результаты и обсуждение. Предварительно выполненное отнесение сигналов протонов дауномицина [18] и исследуемого дезокситетрануклеотида [19] позволило провести отождествление спектров смешанных растворов и выявить возможные связи ядер молекул антибиотика и тетрамера. В спектрах 2M-NOESY и 2M-ROESY таких растворов, полученных при различных временах смешивания ( $\tau_{m1} = 90$  мс и  $\tau_{m2} = 200$  мс), наблюдается лишь небольшое количество межмолекулярных кросс-пиков между протонами дауномицина и тетрамера, как это имеет место и при исследовании связывания интеркалирующих лигандов — профлавина и бромистого этидия с данным дезокситетрануклеотидом [13, 14]. В спектре дауномицина с дезокситетрануклеотидом d(TGCA) наблюдаются межмолекулярные кросс-пики между протонами H2', H2'' аминокислотного остатка антибиотика и протонами H1'(C3) цитозина, что позволяет сделать заключение о преимущественной интеркаляции хромофора антибиотика в руг-руг-сайт d(T1-G2) в начале тетрауклеотидной последовательности. Это подтверждается также сравнительным анализом двумерных гетероядерных корреляционных  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$  спектров раствора дезокситетрануклеотида d(TGCA) и смешанного раствора тетрамера с дауномицином, из чего следует вывод о более сильном смещении сигнала фосфата C(3)рA(4) в сравнении с другими фосфатами в цепи при комплексообразовании антибиотика с олигонуклеотидом, что свидетельствует о значительных конформационных изменениях вторичной структуры олигомера на данном участке последовательности при интеркаляционном связывании лиганда в дуплекс [20].

Количественную оценку взаимодействия дауномицина с дезокситетрануклеотидом проводили, как и ранее [13, 14], на основе анализа экспериментальных концентрационных зависимостей химических сдвигов протонов молекул при различных температурах (рис. 2). Рассмотрено динамическое равновесие, включающее как образование различного типа комплексов, так и реакции димеризации молекул олигонуклеотида и антибиотика. По условиям эксперимента, константа димеризации  $K_d$  да-

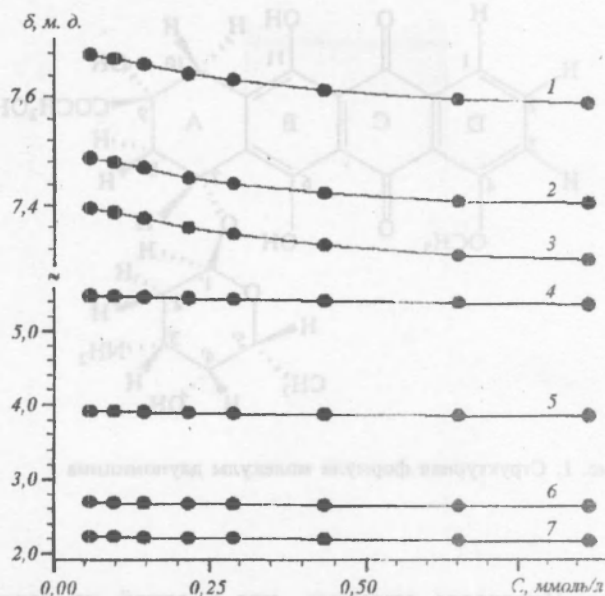
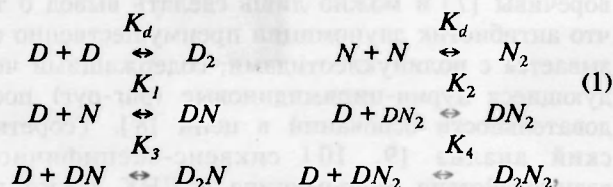


Рис. 2. Экспериментальные концентрационные зависимости химических сдвигов необменивающихся протонов дауномицина в растворе с дезокситетрануклеотидом 5'-d(TGCA) при  $T = 303$  К,  $D_0 = 0,783 \cdot 10^{-3}$  М: 1 — H1; 2 — H2; 3 — H3; 4 — H1'; 5 — OCH<sub>3</sub>; 6 — H10e; 7 — H8e

уномицина при  $T = 303$  К принята равной 290 л/моль [18].

Общая схема взаимодействия молекул включает равновесные реакции в растворе:



где  $D$  и  $N$  — концентрации мономеров дауномицина и тетрауклеотида. При расчете по этой схеме наблюдаемый протонный химический сдвиг в молекуле антибиотика представлен в виде [13, 14]

$$\begin{aligned}
 \delta = D/D_0(\delta_m + 2K_d D \delta_d + K_1 N \delta_1 + K_N K_2 N^2 \delta_2 + \\
 + 2K_1 K_3 D N \delta_3 + 2K_N K_2 K_4 D N^2 \delta_4). \quad (2)
 \end{aligned}$$

Минимизацию функционала невязки экспериментальных и расчетных значений протонных химических сдвигов осуществляли по восьми параметрам:  $\delta_1$ — $\delta_4$  — предельные значения химических сдвигов протонов антибиотика в составе комплексов 1:1, 1:2, 2:1 и 2:2;  $K_1$ — $K_4$  — равновесные кон-



станты соответствующих типов комплексов. Детальное описание вычислительной процедуры нахождения параметров изложено в предыдущих работах [13, 14]. Отметим, что рассматриваемая модель (2) предполагает достаточно быстрый обмен в равновесных реакциях комплексообразования. Проведенные в настоящей работе ЯМР эксперименты свидетельствуют об отсутствии существенного уширения резонансных сигналов протонов во всем исследованном диапазоне концентраций и температур. Это подтверждает допустимость использования аддитивной модели при описании зависимости наблюдаемых протонных химических сдвигов от концентрации и температуры.

Полученные в результате расчетов значения равновесных констант  $K_1$ — $K_4$  представлены в табл. 1. Величины констант  $K_1$ — $K_4$  для реакций комплексообразования профлавина [13] и бромистого этидия [14] с тетра nukлеотидом 5'-d(TGCA) в идентичных экспериментальных условиях существенно отличаются как в качественном, так и в количественном отношении от значений в табл. 1. Обращает на себя внимание то, что вероятность образования в растворе комплекса 1:2 дауномицина с 5'-d(TGCA), характеризуемая константой  $K_2$ , существенно выше, чем других комплексов в водном растворе. При этом величина константы  $K_2$  примерно на порядок превышает соответствующие значения констант для реакций образования подобного типа комплексов между тетра nukлеотидом и бромистым этидием [14] и на два порядка — комплекса с акридиновым красителем профлавином [13].

В отличие от сравнительно простых интеркаляторов — профлавина и бромистого этидия, хромофоры которых не содержат массивных боковых групп или цепей, в структуре антибиотика дауномицина к тетрагидротетраценхионному хромофо-

ру присоединено массивное положительно заряженное аминсахарное кольцо, располагающееся при связывании антибиотика с ДНК в ее малой бороздке [4, 5]. Это определяет достаточно большой «параметр исключения» ( $n = 3,3 \div 3,5$  пар оснований) в модели исключенного соседа, полученный при исследовании взаимодействия дауномицина с ДНК методом спектрофотометрии [11, 21]. Согласно данным рентгеноструктурного анализа [4, 5], аминсахарный остаток, расположенный в малой бороздке ДНК, частично блокирует третью пару оснований. Кроме того, конформационные изменения в двойной спирали, связанные с интеркаляцией дауномицина, могут препятствовать встраиванию антибиотика в соседние с участком интеркаляции сайты последовательности ДНК [5]. Из табл. 1 видно, что значение равновесной константы  $K_4$ , характеризующей вероятность образования в растворе комплекса 2:2 дауномицина с дезокситетрануклеотидом, довольно низкое, то есть связывание второй молекулы антибиотика с дуплексом тетрамера имеет явно антикооперативный характер. Этот факт с учетом данных 2M-NOESY и результатов по комплексообразованию ароматических красителей профлавина и бромистого этидия с дезокситетрануклеотидом d(TGCA) в идентичных экспериментальных условиях [13, 14] однозначно свидетельствует о том, что местами преимущественной посадки антибиотика дауномицина являются как минимум триплетные нуклеотидные последовательности. Полученный результат находится в согласии с экспериментальными исследованиями сиквенс-специфичности связывания дауномицина с ДНК в водном растворе [12].

Значение равновесной константы  $K_3$  образования комплексов 2:1 дауномицина с одноцепочечным дезокситетрануклеотидом существенно ниже, чем комплексов 1:1 (табл. 1), то есть связывание второй молекулы антибиотика с тетрамером в мономерной форме имеет также антикооперативный характер. Это, очевидно, определяется наличием у хромофора антибиотика массивного положительно заряженного аминсахарного остатка, создающего определенные стерические препятствия при посадке второй молекулы дауномицина на короткую тетра nukлеотидную последовательность.

По значениям констант равновесия (табл. 1) было рассчитано относительное содержание молекулярных комплексов  $f$  в зависимости от  $r = N_2/D_0$  (отношения концентраций дезокситетрануклеотида в дуплексе к исходной концентрации дауномицина). Из рис. 3, где приведены эти зависимости, видно, что вклад в общее равновесие различного типа комплексов определяется не только значения-

Таблица 1  
Расчетные значения равновесных констант и термодинамических параметров  $\Delta H$ ,  $\Delta S$  реакций образования комплексов дауномицина с дезокситетрануклеотидом 5'-d(TGCA) при  $T = 303$  K

Комплекс	$K_i, 10^3 \text{ M}^{-1}$	$-\Delta H, \text{ кДж/моль}$	$-\Delta S, \text{ Дж/(моль K)}$
1 : 1	$30,6 \pm 7,7$	$81,6 \pm 7,7$	$183 \pm 18$
1 : 2	$430 \pm 100$	$39,2 \pm 6,8$	$21 \pm 4$
2 : 1	$5,4 \pm 0,4$	$47,5 \pm 9,5$	$85 \pm 17$
2 : 2	$12,5 \pm 0,5$	$59,0 \pm 14,3$	$116 \pm 29$

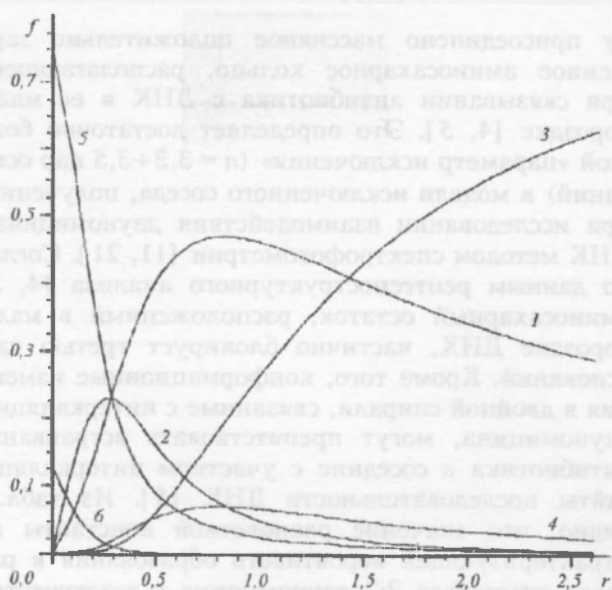


Рис. 3. Зависимости относительного содержания мономеров и димеров дауномицина и комплексов антибиотика с 5'-d(TGCA) в водном растворе от  $r = N_2/D_0$  при  $T = 303$  К и  $D_0 = 0,783 \cdot 10^{-3}$  М: 1 — DN; 2 —  $D_2N$ ; 3 —  $DN_2$ ; 4 —  $D_2N_2$ ; 5 — D; 6 —  $D_2$

ми равновесных констант реакций, но также и величиной  $r$ . Относительное содержание комплексов 1:1 и 2:1 дауномицина с одной нитью тетра- нуклеотида оказывается довольно значительным при малых  $r$  ( $r < 0,5$ ), в то время как доля комплекса 1:2 становится преобладающей при  $r > 1,0$ . Как уже отмечалось [13, 14], максимумы концентрационных кривых комплексов 1:1, 2:1 и 2:2 соответствуют значениям  $r$ , близким к стехиометрическим соотношениям исходных концентраций лиганда и тетра- нуклеотида для соответствующих типов комплексов. Анализ динамического равновесия различных комплексов молекул в растворе важен для определения вклада каждого типа комплекса в экспериментально наблюдаемый химический сдвиг и для надежного определения термодинамических параметров их образования [13].

Термодинамические параметры реакций взаимодействия дауномицина с 5'-d(TGCA) определены, как и ранее [22], на основе экспериментальных температурных зависимостей химических сдвигов протонов дауномицина в растворе с тетра- нуклеотидом 5'-d(TGCA) (рис. 4) и аддитивной модели для наблюдаемого протонного химического сдвига антибиотика при различных температурах. Величины энтальпии ( $\Delta H$ ) и энтропии ( $\Delta S$ ) рас-

считывали с использованием параметрических регрессионных уравнений для анализа зависимостей мольных долей от температуры и формализма Вант-Гоффа [22]. Полученные значения энтальпии и энтропии реакций дауномицина с дезокситетра- нуклеотидом 5'-d(TGCA) в растворе приведены в табл. 1. Видно, что  $\Delta H$  реакций комплексообразования дауномицина с тетра- нуклеотидом имеют достаточно большие отрицательные значения. Как известно, экзотермические реакции присущи процессам агрегации, включающих в себя стэкинг-взаимодействие ароматических систем с делокализованными  $\pi$ -электронами [11, 23]. Установлено, что дисперсионное взаимодействие характеризуется как отрицательной энтальпией, так и отрицательной энтропией [24]. Вместе с тем, согласно данным рентгеноструктурного анализа комплексов дауномицин — дезоксиолигонуклеотид [4, 5], между антибиотиком и соседними основаниями в интеркалированном комплексе могут образовываться от трех до пяти водородных связей (Н-связей) [23]. По имеющимся в литературе данным, энтальпия образования Н-связи в водной среде принимает значения от  $-8$  до  $-13$  кДж/моль [25]. При возникнове-

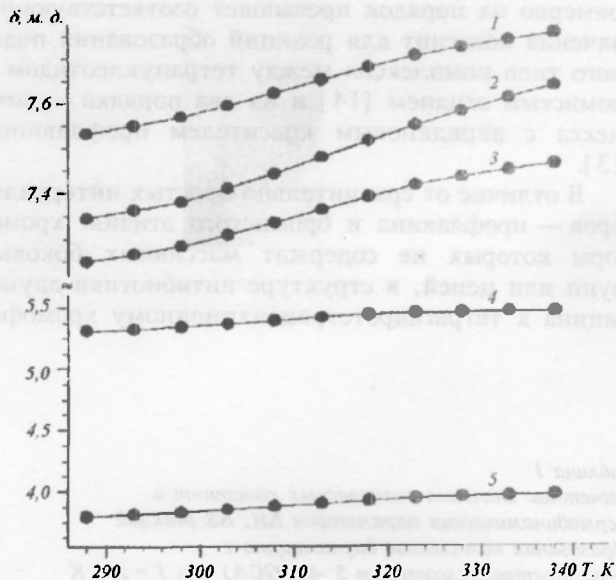


Рис. 4. Экспериментальные температурные зависимости химических сдвигов необмениваемых протонов дауномицина в водном растворе с 5'-d(TGCA) при  $D_0 = 0,783 \cdot 10^{-3}$  М;  $N_0 = 0,652 \cdot 10^{-3}$  М: 1 — H1; 2 — H2; 3 — H3; 4 — H1'; 5 — OCH<sub>3</sub>

нии Н-связи следует ожидать также и отрицательного изменения энтропии [26]. Следовательно, можно считать, что основной вклад в отрицательные значения термодинамических параметров комплексообразования дауномицина с дезокситетрануклеотидами вносят межмолекулярные взаимодействия — Н-связи и силы Ван-дер-Ваальса.

Положительный энтропийный вклад, прежде всего, определяется гидрофобными взаимодействиями, связанными с переносом молекулы антибиотика в место интеркаляции. Значительный вклад гидрофобных взаимодействий наблюдается в случае реакции образования комплексов 1:2 дауномицина с двухспиральными дезокситетрануклеотидами, то есть изменение энтропии при формировании таких комплексов заметно меньше по абсолютной величине, чем  $\Delta S$  для других комплексов антибиотика с тетрамером (табл. 1). Можно предположить, что при связывании дауномицина с дуплексом дезокситетрануклеотида его аминокислотное кольцо, располагаясь в малой бороздке двойной спирали, вытесняет имеющиеся там молекулы воды [27] и тем самым вносит дополнительный положительный вклад в  $\Delta S$ . Отметим при этом, что в комплексах 1:2 дауномицина с дезокситетрануклеотидом достаточно весомый вклад в отрицательное значение  $\Delta S$  может дать возрастание жесткости двухспиральной структуры при встраивании молекулы антибиотика [19]. Энтропия в этом случае уменьшается вследствие ограничения числа возможных конформационных состояний [26].

Из табл. 1 видно, что термодинамические параметры  $\Delta H$  и  $\Delta S$  образования комплекса 1:1 дауномицина с одноцепочечной тетрануклеотидной последовательностью существенно выше по абсолютной величине, чем  $\Delta H$  и  $\Delta S$  связывания антибиотика с дуплексом тетрамера. Это, по-видимому, связано со значительно большими конформационными изменениями в одноцепочечной последовательности и ощутимо меньшей ролью гидрофобных взаимодействий, дающих положительный вклад в  $\Delta H$  и  $\Delta S$ , при комплексообразовании ароматических лигандов с однонитчатым олигонуклеотидом по сравнению с двухспиральным [22]. Следует отметить, что качественно аналогичная картина для комплексов 1:1 и 1:2 имела место и при связывании ароматических молекул красителей профлавина [13] и бромистого этидия [14] с дезокситетрануклеотидом 5'-d(TGCA).

Значения энтальпии и энтропии образования комплекса 2:1 дауномицина с одноцепочечным дезокситетрануклеотидом меньше по абсолютной величине, чем  $\Delta H$  и  $\Delta S$  для комплекса 1:1 (табл. 1). Можно предположить, что наблюдаемые различия

определяются, в основном, стерическими факторами: местами преимущественной посадки дауномицина являются триплетные нуклеотидными последовательности, при этом аминокислотный остаток частично блокирует третье азотистое основание в цепи тетрамера и тем самым ограничивает число возможных контактов второй молекулы антибиотика с нуклеотидной последовательностью. В случае же комплекса 2:2, когда две молекулы дауномицина взаимодействуют с дуплексом тетрамера, некоторое увеличение абсолютных значений  $\Delta H$  и  $\Delta S$  по сравнению с комплексом 1:2, возможно, связано с тем, что вторая молекула дауномицина (также по стерическим причинам) присоединяется снаружи двойной спирали за счет стэкинг-взаимодействия между хромофором антибиотика и терминальной парой оснований тетрануклеотидного дуплекса. Следует отметить, что значения энтальпии и энтропии образования комплексов дауномицин — дезоксиолигонуклеотид, полученные в настоящей работе, хорошо согласуются с величинами  $\Delta H$  и  $\Delta S$ , определенными методом микрокалориметрии при исследовании связывания антибиотика с полимерной молекулой ДНК [23] и синтетическими полинуклеотидами с чередующимися типами (pur-pur, pur-pur) оснований в цепи [28].

*Структуры комплексов.* Индуцированные химические сдвиги протонов дауномицина  $\Delta\delta_i = \delta_m - \delta_f$ , где  $i = 1, 2, 3, 4$  соответствует типу комплекса (табл. 2), значительно меньше, чем рассчитанные величины  $\Delta\delta_i$  для аналогичных комплексов исследованного тетрануклеотида с красителями профлавином и бромистым этидием [13, 14]. Относительно низкое экранирование необмениваемых протонов дауномицина в комплексах с одноцепочечным и двухспиральным дезокситетрануклеотидом предполагает, что взаимная ориентация хромофора антибиотика и плоскостей пар оснований существенно отлична от наблюдаемой для ароматических молекул красителей профлавина и бромистого этидия.

В частности, можно сделать заключение, что хромофор антибиотика ориентирован не параллельно, а перпендикулярно длинной оси пар оснований в спирали, как это имеет место в кристаллической структуре интеркалированного комплекса [4, 5]; необмениваемые протоны в А- и D-кольцах хромофора (рис. 1) располагаются при этом достаточно далеко от плоскостей пар оснований в интеркалированном комплексе и их экранирование невелико.

Анализ структуры комплексов 1:2 дауномицина с дезокситетрануклеотидным дуплексом проводили, как и раньше [13, 14], на основании расчи-



таных значений индуцированных химических сдвигов протонов (табл. 2) и данных 2М-ЯМР спектроскопии. Использовали модифицированную модель эквивалентных магнитных диполей [14], полученную в результате аппроксимации квантово-механических кривых экранирования для азотистых оснований нуклеиновых кислот [29]. При расчете пространственной структуры комплекса дауномицина с дезокситетрануклестидом d(TGCA) применяли алгоритм преобразования координат атомов и программу, реализующую этот алгоритм, разработанную в ИТЭБ РАН [30]. Последовательность преобразований координат в двойной спирали отвечала изменению параметров  $\omega$  (пропеллер),  $\kappa$  (излом пары),  $\tau$  (наклон пары),  $\rho$  (крен),  $D_x$  (сдвиг),  $D_y$  (скольжение),  $\Omega$  (закручивание),  $D_z$  (поднятие) [31]. В настоящей работе рассчитывали экранировку необменивающихся протонов хромофора дауномицина парами T·A и G·C в интеркалированном комплексе 1:2 при вариации конформационных параметров спирали. Вычислительная процедура нахождения конформационных параметров интеркалированного комплекса достаточно подробно описана в [14]. На рис. 5 представлена в различных проекциях рассчитанная наиболее вероятная структура комплекса 1:2 дауномицина с d(T1pG2pC3pA4), отвечающая интеркаляции хромофора антибиотика в d(T1-G2)-участок тетрамера. Пространственное изображение структуры получено с помощью программы «Mathematica 2.2» (Wolfram Res Inc.). Длины связей и валентные углы в структуре молекулы дауномицина взяты из данных рентгеноструктурного анализа [32]. Интеркалированный комплекс характеризуется следую-

щими параметрами спирали:  $D_z = 0,70$  нм,  $\Omega = 35^\circ$ ,  $\omega = -6,0^\circ$ ,  $\tau = 7,8^\circ$ ,  $D_x = 0,15$  нм,  $D_y = 0,08$  нм,  $\rho = 3,5^\circ$ ,  $\kappa = -2,0^\circ$ . Хромофор антибиотика располагается перпендикулярно оси спирали на равных расстояниях (0,35 нм) от плоскостей верхней и нижней пары оснований в d(T1-G2)-участке и повернут на угол  $\approx 106^\circ$  по отношению к нижней паре оснований, в результате чего обеспечивается относительно слабое экранирование необменивающихся протонов в кольцах А и D хромофора. Оценки с использованием суммарных констант спин-спинового взаимодействия для протонов H1', H2' и H2'' дезоксирибозы [33] позволяют заключить, что дезоксирибозные остатки исследованного тетрамера в комплексе с дауномицином преимущественно находятся в C2'-эндо-конформациях, соответствующих В-форме ДНК.

Результаты рентгеноструктурных исследований подобных комплексов в кристалле [4, 5] свидетельствуют о том, что конформации кольца А хромофора и аминсахара дауномицина при связывании с дезоксиолигонуклеотидами претерпевают существенные изменения по сравнению со свободной молекулой антибиотика, чтобы обеспечить энергетически и стерически наиболее выгодную укладку аминсахарного кольца в малой бороздке правой спирали ДНК. Этот вывод подтверждается исследованиями, проведенными в растворе [21], согласно которым взаимная ориентация плоскостей хромофора и аминсахарного остатка в молекуле дауномицина, связанной с ДНК, существенно отличается от наблюдаемой в кристалле для свободного антибиотика [32]. В расчетной наиболее вероятной структуре комплекса 1:2, представленной на рис. 5,

Таблица 2

Расчетные значения индуцированных химических сдвигов (параметров экранирования) протонов ( $\Delta\delta$ , м. д.) дауномицина в составе различных комплексов с дезокситетрануклеотидом 5'-d(TpGpCpA) в водном растворе ( $T = 303$  К,  $pD 7,1$ )

Протон	Комплекс				от.
	1 : 1	1 : 2	2 : 1	2 : 2	
	$\Delta\delta_1$	$\Delta\delta_2$	$\Delta\delta_3$	$\Delta\delta_4$	
H1	0,20	0,32	0,31	0,42	7,83
H2	0,50	0,56	0,56	0,10	7,78
H3	0,24	0,20	0,30	0,33	7,55
H1'	0,24	0,33	0,13	0,10	5,53
OCH <sub>3</sub>	0,26	0,12	0,19	0,08	4,02
H8e	0,25	0,07	0,17	0,21	2,26
H10e	0,45	0,58	0,49	0,33	3,06

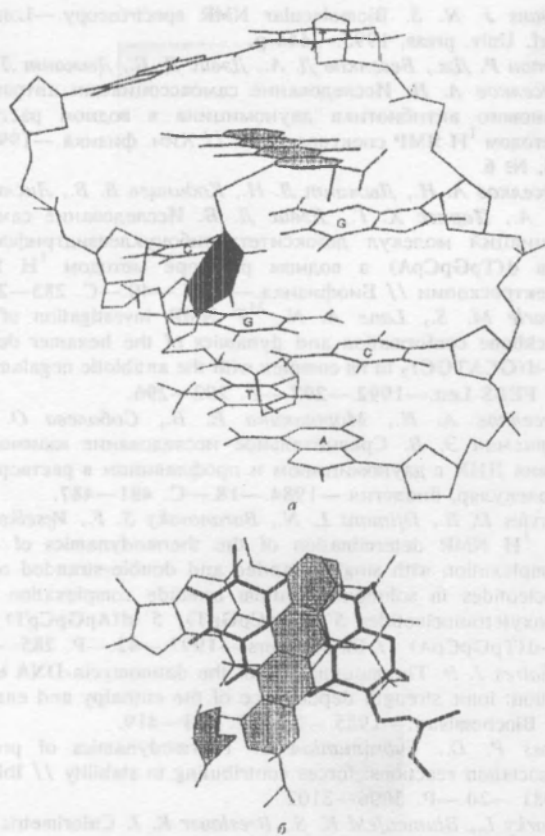


Рис. 5. Расчетная пространственная структура 1:2-комплекса дауномицина с 5'-d(TGCA); а — вид на комплекс сбоку (хромофор и аминоксахарное кольцо антибиотика заштрихованы); б — вид на d(TG)-участок со встроенным антибиотиком сверху, показывающий взаимное расположение азотистых оснований и хромофора дауномицина в 1:2-комплексе

аминосакхарный остаток располагается в малой бороздке двойной спирали и фактически блокирует третью пару оснований, что, по-видимому, является основной причиной низкой вероятности связывания второй молекулы антибиотика с коротким дезокситетрануклеотидным дуэплексом. Важно отметить, что раскручивание спирали в месте интеркаляции практически отсутствует и составляет лишь  $1^\circ$  ( $\Omega = 35^\circ$ ). Полученный результат хорошо согласуется с рентгеноструктурными данными [4, 5]. Вместе с тем в работе [5] обнаружено раскручивание соседних с участком интеркаляции пар оснований на  $8^\circ$ , то есть при комплексообразовании с интеркалятором, в состав которого входят структурно-сложные заместители, располагающиеся в бороздках ДНК, наблюдается конформационные эффекты более дальнего порядка, свидетельствующие

еще об определенной структурной гибкости двойной спирали ДНК. Наблюдаемый угол раскручивания  $11^\circ$  на одну молекулу дауномицина при комплексообразовании с суперспиральной ДНК в растворе, очевидно, отражает суммарный конформационный эффект интеркаляционного связывания антибиотика [34].

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

О. Н. Веселков, Р. Дж. Итон, С. Ф. Барановский, С. Г. Осетров, В. И. Пахомов, П. А. Болотин, Л. Н. Димант, Д. Б. Девис

Аналіз взаємодії антибиотика дауномицина з дезокситетрануклеотидом 5'-d(TpGpCpA) у водному розчині методом ЯМР-спектроскопії

Резюме

Методом одновимірної і двовимірної (2D-TOCSY і 2D-NQESY) гомоядерної ПМР-спектроскопії та гетероядерної 2D- $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$ -ЯМР-спектроскопії (500 МГц) досліджено комплексоутворення антибиотика дауномицина з дезокситетрануклеотидом 5'-d(TpGpCpA) у водно-сольовому розчині. За вимірними концентраційними і температурними залежностями протонних хімічних зсувів молекул розраховано рівноважні константи реакцій, відносний вміст різних типів комплексів у залежності від концентрацій і температури та термодинамічні параметри  $\Delta H$  і  $\Delta S$  комплексоутворення молекул. Аналіз отриманих результатів дозволяє зробити висновок стосовно того, що місцями переважної посадки дауномицина є триплетні нуклеотидні послідовності. Зв'язування другої молекули дауномицина як з одноланцюговою, так і з дуплексною формою тетрамера має виражений антикооперативний характер. Побудовано найвірогіднішу просторову структуру комплексу 1:2 антибиотика з дезокситетрануклеотидом за розрахунковими значеннями граничних значень хімічних зсувів протонів дауномицина у складі комплексу і даними 2D-NOE.

A. N. Veselkov, R. J. Eaton, S. F. Baranovsky, S. G. Osetrov, V. I. Pahomov, P. A. Bolotin, L. N. Djimant, D. B. Davies

NMR analysis of the interaction of antibiotic daunomycin with deoxytetranucleotide, 5'-d(TpGpCpA), in aqueous solution

Summary

One-dimensional and two-dimensional (2D-TOCSY and 2D-NQESY) homonuclear  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy and heteronuclear 2D- $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$ -NMR spectroscopy have been used to investigate the complexation of the antibiotic daunomycin with deoxytetranucleotide 5'-d(TpGpCpA) in aqueous salt solution. The equilibrium reaction constants, relative content of different types of complexes as a function of concentration and temperature of solution and thermodynamical parameters  $\Delta H$  and  $\Delta S$  of complexation of the molecules have been calculated using experimental concentrational and temperature dependences of the proton chemical shifts of the interacting molecules. Analysis of the results has shown that the most favourable binding sites for daunomycin are triplet nucleotide sequences. Binding of the second daunomycin molecule with both single-stranded and duplex forms of the tetranucleotide is highly anti-



cooperative. The most favourable structure of 1:2 antibiotic-deoxytetranucleotide complex has been constructed using the calculated limiting proton chemical shifts of daunomycin protons in the intercalated complex and 2D-NOE data.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Arcamone F. Doxorubicin: anticancer antibiotics.—New York: Acad. press, 1981.—325 p.
2. Arcamone F., Penco S. Antiracemides and Antiracemidione — based Anticancer Agents / Ed. J. W. Lown.—New York: Elsevier, 1988.—P. 1—43.
3. Pigram W. I., Fuller W., Hamilton L. D. Stereochemistry of intercalation. Interaction of daunomycin with DNA // Nature New Biol.—1972.—235.—P. 17—19.
4. Quigley G. J., Wang A. H.-J., Ughetto G., van der Marel G., van Boom J. H., Rich A. Molecular structure of anticancer drug-DNA complex: daunomycin plus d(CpGpTpApCpG) // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1980.—77.—P. 7204—7208.
5. Wang A. H.-J., Ughetto G., Quigley G. J., Rich A. Interaction between an anthracycline antibiotic and DNA: molecular structure of daunomycin complexed to d(CpGpTpApCpG) at 1.2 Å resolution // Biochemistry.—1987.—26.—P. 1152—1163.
6. Dalgleish D. G., Frey G., Kersten W. Circular dichroism studies of complexes of the antibiotics daunomycin, nogalamycin, chromomycin and mithramycin with DNA // Biopolymers.—1974.—13.—P. 1757—1766.
7. Neidle S., Sanderson M. R. Molecular Aspects of Anti-Cancer Drug Action / Eds S. Neidle, M. J. Waring.—Weinlan: Verlag Chemie, 1983.—P. 35—57.
8. Chaires J. B. Equilibrium studies on the interaction of daunomycin with deoxypolynucleotides // Biopolymers.—1983.—22.—P. 4204—4211.
9. Newlin D. D., Miller K. J., Pilch D. F. Interactions of molecules with nucleic acids. VII Intercalation and T·A specificity of daunomycin in DNA // Biopolymers.—1984.—23.—P. 139—158.
10. Chen K.-X., Gresh N., Pullman B. A theoretical exploration of conformational aspects of daunomycin intercalation into a DNA minihelix // J. Biomol. Struct. Dyn.—1985.—3.—P. 445—466.
11. Chaires J. B., Dattagupta N., Crothers D. M. Studies of interaction of anthracycline antibiotics and deoxyribonucleic acid: equilibrium binding studies on interaction of daunomycin with deoxyribonucleic acid // Biochemistry.—1982.—21.—P. 3933—3940.
12. Chaires J. B., Fox K. R., Herrera J. E., Britt M., Waring M. J. Site and sequence specificity of the daunomycin-DNA interaction // Biochemistry.—1987.—27.—P. 8227—8236.
13. Davies D. B., Djimant L. N., Veselkov A. N. <sup>1</sup>H NMR structural analysis of the interaction of proflavine with self-complementary deoxytetranucleotides of different base sequence // Nucleot. and Nucleos.—1994.—13.—P. 637—655.
14. Davies D. B., Karawajew L., Veselkov A. N. <sup>1</sup>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.
15. Huang Y. M., Phillips D. R. Thermodynamics of the interaction of daunomycin with DNA // Biophys. Chem.—1977.—6.—P. 363—368.
16. Веселков А. Н., Дымант Л. Н., Болотин П. А., Барановский С. Ф., Веселков Д. А., Шипп Д., Дэвис Д. Исследование взаимодействия бромистого этидия с самокомплементарным дезокситетрануклеотидом 5'-d(ApCpGpT) в водном растворе методом <sup>1</sup>H-ЯМР спектроскопии // Биополимеры и клетка.—1995.—11, № 3.—С. 42—54.
17. Evans J. N. S. Biomolecular NMR spectroscopy.—London: Oxf. Univ. press, 1995.—444 p.
18. Итон Р. Дж., Веселков Д. А., Дэвис Д. Б., Дымант Л. Н., Веселков А. Н. Исследование самоассоциации антрациклинового антибиотика дауномицина в водном растворе методом <sup>1</sup>H ЯМР спектроскопии // Хим. физика.—1999.—18, № 6.
19. Веселков А. Н., Дымант Л. Н., Козинцев В. В., Лисютин В. А., Паркес Х. Г., Дэвис Д. Б. Исследование самоассоциаций молекул дезокситетрарибонуклеозидтрифосфатов d(TpGpCpA) в водном растворе методом <sup>1</sup>H ЯМР спектроскопии // Биофизика.—1995.—40.—С. 283—292.
20. Searle M. S., Lane A. N. <sup>31</sup>P NMR investigation of the backbone conformation and dynamics of the hexamer duplex 5'-d(GCATGC)<sub>2</sub> in its complex with the antibiotic nogalamycin // FEBS Lett.—1992.—297.—P. 292—296.
21. Веселков А. Н., Морошкина Е. Б., Соболева О. И., Фрисман Э. В. Сравнительное исследование взаимодействия ДНК с дауномицином и профлавином в растворе // Молекуляр. биология.—1984.—18.—С. 481—487.
22. Davies D. B., Djimant L. N., Baranovsky S. F., Veselkov A. N. <sup>1</sup>H NMR determination of the thermodynamics of drug complexation with single-stranded and double-stranded oligonucleotides in solution: ethidium bromide complexation with deoxytetranucleotides 5'-d(ApCpGpT), 5'-d(ApGpCpT) and 5'-d(TpGpCpA) // Biopolymers.—1997.—42.—P. 285—295.
23. Chaires J. B. Thermodynamics of the daunomycin-DNA interaction: ionic strength dependence of the enthalpy and entropy // Biochemistry.—1985.—24.—P. 403—419.
24. Ross P. D., Subramanian S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability // Ibid.—1981.—20.—P. 3096—3102.
25. Marky L., Blumenfeld K. S., Breslauer K. J. Calorimetric and spectroscopic investigation of drug-DNA interaction. I. Binding of netropsin to poly d(AT) // Nucl. Acids Res.—1983.—11.—P. 2857—2870.
26. Sturtevant J. M. Heat capacity and entropy changes in processes involving proteins // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1977.—74.—P. 2236—2240.
27. Kennard O., Hunter W. N. Oligonucleotide structure a decade of single crystal X-ray diffraction studies // Quart. Rev. Biophys.—1989.—22.—P. 327—379.
28. Remeta D. P., Mudd C. P., Berger R. L., Breslauer K. J. Thermodynamic characterization of daunomycin-DNA interactions: microcalorimetric measurements of daunomycin-DNA binding enthalpies // Biochemistry.—1991.—B30.—P. 9799—9809.
29. Giessner-Pretre C., Pullman B. Quantum mechanical calculations of NMR chemical shifts in nucleic acids // Quart. Rev. Biophys.—1987.—20.—P. 113—172.
30. Poltev V. I., Teptukhin A. V. Conformational implication of some nucleotide sequences // Int. J. Quant. Chem.—1989.—35.—P. 91—102.
31. Dickerson R. E. Definition and nomenclature of nucleic acid structure parameters // J. Biomol. Struct. Dyn.—1989.—6.—P. 627—634.
32. Neidle S., Taylor G. Nucleic acid binding drugs. Pt IV. The crystal structure of the anti-cancer agent daunomycin // Biochim. et biophys. acta.—1977.—478.—P. 450—459.
33. Searle M. S. NMR studies of drug-DNA interactions // Progr. NMR Spectr.—1993.—25.—P. 403—480.
34. Blackburn G. M., Gait J. M. Nucleic Acids in Chemistry and Biology.—Oxford; New York; Tokyo: Oxford Univ. press, 1990.—336 p.

Поступила в редакцию 24.02.98

УДК 577.113