

# Термодинамика взаимодействия ароматического лиганда с одноцепочечной ДНК: анализ комплексообразования бромистого этидия с некоплементарными изомерными дезокситетрануклеотидами 5'-d(CGAA) и 5'-d(AAGC) по данным <sup>1</sup>H-ЯМР

А. Н. Веселков, С. Ф. Барановский, Л. Н. Дымант, Н. В. Петренко,  
Д. А. Веселков, А. Такер<sup>1</sup>, Д. Дэвис<sup>1</sup>

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

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

*На импульсном ЯМР-спектрометре (500 МГц) исследованы температурные зависимости химических сдвигов протонов молекул в водных растворах фенантридинового красителя бромистого этидия с некоплементарными изомерными дезокситетрануклеотидами 5'-d(CGAA) и 5'-d(AAGC), имеющими инверсное чередование оснований в нуклеотидной цепи. Разработаны методики расчета, позволяющие дифференцированно определить термодинамические параметры реакций образования различного типа комплексов в растворе. Получены значения свободной энергии Гиббса, энтальпии и энтропии реакций образования комплексов 1:1, 2:1 и 1:2 бромистого этидия с тетрануклеотидами. Проведен сравнительный анализ термодинамических характеристик взаимодействия красителя с изомерными последовательностями, сделаны выводы о проявлении специфичности при связывании бромистого этидия с одноцепочечными дезокситетрануклеотидами.*

**Введение.** Проведенный нами ранее анализ комплексообразования ароматического красителя бромистого этидия с самокомплементарными [1, 2] и некоплементарными [3, 4] дезокситетрануклеотидами различной последовательности оснований в цепи свидетельствует об избирательном связывании и достаточно высоких значениях равновесных констант образования комплексов красителя с однонитчатыми тетрануклеотидами в растворе. В работе [5] показано, что гомодимер этидия, способный к бис-интеркаляции, имеет примерно одинако-

вое сродство к связыванию как с однонитчатой, так и двуспиральной ДНК. Можно предположить, что избирательность комплексообразования лигандов с определенными однонитчатыми последовательностями играет важную роль в функционировании биологически активных веществ, в частности, в процессах транскрипции и репликации ДНК. При изучении связывании лигандов с нуклеиновыми кислотами термодинамические исследования важны для определения характера межмолекулярных взаимодействий, ответственных за селективное взаимодействие молекул. Анализ температурных зависимостей параметров ЯМР дает возможность детализировать многокомпонентные реакции в рас-

© А. Н. ВЕСЕЛКОВ, С. Ф. БАРАНОВСКИЙ,  
Л. Н. ДЫМАНТ, Н. В. ПЕТРЕНКО,  
Д. А. ВЕСЕЛКОВ, А. ТАКЕР, Д. ДЭВИС, 1997

творе и определять вклады различных реакций комплексообразования в суммарный тепловой и энтропийный эффекты взаимодействия молекул [6].

В настоящей работе для определения термодинамических характеристик реакций комплексообразования изучены температурные зависимости химических сдвигов протонов молекул в растворе фенантридинового красителя бромистого этидия и некомплементарных изомерных дезокситетрануклеотидов 5'-d(CpGpApA) и 5'-d(ApApGpC), имеющих взаимопротивоположные последовательности оснований в цепи. Ранее [3, 4] методом одно- и двухмерной ЯМР-спектроскопии нами исследовано комплексообразование бромистого этидия с данными тетрануклеотидами при фиксированной температуре, определены возможные типы комплексов и их структуры, выявлены особенности динамического равновесия молекул в растворе.

**Материалы и методы.** Образцы бромистого этидия («Sigma», США, рис. 1) и некомплементарных дезокситетрануклеотидов 5'-d(CpGpApA) и 5'-d(ApApGpC), синтезированных «OSWEL DNA SERVICE» (Великобритания), лиофилизировали из D<sub>2</sub>O с изотопной чистотой 99,95 % и растворяли в дейтерированном 0,1 М фосфатном буфере (pD = 7,15). Методика приготовления образцов и проведения эксперимента описана в [6]. Спектры <sup>1</sup>H-ЯМР измерены на импульсном спектрометре «JEOL GSX 500» с резонансной частотой 500 МГц в диапазоне температур от 278 до 353 К. Измерения проводили в стандартных ампулах с внешним диаметром 5 мм, минимальный объем раствора 0,5 мл. Химические сдвиги протонов определяли относительно ДСС (2,2-диметил-2-силилпентан-5-сульфокислота), в качестве внутреннего стандарта использовали ТМА (бромид тетраметиламмония).

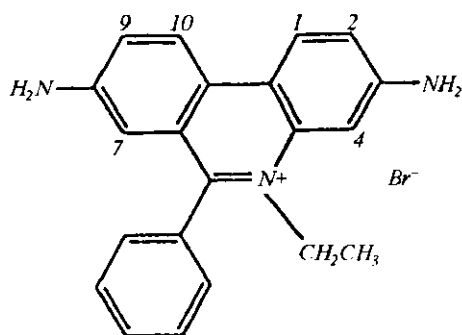


Рис. 1. Структурная формула катиона этидия (3,8-диамино-6-фенил-5-этил-фенантридин) с указанием необменивающихся протонов красителя

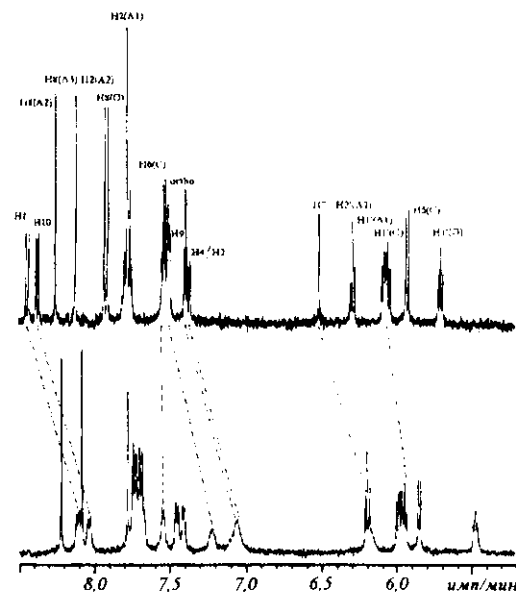


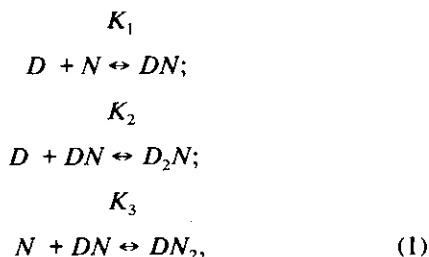
Рис. 2. Спектры <sup>1</sup>H-ЯМР (500 МГц) водного раствора бромистого этидия и тетрануклеотида 5'-d(CGAA) ( $D_0 = 1,5 \cdot 10^{-3}$  М;  $N_0 = 1,66 \cdot 10^{-3}$  М) при различных температурах: 1 — 25; 2 — 60 °С

Температуру в процессе измерений стабилизировали терморегулятором «JEOL NM-GVT3» с точностью  $\pm 0,2$  °С.

**Результаты и обсуждение.** Отнесения сигналов всех необменивающихся протонов в ПМР-спектрах смешанных растворов бромистого этидия и исследованных дезокситетрануклеотидов выполнены ранее [3, 4] на основе двухмерных гомоядерных TOCSY- и NOESY-экспериментов. На рис. 2 представлены спектры <sup>1</sup>H-ЯМР раствора некомплементарного дезокситетрануклеотида 5'-d(CGAA) и бромистого этидия при двух различных температурах. Приведена часть спектра в области слабого поля, включающая в себя резонансы ароматических протонов нуклеотидов, H1' дезоксирибозных колец и протонов бромистого этидия. На рис. 2 пунктирными линиями соединены резонансы различных протонов взаимодействующих молекул, по наклону которых видно, что наибольшие смещения при повышении температуры испытывают сигналы ароматических протонов красителя.

В результате исследований концентрационных зависимостей протонных химических сдвигов молекул и 2M-NOE-спектров было показано [3, 4], что в растворе имеет место равновесие различного вида комплексов красителя с тетрануклеотидом, а также мономерных и ассоциированных форм взаимодействующих молекул. При этом в растворе бромисто-

го этидия с некомплементарными дезокситетрануклеотидами 5'-d(CpGpApA) и 5'-d(ApApGpC) при достаточно малых исходных концентрациях образцов ( $\approx 0,5 \cdot 10^{-3}$  моль/л) наиболее вероятными являются процессы димеризации молекул и образования комплексов 1:1, 2:1, 1:2 молекул красителя и тетрамера:



где  $D$  — молекула бромистого этидия;  $N$  и  $N_2$  — одно- (мономерная) и двунитчатая (димерная) формы тетрануклеотидов.

Термодинамические параметры реакций образования каждого типа комплекса можно рассчитать по экспериментальным температурным зависимостям химических сдвигов взаимодействующих молекул с учетом аддитивного вклада в наблюдаемый химический сдвиг всех ассоциированных форм в растворе [6]. Наиболее целесообразно проводить подобный расчет по данным для протонов бромистого этидия, резонансы которых испытывают наибольшие смещения при изменении температуры (см. рис. 2). В качестве примера на рис. 3 приведены экспериментальные температурные кривые для

необменивающихся протонов красителя в растворе с некомплементарным тетрануклеотидом d(ApApGpC). Наблюдаемый химический сдвиг  $i$ -го протона бромистого этидия при температуре  $T$  можно представить в виде [6]:

$$\delta_i(T) = f_m(T)\delta_{mi} + f_d(T)\delta_{di} + \sum_{k=1}^3 f_k(T)\delta_{ki}, \quad (2)$$

где  $\delta_{mi}$ ,  $\delta_{di}$ ,  $\delta_{1i}$ — $\delta_{3i}$  и  $f_m(T)$ ,  $f_d(T)$ ,  $f_1(T)$ — $f_3(T)$  — значения химических сдвигов  $i$ -го протона бромистого этидия и равновесные мольные доли бромистого этидия при температуре  $T$  для его моно- и димерной форм, а также для указанных выше комплексов с тетрануклеотидом соответственно. В соотношении (2) предполагается, что величины  $\delta_{mi}$ ,  $\delta_{di}$ ,  $\delta_{1i}$ — $\delta_{3i}$  не зависят от температуры в исследованном температурном интервале. Допустимость такого приближения показана при исследовании взаимодействия ароматических красителей профлавина и бромистого этидия с самокомплементарными дезокситетрануклеотидами [6, 7]. Отметим лишь, что качественно сходный характер экспериментальных зависимостей  $\delta(T)$  для всех необменивающихся протонов хромофора бромистого этидия (см. рис. 3) позволяет допустить, что экспериментально наблюдаемые изменения химических сдвигов при повышении температуры вызваны в основном смещением молекулярного равновесия в растворе. В используемой модели (2) влияние температуры на значения  $\delta$  учитывается тем, что мольные доли  $f_m$ ,  $f_d$  и  $f_1$ — $f_3$ , однозначно связанные с равновесными константами образования комплексов  $K_1$ — $K_3$ , 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 [6, 7], рассчитывали двумя способами. Первый предусматривает использование параметрических регрессионных уравнений для описания зависимости мольных долей  $f_d$ ,  $f_1$ — $f_3$  от температуры. Подробное описание методики составления регрессионных уравнений для соответствующих типов комплексов дано в работе [6]. Отметим лишь, что для комплексов 1:1 и 2:1 бромистого этидия с одноцепочечным тетрануклеотидом, а также для описания процесса димеризации молекул красителя использованы регрессионные уравнения в виде многочленов второго и третьего порядков относительно температуры.

В случае же комплексов 1:2 были использованы соотношения, учитывающие кооперативный ха-

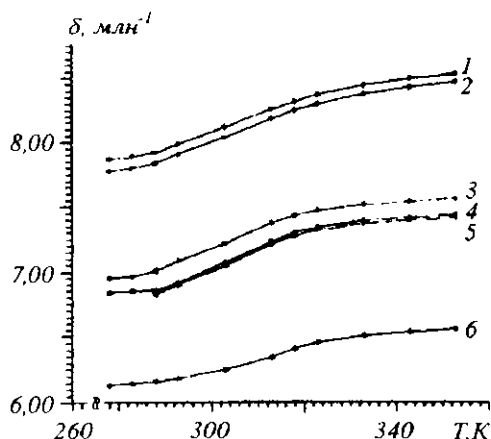


Рис. 3. Экспериментальные зависимости от температуры химических сдвигов протонов бромистого этидия в растворе красителя с тетрануклеотидом 5'-d(CGAA): ( $D_0 = 1,15 \cdot 10^{-3}$  М;  $N_0 = 1,56 \cdot 10^{-3}$  М): 1 — N1; 2 — N10; 3 — N9; 4 — N4; 5 — N2; 6 — N7

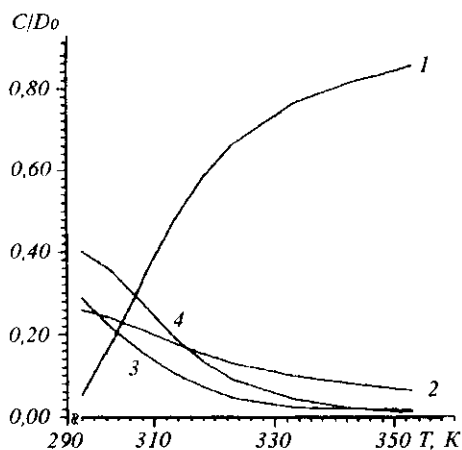


Рис. 4. Расчетные зависимости мольных долей бромистого этидия и комплексов красителя с тетра-нуклеотидом 5'-d(CGAA) от температуры: 1 — мономер бромистого этидия; 2 — комплекс 1:1; 3 — комплекс 2:1; 4 — комплекс 1:2

ракетр происходящих с ними температурных превращений [6, 7]. Вычислительная процедура нахождения параметров регрессионных уравнений, основанная на минимизации квадратичного функционала невязки с использованием экспериментальных температурных зависимостей химических сдвигов различных протонов красителя, также достаточно подробно описана в [6]. На рис. 4 в качестве примера приведены расчетные зависимости мольных долей различных типов комплексов бромистого этидия с d(CGAA), а также мономеров красителя от температуры. Видно, что при низких температурах краситель в основном находится в связанном состоянии. Однако в отличие от комплексообразования бромистого этидия с самокомплементарными дезокситетрануклеотидами, когда содержание комплекса 1:2 красителя с дуплексом является преобладающим в растворе [7], при связывании лиганда с некомплементарными дезокситетрануклеотидами доля комплексов 1:1 и 2:1 красителя с одиночной нитью является существенной, соизмеримой с таковой 1:2-комплекса. С повышением температуры содержание комплексов 1:1 и 2:1 монотонно уменьшается во всем исследованном диапазоне температур. Температурная зависимость комплекса 1:2 бромистого этидия с димером тетра-нуклеотида (см. рис. 4) имеет характерный «S»-образный вид кривых плавления для двухспиральных олигонуклеотидов [8]. Однако в отличие от кривых плавления 1:2-комплексов красителя с дуплексом,

образованным самокомплементарными дезокситетрануклеотидами [7], температурная зависимость для 1:2-комплекса красителя с димером некомплементарного тетрамера носит менее выраженный характер кооперативного процесса. По-видимому, это связано с тем, что несамокомплементарные тетрануклеотиды d(CGAA) и d(AAGC) не образуют «идеального» дуплекса в растворе, и в димере может иметь место лишь частичное спаривание оснований при скольжении нитей тетрамера относительно друг друга [3, 4]. Следует подчеркнуть, что экспериментально наблюдаемые кривые плавления для многокомпонентных систем имеют усредненный характер и без соответствующего количественного анализа, позволяющего дифференцированно оценить вклад каждого типа комплекса, нельзя сделать определенных выводов о температурной стабильности того или иного ассоциата в растворе [6, 7].

Равновесные константы комплексообразования  $K_1$ — $K_3$  при различных температурах рассчитаны из найденных значений мольных долей с использованием закона сохранения массы и законов действия масс для рассматриваемых реакций (1). Для оценки энтальпии и энтропии реакций образования комплексов бромистого этидия с некомплементарными тетрануклеотидами в растворе использовали формализм Вант-Гоффа.

На рис. 5 как пример приведены зависимости Вант-Гоффа  $\ln K = f(1/T)$  для раствора бромистого этидия с d(AAGC), по которым можно определить термодинамические параметры комплексообразования молекул. Каждая точка на графике получена в результате усреднения параметров  $K_i$ , рассчитан-

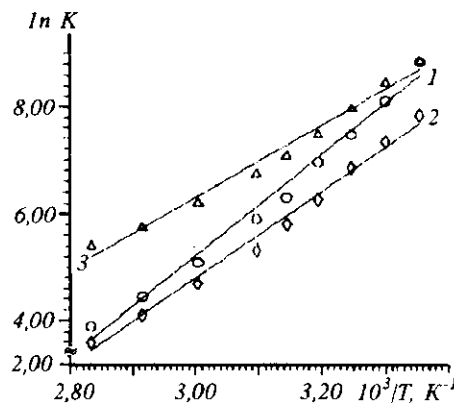


Рис. 5. Зависимость  $\ln K$  от  $1/T$  для реакций образования комплексов бромистого этидия с тетра-нуклеотидом 5'-d(AAGC): 1 — комплекс 1:1; 2 — комплекс 2:1; 3 — комплекс 1:2

Термодинамические параметры ( $\Delta G$ , кДж/моль;  $\Delta H$ , кДж/моль;  $\Delta S$ , Дж/моль·К) комплексообразования бромистого этидия с некомплементарными дезокситетрануклеотидами 5'-d(CpGpApA) и 5'-d(ApApGpC),  $pD = 7,15$

Тетрануклеотид	Тип комплекса	Способ расчета				
		I			II	
		$-\Delta G$ (298 К)	$-\Delta H$	$-\Delta S$ (298 К)	$-\Delta H^0$	$-\Delta S^0$
5'-d(CGAA)	1:1	24,3±0,4	85,6±3,5	206,6±12,9	87,5±6,3	211,3±18,4
	2:1	22,7±0,8	63,1±5,6	135,7±19,7	66,0±5,9	144,0±13,7
	1:2	21,5±0,9	68,7±9,4	158,3±33,4	65,9±5,2	148,1±17,3
5'-d(AAGC)	1:1	23,8±0,7	80,2±3,3	189,4±9,9	84,9±4,8	203,7±17,3
	2:1	21,7±0,3	60,0±16,6	128,6±56,1	57,0±6,3	117,7±24,5
	1:2	21,2±0,7	62,6±19,6	139,0±66,2	56,2±7,4	116,4±28,3

ных для шести различных ароматических протонов красителя; аппроксимирующие прямые проведены по методу наименьших квадратов. Энтропию рассчитывали из энергии Гиббса  $\Delta G = -RT \ln K$  и энтальпии:

$$\Delta S = -(\Delta G - \Delta H)/T. \quad (3)$$

Полученные значения энергии Гиббса, энтальпии и энтропии реакций комплексообразования бромистого этидия с некомплементарными дезокситетрануклеотидами 5'-d(AAGC) и 5'-d(CGAA) для 298 К приведены в таблице.

При вычислении термодинамических параметров вторым способом использовали соотношение, полученное в [3, 4] для наблюдаемого химического сдвига протонов красителя в растворе с некомплементарным тетрануклеотидом:

$$\delta = D/D_0(\delta_m + 2K_d D \delta_d + K_1 N \delta_1 + 2K_1 K_3 N D \delta_2 + K_1 K_2 N^2 \delta_3), \quad (4)$$

где  $K_d$  — константа димеризации красителя;  $D$  и  $N$  — концентрация мономеров красителя и тетрануклеотида соответственно;  $D_0$  — исходная молярная концентрация красителя. Константы реакций комплексообразований  $K_1 - K_3$ , а также реакций димеризации красителя  $K_d$ , входящие в (4), определены через соответствующие термодинамические параметры  $\Delta H$  и  $\Delta S$ :

$$K_A(T) = \exp[(\Delta S^0/R) - (\Delta H^0/RT)] \quad (5)$$

в предположении, что величины  $\Delta S^0$  и  $\Delta H^0$  не

зависят существенным образом от температуры в исследованном диапазоне температур. Термодинамические параметры димеризации бромистого этидия  $\Delta S^0$  и  $\Delta H^0$  найдены ранее [9] при исследовании температурных зависимостей химических сдвигов протонов молекул в тех же экспериментальных условиях. Таким образом, если учесть известные значения  $\delta_m, \delta_d, \delta_1 - \delta_3$  [3, 4, 9], то наблюдаемый химический сдвиг в соотношении (5) является функцией шести параметров  $\Delta H^0_j, \Delta S^0_j$  ( $j = 1 \div 3$ ). Минимизация функции невязки экспериментальных и расчетных значений позволяет определить оптимальные значения термодинамических параметров реакций образования комплексов в растворе. Методика расчета термодинамических параметров и определения доверительного интервала значений  $\Delta S^0$  и  $\Delta H^0$  для каждого типа комплекса приведена в [7]. Найденные в результате расчетов вторым способом параметры  $\Delta H^0_j, \Delta S^0_j$  (см. таблицу) в пределах погрешности их определения хорошо согласуются со значениями термодинамических параметров, определенных первым способом, описанным выше.

Из таблицы видно, что все рассматриваемые реакции комплексообразования бромистого этидия с некомплементарными дезокситетрануклеотидами 5'-d(CGAA) и 5'-d(AAGC) являются экзотермическими. Это характерно для процессов агрегации, включающих в себя стэкинг-взаимодействия систем с делокализованными  $\pi$ -электронами [10, 11]. Термодинамические параметры связывания бромистого этидия с одноцепочечными последовательно-

стями некомплементарных дезокситетрануклеотидов  $d(CGAA)$  и  $d(AAGC)$  (комплексы 1:1 и 2:1) принимают довольно большие отрицательные значения, находящиеся в хорошем согласии с величинами  $\Delta H$  и  $\Delta S$  для реакции образования комплексов красителя с мономерами самокомплементарных дезокситетрануклеотидов  $d(ACGT)$  и  $d(AGCT)$  [1, 2]. Вместе с тем значения энтальпии связывания бромистого этидия с одноцепочечными тетра-нуклеотидами  $d(ACGT)$  и  $d(AGCT)$  несколько меньше по абсолютной величине, чем  $\Delta H$  для реакций комплексообразования акридинового красителя профлавина с аналогичными дезокситетрануклеотидами [6]. Наблюдаемые отличия могут быть связаны с существенно разным характером «частично интеркаляционного» связывания акридинового и фенантридинового хромофора с одноцепочечными олигонуклеотидными последовательностями. Согласно модели Притчарда и др. [12], акридиновый краситель встраивается между двумя соседними основаниями одной нити денатурированной ДНК, и образующийся комплекс стабилизируется электростатическими взаимодействиями между положительно заряженным атомом азота центрального ароматического кольца хромофора и отрицательным фосфатом нуклеотидной цепи. Анализ результатов ЯМР по комплексообразованию бромистого этидия с одноцепочечными некомплементарными дезокситетрануклеотидами показал [3, 4], что в 1:1-комплексе хромофор красителя ориентирован по отношению к нуклеотидной цепи со стороны боковых ароматических колец, содержащих протоны Н7 и Н9 либо Н2 и Н4. Такая ориентация удовлетворяет стерическим условиям, так как фенольное кольцо, присоединенное к центральному ароматическому кольцу красителя, располагается вне плоскости хромофора и создает определенные стерические препятствия для встраивания красителя по модели Притчарда и др. [12]. Следовательно, можно заключить, что взаимное перекрытие плоскостей хромофора красителя и соседних оснований в 1:1-комплексе бромистого этидия с одноцепочечным тетра-нуклеотидом существенно меньше, чем в случае профлавина. Соответственно это приводит в подобных комплексах с бромистым этидием к менее интенсивным взаимодействиям Ван-дер-Ваальса, которые вносят отрицательный вклад в энтальпию и энтропию комплексообразования молекул [13]. Следует также отметить, что, согласно модели Притчарда и др. [12], электростатические взаимодействия в 1:1-комплексе профлавина с одноцепочечным олигонуклеотидом играют более существенную роль, чем в таком же комплексе бромистого этидия. Это дает

дополнительный вклад в отрицательные значения термодинамических параметров комплексообразования акридинового красителя. Необходимо также учитывать, что в настоящих исследованиях при сравнительно большой ионной силе раствора (0,1 М  $Na^+$ ) значение электростатических взаимодействий при комплексообразовании бромистого этидия снижается относительно других стабилизирующих факторов. Сравнение значений термодинамических параметров для реакций образования 1:1-комплексов бромистого этидия с исследованными изомерными одноцепочечными последовательностями показывает, что они в пределах погрешности их определения совпадают друг с другом. Следовательно, полученные результаты для одноцепочечных некомплементарных дезокситетрануклеотидов, в которых сайты преимущественной посадки красителя (пиримидин-пуриновый  $d(CG)$ -сайт в  $d(CGAA)$  и пурин-пиримидиновый  $d(GC)$ -сайт в  $d(AAGC)$ ) располагаются на 5'- и 3'-концах последовательностей соответственно, не позволяют с достаточной определенностью выявить специфику связывания ароматического лиганда. По-видимому, это связано с большой конформационной свободой одноцепочечных последовательностей, особенно для терминальных нуклеотидов. Отметим, что при связывании бромистого этидия с мономерами 5'- $d(ACGT)$  и 5'- $d(AGCT)$ , где  $d(CG)$ - и  $d(GC)$ -сайты находятся в центре последовательностей, наблюдаются заметные различия в значениях  $\Delta H$  и  $\Delta S$  комплексообразования красителя с указанными тетра-нуклеотидами [1, 2]. При этом расчеты показывают, что бромистый этидий преимущественно связывается с пиримидин-пуриновым  $d(CG)$ -сайтом мономера тетра-нуклеотида. Можно предположить, что в сайте, находящемся в центре одноцепочечной последовательности, имеет место более интенсивный внутримолекулярный стэкинг азотистых оснований и соответственно более выраженное сиквенс-специфическое связывание красителя.

Встраивание второй молекулы бромистого этидия при формировании 2:1-комплекса отвечает менее благоприятной свободной энергии связывания в сравнении с  $\Delta G$  при посадке первой молекулы красителя. Следовательно, связывание второй молекулы бромистого этидия с исследованными одноцепочечными дезокситетрануклеотидами является антикооперативным. Таким образом, анализ показывает, что наблюдаемые термодинамические параметры реакций взаимодействия бромистого этидия с одноцепочечными олигонуклеотидами в основном определяются взаимодействиями Ван-дер-Ваальса и электростатическими. Определенную роль может играть увеличение длины мо-

лекулы олигонуклеотида при встраивании красителя и нарушение стэкинг-взаимодействия оснований в одноцепочечной молекуле, а также изменение гидратации, высвобождение ионов при взаимодействии молекул [14, 15]. Детальное определение относительного вклада каждого из названных выше факторов требует дополнительных исследований.

Что же касается термодинамики образования 1:2-комплекса бромистого этидия с димерами некомплементарных дезокситетрануклеотидов, то сравнение рассчитанных значений  $\Delta H$  для бромистого этидия +  $d(CGAA)_2$  с энтальпией образования 1:2-комплекса красителя с дуплексом самокомплементарного красителя  $d(ACGT)$  [12] показывает, что в пределах погрешности они совпадают друг с другом. Полученный результат свидетельствует о том, что энтальпия интеркаляционного встраивания красителя в  $d(CG)$ -сайт в основном определяется основаниями в месте интеркаляции (силы близкого действия), влияние же нуклеотидов, фланкирующих данный сайт, достаточно мало. Различие в свободной энергии Гиббса ( $\Delta G$ ) для реакций связывания бромистого этидия с димером самокомплементарного ( $d(ACGT)$ ) [2] и некомплементарного ( $d(CGAA)$ ) дезокситетрануклеотидов в основном определяется, как показали расчеты, энтропийным фактором. По-видимому, в димере некомплементарного дезокситетрануклеотида  $d(CGAA)$  наличие свободных концов, содержащих основания АА, вызывает дополнительную структуризацию воды, приводящую к снижению энтропии.

Авторы благодарны Королевскому обществу Великобритании за частичное финансирование (А. Н. В.) экспериментальных исследований; Объединенному исследовательскому центру Лондонского университета — за возможность использовать для измерений ЯМР-спектрометры 500 и 600 МГц в Беркбек колледже и Куин Мери колледже; Центральному исследовательскому Фонду Лондонского университета — за финансирование (Д. Д.) приобретения образцов олигонуклеотидов.

Проведенные исследования частично финансированы Грантом N UD 7200 Международного научного фонда.

О. Н. Веселков, С. Ф. Барановский, Л. Н. Димант,  
Н. В. Петренко, Д. О. Веселков, А. Такер, Д. Девис

Термодинаміка взаємодії ароматичного ліганду з одноланцюговою ДНК: аналіз комплексоутворення бромистого етидію з некомплементарними ізомерними дезокситетрануклеотидами 5'-d(CGAA) та 5'-d(AAGC) за даними  $^1\text{H}$ -ЯМР

Резюме

На імпульсному ЯМР-спектрометрі (500 МГц) досліджено температурні залежності хімічних зсувів протонів молекул у

водних розчинах феноантридинового барвника бромистого етидію з некомплементарними ізомерними дезокситетрануклеотидами 5'-d(CGAA) та 5'-d(AAGC), які мають інверсне чергування основ у нуклеотидному ланцюгу. Розроблено методику розрахунку, що дозволяють диференційовано визначити термодинамічні параметри реакції утворення різного типу комплексів у розчині. Отримано значення вільної енергії Гіббса, ентальпії реакції утворення комплексів 1:1, 2:1 і 1:2 бромистого етидію з тетрануклеотидами. Здійснено порівняльний аналіз термодинамічних характеристик взаємодії барвника з ізомерними послідовностями, зроблено висновки стосовно прояву специфічності при зв'язуванні бромистого етидію з одноланцюговими дезокситетрануклеотидами.

A. N. Veselkov, S. F. Baranovsky, L. N. Djimant, N. V. Petrenko,  
D. A. Veselkov, A. Tucker, D. B. Davies

Thermodynamics of interaction of aromatic ligand with single-stranded DNA:  $^1\text{H}$  NMR analysis of complex formation between ethidium bromide and non-complementary isomeric deoxytetranucleotides 5'-d(CGAA) and 5'-d(AAGC)

Summary

The temperature dependences of the proton chemical shifts of the phenanthridine dye ethidium bromide in the mixture with the non-complementary isomeric deoxytetranucleotides 5'-d(CGAA) and 5'-d(AAGC) have been studied in aqueous solutions by 500 MHz spectroscopy. The methods of calculation giving an opportunity to determine differentially the thermodynamic parameters of the formation of various types of the complexes in solution have been used. The free Gibbs energies, enthalpies and entropies of the reactions of 1:1, 2:1 and 1:2 complexes formation between ethidium bromide and tetranucleotides have been determined. Comparative analysis of the calculated thermodynamic parameters of the dye binding with the isomeric sequences has been made. It is concluded that there is sequence-selective interaction of ethidium bromide with single-stranded deoxytetranucleotides in solution.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Веселков А. Н., Болотин П. А., Дымант Л. Н. и др. Исследование комплексообразования бромистого этидия с самокомплементарным дезокситетрануклеотидом 5'-d(ApGpCpT) в водном растворе методом одномерной и двумерной  $^1\text{H}$  ЯМР спектроскопии // Биофизика.—1995.—40, № 6.—С. 1189—1201.
2. Веселков А. Н., Дымант Л. Н., Болотин П. А. и др. Исследование взаимодействия бромистого этидия с самокомплементарным дезокситетрануклеотидом 5'-d(ApCpGpT) в водном растворе методом  $^1\text{H}$ -ЯМР спектроскопии // Биополимеры и клетка.—1995.—11, № 3—4.—С. 42—54.
3. Веселков А. Н., Барановский С. Ф., Дымант Л. Н. и др. Исследование комплексообразования бромистого этидия с одноцепочечным некомплементарным дезокситетрануклеотидом 5'-d(ApApGpC) // Молекуляр. биология.—1997.—31, № 2.—С. 275—285.
4. Веселков А. Н., Барановский С. Ф., Дымант Л. Н. и др. Исследование комплексообразования бромистого этидия с одноцепочечным некомплементарным дезокситетрануклеотидом 5'-d(CpGpApA) в водном растворе методом  $^1\text{H}$ -ЯМР спектроскопии // Биополимеры и клетка.—1996.—12, № 6.—С. 36—49.
5. Rye H. S., Glazer A. N. Interaction of dimeric intercalating dyes with single-stranded DNA // Nucl. Acids Res.—1995.—23, N 7.—P. 1215—1222.
6. Davies D. B., Djimant L. N., Veselkov A. N.  $^1\text{H}$  NMR

- thermodynamical analysis of the interactions of proflavine with self-complementary deoxytetranucleotides of different base sequence // *Nucleotides and Nucleosides*.—1994.—13.—P. 657—671.
7. Веселков А. Н., Дымант Л. Н., Болотин П. А. и др. Термодинамический анализ взаимодействия бромистого этидия с дезокситетрарибонуклеотидом 5'-d(GpCpGpC) по данным протонного магнитного резонанса // *Молекуляр. биология*.—1996.—30, № 1.—С. 177—187.
  8. Petersheim M., Turner D. N. Base-stacking and base-pairing contribution to helix stability: thermodynamics of double-helix formation with CCGG, CCGGp, CCGGAp, CCGGUp and ACCGGUp // *J. Amer. Chem. Soc.*—1983.—22.—P. 256—263.
  9. Davies D. B., Djimant L. N., Veselkov A. N.  $^1\text{H}$  NMR investigation of self-association of aromatic drug molecules in aqueous solution. Structural and thermodynamical analysis // *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*—1996.—92.—P. 383—390.
  10. Delbarre A., Roques B. P., Le Pecq J. B. et al. PMR studies of the self-association of DNA intercalating ellipticine derivatives in aqueous solution // *Biophys. Chem.*—1976.—4.—P. 275—279.
  11. Chaires J. B., Dattagupta N., Crothers D. M. Self-association of daunomycin // *Biochemistry*.—1982.—21.—P. 3927—3932.
  12. Pritchard N. J., Blake A., Peacocke A. R. Modified intercalation model for the interaction of amino acridines and DNA // *Nature (London)*.—1966.—212.—P. 1360—1361.
  13. Ross P. D., Subramanian S. Thermodynamics of protein association reaction: forces contributing to stability // *Biochemistry*.—1981.—20.—P. 3096—3102.
  14. Chaires J. B. Thermodynamics of the Daunomycin-DNA interaction: ionic strength dependence of the enthalpy and entropy // *Biopolymers*.—1985.—25.—P. 403—419.
  15. Rentzeperis D., Marky L. A., Dwyer T. J. et al. Interaction of minor groove ligands to an AAATT/AATTT site: Correlation of thermodynamic characterization and solution structure // *Biochemistry*.—1995.—34.—P. 2937—2945.

УДК 577.113

Поступила в редакцию 31.07.96