

Структурный и термодинамический анализ комплексообразования йодистого пропидия с дезокситетрануклеотидом 5'-d(TrGrCpA) в водном растворе методом ^1H -ЯМР спектроскопии

Д. А. Веселков¹, П. А. Болотин, В. А. Сигаев, Л. Н. Дымант,
Д. Б. Дэвис¹, А. Н. Веселков

Севастопольский государственный технический университет Министерства образования Украины
Севастополь, Студгородок

¹ Лондонский Университет, Беркбек колледж
Лондон WC1N 0PP, Великобритания

В работе исследовано взаимодействие красителя фенантридинового ряда йодистого пропидия с самокомплементарным дезокситетрарибонуклеозидтрифосфатом 5'-d(TrGrCpA) в водно-солевом растворе методом одномерной и двумерной ^1H -ЯМР спектроскопии (500 МГц). Измерены концентрационные и температурные зависимости протонных химических сдвигов взаимодействующих молекул. Рассмотрены различные модели образования комплексов молекул красителя с тетрануклеотидом, рассчитаны равновесные константы, свободные энергии ΔG , энтальпии ΔH и энтропии ΔS реакций образования комплексов состава 1:1, 2:1, 1:2 и 2:2. Выявлены особенности динамического равновесия комплексов различного типа в зависимости от соотношения концентраций красителя и тетрануклеотида и температуры. Сделано заключение о преимущественной интеркаляции пропидия в пиримидин-пуриновые d(T-G)- и d(C-A)-сайты тетрануклеотида. На основании рассчитанных значений индуцированных химических сдвигов для протонов красителя и данных 2D-NOESY определены наиболее вероятные пространственные структуры 1:2 и 2:2 комплексов пропидия с тетрануклеотидом. Проведен сравнительный анализ параметров комплексообразования фенантридиновых красителей йодистого пропидия и бромистого этидия, а также акридинового красителя профлавина с дезокситетрануклеотидом d(TGCA) в идентичных условиях растворителя.

Введение. Несмотря на то, что опубликовано большое число работ по изучению особенностей интеркаляционного связывания ароматических лигандов с нуклеиновыми кислотами [1, 2], все еще остается ряд нерешенных проблем, в частности, не выяснены молекулярный механизм встраивания интеркаляторов и природа сиквенс-специфичности комплексообразования лигандов с нуклеотидными последовательностями. Фенантридиновые красители — бромистый этидий (EB) и йодистый пропидий (PI), широко используемые в биохимических и физико-химических исследованиях нуклеиновых

кислот [1—3], являются типичными представителями ароматических соединений, связывающихся с ДНК путем интеркаляции. Многие интеркаляторы, включая фенантридиновые и акридиновые красители, демонстрируют явное сродство к связыванию с пиримидин-пуриновой (*pur-pur*) последовательностью оснований в коротких олигонуклеотидных дуплексах [4—8]. Вместе с тем, несмотря на общий характер взаимодействия фенантридиновых красителей EB и PI с нуклеиновыми кислотами, наблюдаются существенные различия в термодинамике комплексообразования монокациона EB и дикациона PI как с нативной ДНК [9], так и с полинуклеотидами [10].

В данной работе методом одномерной и

двухмерной ^1H -ЯМР спектроскопии (500 МГц) исследовано взаимодействие йодистого пропидия с самокомплементарным дезокситетрарибонуклеозидтрифосфатом 5'-d(TrGpCpA) в водно-солевом растворе. Такой олигонуклеотид содержит два участка с *pur-pur*-последовательностью оснований, отличающихся нуклеотидным составом — d(TrG) и d(CpA). Ранее [7, 11, 12] в идентичных экспериментальных условиях нами изучено связывание EB и акридинового красителя профлавина с 5'-d(TrGpCpA) в водном растворе методом 1М- и 2М- ^1H -ЯМР.

Сравнительный анализ параметров комплексообразования интеркалирующих красителей, имеющих различные структуры хромофоров, а также боковые цепи и группы, с одними и теми же дезоксиолигонуклеотидными дуплексами в одинаковых экспериментальных условиях важен для установления физической природы сиквенс-специфичности связывания лигандов с определенными последовательностями ДНК.

Материалы и методы. Йодистый пропидий («Sigma», США) (рис. 1) использовали без дополнительной очистки, лиофилизировали из D_2O с изотопной чистотой 99,95 % D («Sigma») и растворяли в дейтерированном 0,1 М фосфатном буфере (рD 7,1), содержащем 10^{-4} моль/л ЭДТА. Концентрацию красителя определяли спектрофотометрически — для PI коэффициент экстинкции $\epsilon = 5900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ($\lambda = 493 \text{ nm}$) [13]. Дезокситетрарибонуклеозидтрифосфат 5'-d(TrGpCpA) синтезирован компанией «Oswel DNA Service» (Великобритания). Образец также лиофилизировали из D_2O и растворяли в дейтерированном 0,1 М фосфатном буфере, содержащем 10^{-4} моль/л ЭДТА (рD 7,1).

1М- и 2М- ^1H -ЯМР спектры измерены на спектрометре «Bruker DRX» с резонансной частотой 500 МГц. Остаточный сигнал HOD насыщался в период детектирования. Химический сдвиг определяли относительно ДСС (2,2-диметил-2-силапентан-5-сульфонокислота), в качестве внутреннего стандарта использовали TMA (бромид тетраметиламмония). Концентрационные измерения протонных химических сдвигов молекул выполнены при температуре $T = 308 \text{ K}$ в интервале концентраций от $3 \cdot 10^{-4}$ до 0,1 ммоль/л; температурные зависимости химических сдвигов протонов молекул в смешанном растворе измерены в диапазоне температур от 298 до 358 К. Двухмерные гомоядерные TOCSY и NOESY эксперименты, использованные для отнесения сигналов необменивающихся протонов молекул и для качественного определения характера комплексообразования красителя с олигонуклеотидом, измеряли при $T = 308 \text{ K}$.

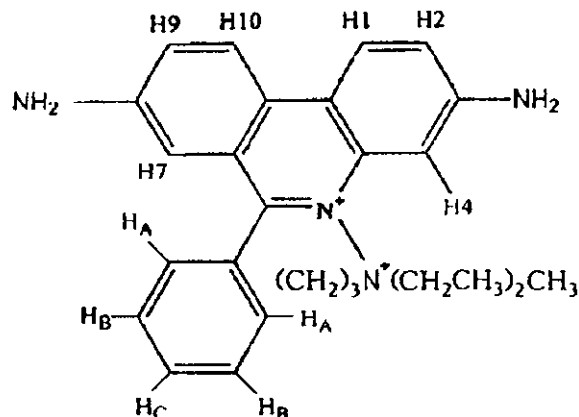
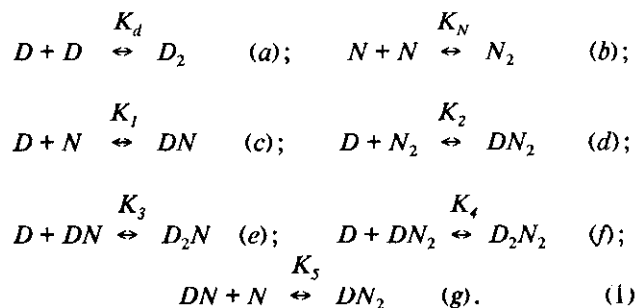


Рис. 1. Структурная формула дикатиона пропидия

Методика приготовления образцов и проведения экспериментов описана ранее [7, 8, 12].

Результаты и обсуждение. Предварительно выполненное отнесение сигналов протонов PI и исследуемого тетра-нуклеотида 5'-d(TrGpCpA) [14] позволило провести отождествление спектров смешанных растворов и выявить возможные связи ядер молекул красителя и тетрамера. Измеренные концентрационные зависимости химических сдвигов протонов PI в растворе с d(TGCA) представлены на рис. 2. Качественно сходные экспериментальные концентрационные зависимости химических сдвигов наблюдаются и для протонов EB в растворе с 5'-d(TrGpCpA) [7, 11]. Для количественного анализа взаимодействия красителя с тетра-нуклеотидом рассмотрена, как и ранее [7, 11, 12], следующая схема образования молекулярных ассоциатов в растворе:



Учтено, что в растворе имеет место динамическое равновесие взаимодействующих молекул, включающее как образование комплексов красителя с тетрамером, так и реакции самоассоциации молекул. Предусмотрена возможность образования

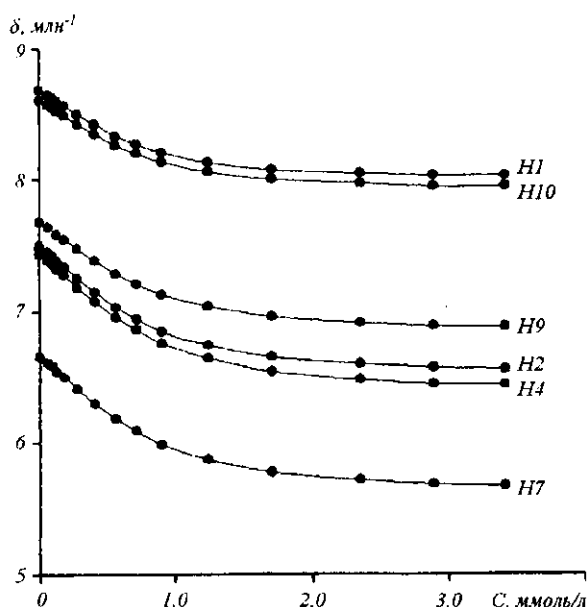


Рис. 2. Экспериментальная зависимость химических сдвигов протонов пропидия δ от концентрации C тетра nukлеотида при постоянной концентрации пропидия $D_0 = 0,8 \cdot 10^{-3}$ М, $T = 308$ К

комплекса DN_2 (состава 1:2) PI с тетра nukлеотидом двумя различными способами — непосредственного связывания красителя с дуплексом (реакция 1, d) и взаимодействием мономера тетра nukлеотида с 1:1-комплексом DN (реакция 1, g), где PI играет роль «скрепки» [8]. При использованных в эксперименте концентрациях красителя ($D_0 \approx 10^{-3}$ М) можно ограничиться процессом димеризации молекул, константа димеризации пропидия K_d при $T = 308$ К принята равной 45 л/моль [15]. Величина константы K_N самоассоциации тетра nukлеотида при $T = 308$ К составляет 47 л/моль дуплекса [14]. Химические сдвиги протонов красителя δ рассчитывали с использованием аддитивной модели [8]:

$$\delta = D/D_0(\delta_m + 2K_d D \delta_d + K_1 N \delta_1 + K_N K_2 N^2 \delta_2 + 2K_1 K_3 DN \delta_3 + 2K_N K_2 K_4 DN^2 \delta_4 + K_1 K_5 N^2 \delta_5). \quad (2)$$

Здесь D_0 — исходная молярная концентрация красителя; D и N — равновесные молярные концентрации мономеров PI и тетра nukлеотида; $\delta_m, \delta_d, \delta_1, \dots, \delta_5$ — протонные химические сдвиги молекулы красителя в мономерной (D), димерной (D_2) формах и в составе комплексов 1:1 (DN), 1:2 (DN_2 ,

реакция 1, d), 2:1 (D_2N), 2:2 (D_2N_2) и 1:2 DN_2 , реакция 1, g) соответственно. Величины δ_m и δ_d определены ранее в [15] при исследовании самоассоциации PI в тех же условиях (0,1 М фосфатный буфер). Тогда наблюдаемый химический сдвиг δ может рассматриваться как функция неизвестных параметров $\delta_1, \dots, \delta_5, K_1, \dots, K_5$. Эту многопараметрическую задачу решали, как и ранее [7, 11, 12], методом последовательного усложнения модели. Вычислительная процедура нахождения параметров модели (табл. 1, схемы I—IV), основанная на минимизации квадратичного функционала невязки с использованием концентрационных зависимостей химических сдвигов различных протонов красителя (рис. 2), достаточно подробно описана в [7, 8, 16]. Значения параметров, рассчитанных по схеме реакций (1), представлены в табл. 1.

Сравнение равновесных констант образования 1:1, 2:1, 1:2 и 2:2 комплексов с дезокситетрануклеотидом $d(TGCA)$ со значениями констант K_1, \dots, K_5 для подобных комплексов с EB [8] показывает, что качественно они соотносятся друг с другом примерно одинаковым образом. Вместе с тем количественные значения равновесных констант K_2, \dots, K_4 комплексообразования PI с дуплексом тетрамера заметно отличаются от соответствующих констант реакций образования комплексов EB с $d(TGCA)$ [7, 11].

Так, равновесная константа K_2 образования 1:2 комплекса PI с $d(TGCA)$ примерно в два раза превышает величину K_2 для взаимодействия EB с тетрамером при одинаковой температуре, а значения констант K_4 реакций образования 2:2 комплексов для красителей фенантридинового ряда находятся в обратном соотношении. Наблюдаемые различия, скорее всего, связаны с характерными особенностями боковых алкильных цепей фенантридинового хромофора красителей PI и EB, наличием дополнительного положительного заряда в боковой цепи PI по сравнению с EB. Можно предположить, что наличие в PI более длинной положительно заряженной алкильной цепи способствует энергетически более выгодным контактам с остовом олигонуклеотидной последовательности, а также создает определенные стерические препятствия для связывания второй молекулы красителя с дуплексом тетрамера. Величина константы K_5 образования комплекса 1:2 пропидия с $d(TGCA)$ через «скрепку» (реакция 1, g) значительно меньше константы K_2 реакции 1, d непосредственного связывания красителя с дуплексом, что, очевидно, определяется также наличием у хромофора PI достаточно массивных боковых привесков, создающих определенные стерические препятствия при

Таблица 1
Расчетные значения параметров комплексообразования (δ_1 (млн⁻¹) и K_1 (л/моль)) пропидия с 5'-d(TpGpCpA) в водном растворе (T = 308 K, рD 7,1)

Схема	Протон	δ_1	δ_2	δ_3	δ_4	δ_5	δ_m
I	H1	8,03	8,01	—	—	—	8,71
	H10	7,97	7,92	—	—	—	8,64
	H9	6,98	6,83	—	—	—	7,70
	H2	6,69	6,49	—	—	—	7,50
	H4	6,59	6,35	—	—	—	7,45
	H7	5,83	5,59	—	—	—	6,67
II	H1	7,99	8,02	8,44	—	—	8,71
	H10	7,94	7,91	8,31	—	—	8,64
	H9	6,86	6,87	7,46	—	—	7,70
	H2	6,56	6,52	7,24	—	—	7,50
	H4	6,42	6,39	7,23	—	—	7,45
	H7	5,69	5,61	6,45	—	—	6,67
III	H1	7,98	8,00	8,42	7,96	—	8,71
	H10	7,90	7,88	8,33	7,93	—	8,64
	H9	6,93	6,77	7,40	6,78	—	7,70
	H2	6,54	6,44	7,21	6,50	—	7,50
	H4	6,35	6,24	7,15	6,49	—	7,45
IV	H7	5,60	5,52	6,35	5,68	—	6,67
	H1	8,02	8,00	8,40	7,95	7,99	8,71
	H10	7,99	7,88	8,31	7,85	7,87	8,64
	H9	6,93	6,80	7,40	6,78	6,82	7,70
	H2	6,54	6,50	7,21	6,47	6,54	7,50
	H4	6,37	6,28	7,13	6,48	6,30	7,45
	H7	5,62	5,53	6,35	5,71	5,52	6,67
Схема	$K_1, 10^3$	$K_2, 10^3$	$K_3, 10^3$	$K_4, 10^3$	$K_5, 10^3$		
I	13,8±0,7	442±20	—	—	—		
II	12,4±0,5	219±15	1,2±0,2	—	—		
III	6,7±0,4	68±4	4,6±0,9	33±1	—		
IV	7,4±0,1	65±1	4,47±0,03	23±1	0,24±0,08		

взаимодействии мономера тетрануклеотида с 1:1 комплексом (DN), где PI играет роль «скрепки».

Следует отметить, что значения равновесных констант комплексообразования фенантридиновых красителей PI и EB с тетрамером существенно выше, чем акридинового красителя профлавина [12]; последнее согласуется с данными работы [17]. Вероятность образования в растворе комплекса 2:2 пропидия с d(TGCA) несколько ниже, чем

1:2 комплекса, т. е. связывание второй молекулы красителя менее выгодно, чем посадка одной молекулы в дуплекс d(TGCA). Тем не менее, равновесная константа K_4 образования 2:2 комплекса заметно выше констант K_1 и K_3 связывания PI с одной нитью (мономером) исследуемого тетрануклеотида (табл. 1). Соотношение между константами K_1 — K_4 свидетельствует о преимущественной интеркаляции PI, так же как и EB, в pur-pur последователь-

ности дуплекса (d(T-G)- и d(C-A)-сайты), при этом связывание пропидия отвечает модели «исключенного соседа» [18], согласно которой интеркаляция молекулы красителя между соседними парами оснований маловероятна.

Данный вывод о местах связывания PI с дуплексом d(TGCA) подтверждается 2M-NOE-спектрами, на которых отчетливо наблюдаются межмолекулярные кросс-пики между ortho-протонами фенольного кольца красителя и протонами N1' дезоксирибозы цитидина и тимидина. Указанные кросс-пики имеют относительно низкую интенсивность, что свидетельствует о достаточной удаленности взаимодействующих протонов в комплексе.

Индукцированные химические сдвиги протонов пропидия $\Delta\delta_i = \delta_m - \delta_i$ (где $i = 1, 2, \dots, 5$ соответствуют типу комплекса) соотносятся друг с другом подобно тому, как это имеет место для аналогичных типов комплексов EB с d(TGCA) [7, 11]. В случае взаимодействия PI с дуплексом тетра nukлеотида величины индуцированных химических сдвигов $\Delta\delta_4$ при связывании двух молекул красителя в среднем несколько меньше, чем $\Delta\delta_2$ при интеркаляции только одной молекулы, что предполагает некоторое отличие во взаимной ориентации хромофора PI и плоскостей пар оснований в этих комплексах. Расчетные значения индуцированных химических сдвигов протонов пропидия $\Delta\delta_2$ и $\Delta\delta_5$ в 1:2 комплексах близки между собой. Это свидетельствует о том, что геометрия 1:2 комплекса не зависит от того, каким путем шло его образование. В комплексах же PI с одиночной нитью тетра nukлеотида с d(TGCA) взаимные ориентации хромофора красителя и соседних оснований в местах «частично интеркалированного» связывания первой и второй молекул красителя существенно отличаются, поскольку $\Delta\delta_3 < \Delta\delta_1$ (табл. 1). Это, по-видимому, определяется большой конформационной свободой одноцепочечной последовательности.

По найденным значениям констант реакций (табл. 1) было рассчитано относительное содержание молекулярных ассоциатов в растворе в зависимости от $r = N_2/D_0$ — соотношения исходных концентраций дуплекса тетра nukлеотида и красителя (рис. 3). Характерно, что здесь проявляются те же общие закономерности, которые имели место при комплексообразовании EB с тетра nukлеотидом с d(TGCA) [7, 11].

Отметим тот факт, что вклад в общее равновесие различного типа комплексов определяется не только значениями равновесных констант реакций, но зависит существенно и от r . Качественное объяснение характера зависимостей, представленных на рис. 3, дано в работе [7, 11]. Анализ динамиче-

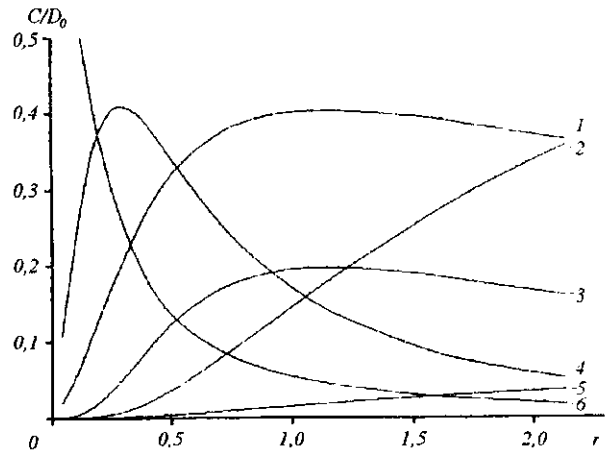


Рис. 3. Относительное содержание молекулярных комплексов в растворе в зависимости от отношения исходных концентраций дуплекса и красителя $r = N_2/D_0$, $T = 308$ К. Комплексы: 1 — 1:1 (DN); 2 — 1:2 (DN₂, реакция 1, d); 3 — 2:2 (D₂N₂); 4 — 2:1 (D₂N); 5 — 1:2 (DN₂, реакция 1, g); 6 — мономер красителя (D)

ского равновесия при комплексообразовании ароматических лигандов с олигонуклеотидами важен для установления вклада каждого типа комплекса в экспериментально наблюдаемые химические сдвиги протонов молекул и для корректного анализа двумерных спектров 2M-NOESY, когда возникает вопрос о расчете структур образующихся комплексов по значениям интенсивностей сигналов NOE [7, 8].

Термодинамика комплексообразования пропидия с d(TrGpCpA). На рис. 4 представлены экспериментальные температурные кривые для химических сдвигов δ_i протонов PI в растворе с тетра nukлеотидом d(TGCA). Качественно они сходны с наблюдаемыми температурными зависимостями химических сдвигов протонов EB с d(TGCA) в водном растворе [7, 19].

Как и ранее [7, 12, 19], использовали аддитивную модель для наблюдаемого химического сдвига i -го протона PI при температуре T :

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

где δ_{mi} , δ_{di} , $\delta_{1i} - \delta_{4i}$ и $f_m(T)$, $f_d(T)$, $f_1(T) - f_4(T)$ — значения химических сдвигов i -го протона PI и равновесные мольные доли профлавина при температуре T для его моно- и димерной форм, а также для различных комплексов EB с тетра nukлеотидом. В соотношении (3) предполагается, что величины

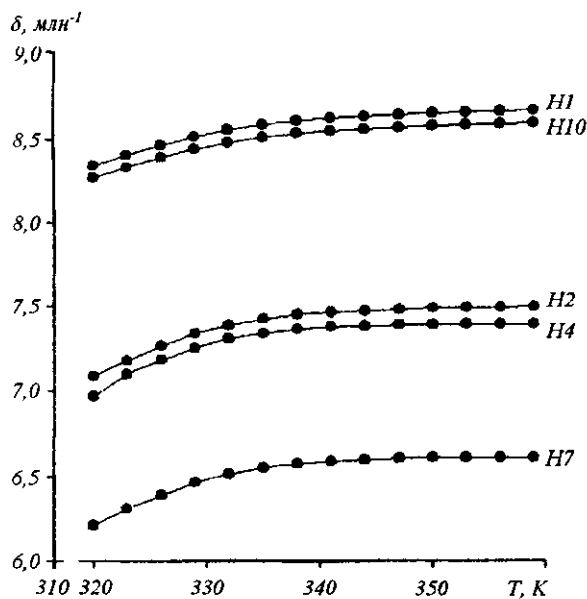


Рис. 4. Экспериментальные зависимости от температуры T химических сдвигов протонов пропидия δ в растворе красителя с 5'-d(TGCA) ($D_0 = 0,8 \cdot 10^{-3}$ М, $N_0 = 1,2 \cdot 10^{-3}$ М)

δ_{mi} , δ_{di} , $\delta_{1i} - \delta_{4i}$ не зависят от температуры в исследуемом температурном интервале. Допустимость такого приближения показана ранее [7, 19]. В модели (3) влияние температуры на значение δ учитывается тем, что молярные доли $f_m(T)$, $f_d(T)$, $f_1(T) - f_4(T)$, однозначно связанные с равновесными константами образования комплексов, являются функциями температуры. Определение температурных зависимостей для констант равновесия позволяет найти термодинамические параметры комплексообразования — энтальпию (ΔH) и энтропию (ΔS) для различных типов комплексов. Величины ΔH и ΔS рассчитывали с использованием параметрических регрессионных уравнений для анализа зависимостей молярных долей от температуры [8, 19].

На рис. 5 приведены расчетные зависимости молярных долей различных типов комплексов, а также мономеров ПИ от температуры. Видно, что при низких температурах краситель находится, в основном, в связанном состоянии. Содержание комплексов ПИ с мономером тетрауклеотида (1:1 и 2:1 комплексы) монотонно уменьшается с повышением температуры, при этом доля 1:1 комплексов остается значительной вплоть до высоких температур ($T = 353$ К). Температурные зависимости содержания комплексов ПИ с дуплексом тетрауклеотида (кривые 3, 4 на рис. 5) имеют характерный вид

кривых плавления для двухспиральных олигонуклеотидов. Аналогичная картина имеет место и в случае взаимодействия изученных нами ранее ароматических красителей — ЕВ [19] и профлавина [12] с дезокситетрануклеотидом d(TGCA) в идентичных условиях растворителя. Важно отметить, что экспериментально наблюдаемые кривые плавления для подобных многокомпонентных систем имеют усредненный характер и без соответствующего количественного анализа, позволяющего дифференцированно оценить вклад каждого типа комплекса в величину δ , нельзя сделать однозначного вывода о температурной стабильности того или иного ассоциата в растворе.

Для оценки энтальпии и энтропии комплексообразования молекул использовали формализм Вант-Гоффа [8]. На рис. 6 приведены зависимости Вант-Гоффа $\ln K = f(1/T)$, по которым определяли термодинамические параметры образования различных комплексов ПИ с тетрамером. Каждая точка на графике получена в результате усреднения параметров K_i , рассчитанных для различных ароматических протонов красителя; аппроксимирующие прямые проводили по методу наименьших квадратов. Усредненные значения энергии Гиббса, энтальпии и энтропии реакций комплексообразования ПИ с дезокситетрануклеотидом 5'-d(TGCA) для 308 К приведены в табл. 2.

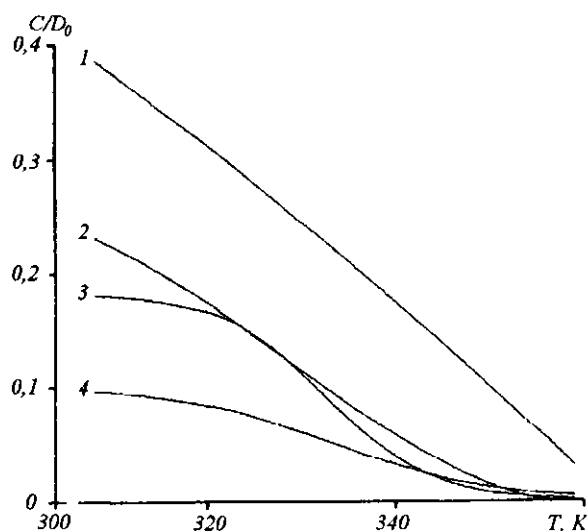


Рис. 5. Расчетные зависимости молярных долей пропидия и комплексов красителя с тетрауклеотидом 5'-d(TGCA) от температуры ($D_0 = 0,8 \cdot 10^{-3}$ М, $N_0 = 1,2 \cdot 10^{-3}$ М): 1 — комплекс 1:1 (DN); 2 — комплекс 2:1 (D_2N); 3 — комплекс 2:2 (D_2N_2); 4 — комплекс 1:2 (DN_2)

Таблица 2

Термодинамические параметры (ΔG , ΔH , кДж/моль; ΔS , Дж/(моль·К)) реакций образования комплексов пропидия с дезокситетрануклеотидом 5'-d(TGCA) в 0,1 М фосфатном буфере, рD 7,1

Комплекс	Химическая реакция	$-\Delta G_{298}$	$-\Delta H$	$-\Delta S_{298}$
1:1	$D + N \xrightleftharpoons{K_1} DN$	$22,8 \pm 0,07$	$92,7 \pm 1,6$	227 ± 6
2:1	$D + DN \xrightleftharpoons{K_3} D_2N$	$21,5 \pm 0,1$	$87,2 \pm 2,5$	213 ± 8
1:2	$D + N_2 \xrightleftharpoons{K_2} DN_2$	$28,4 \pm 0,09$	$49,9 \pm 4,1$	70 ± 13
2:2	$D + DN_2 \xrightleftharpoons{K_4} D_2N_2$	$25,7 \pm 0,1$	$69,9 \pm 4,2$	144 ± 15

Анализ численных значений термодинамических параметров позволяет заключить, что комплексобразование пропидия с d(TGCA) так же, как и EB, происходит, главным образом, в результате дисперсионных ван-дер-ваальсовых взаимодействий, которые обычно характеризуются отрицательной энтальпией и энтропией [20]. Значительный вклад гидрофобных взаимодействий наблюдается в случае реакции образования комплекса 1:2 PI с дуплексом d(TGCA), характеризующейся существенно меньшим абсолютным значением энтропии в сравнении с другими комплексами «краситель—тетрануклеотид», образующимися в растворе. В случае же комплекса состава 2:2, когда две молекулы лиганда интеркалируют в дуплекс, несколько большие отрицательные значения ΔH и ΔS по сравнению с комплексом состава 1:2 могут быть обусловлены увеличением жесткости спиральной структуры, что дополнительно к дисперсионным взаимодействиям между молекулами приводит к уменьшению энтальпии и энтропии при формировании комплекса [21].

Калориметрические исследования комплексобразования PI и EB с ДНК тимуса теленка [9] свидетельствуют о том, что при связывании PI с ДНК, в отличие от связывания EB, наблюдается довольно сильная зависимость энтальпии реакции образования комплекса от температуры. Такие различия в значениях ΔH образования комплексов фенантридиновых красителей с ДНК авторы [9] объясняют изменением положения и характера вращательного движения сравнительно длинной заряженной алкильной цепи PI в комплексе с полимерной ДНК при изменении температуры. Однако проведенные нами исследования комплексобразования как EB [7, 19], так и PI с короткой после-

довательностью ДНК — самокомплементарным дезокситетрануклеотидом d(TGCA) — свидетельствуют об отсутствии какой-либо зависимости ΔH образования комплексов от температуры в изученном температурном интервале. По-видимому, при взаимодействии красителя с коротким дуплексом ДНК

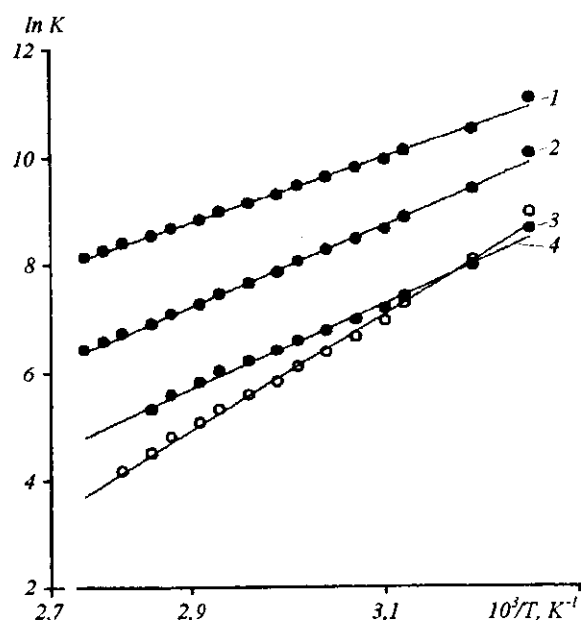


Рис. 6. Зависимость натурального логарифма равновесной константы K от обратной температуры ($\ln K$ от $1/T$) для реакций комплексобразования пропидия с тетрануклеотидом 5'-d(TGCA); комплексы: 1 — 1:2 (DN_2); 2 — 2:2 (D_2N_2); 3 — 1:1 (DN); 4 — 2:1 (D_2N)

в области небольших концентраций красителя и олигонуклеотида ввиду быстрого обмена взаимодействующих молекул эффект, связанный с поведением боковых алкильных цепей лиганда, оказывается пренебрежимо малым и зависимости Вант-Гоффа $\ln K = f(1/T)$ соответственно носят линейный характер для всех типов комплексов в водном растворе (рис. 6).

Следует отметить, что величины ΔH и ΔS для комплексов PI с d(TGCA) как в мономерной, так и дуплексной форме существенно меньше по абсолютной величине по сравнению с аналогичными комплексами EB с тетрамером в идентичных экспериментальных условиях [7, 11]. Это может свидетельствовать о большей роли гидрофобных взаимодействий при формировании комплексов PI с d(TGCA), связанных с более объемной, чем в EB, боковой алкильной цепью хромофора красителя, располагающейся при интеркаляции лиганда в малой бороздке двойной спирали.

Структуры комплексов. Анализ структур комплексов PI с d(TGCA) проводили на основании рассчитанных предельных значений протонных химических сдвигов и данных 2M-NOESY. Использовали, как и ранее [7, 8, 11, 12], модифицированную модель эквивалентных магнитных диполей [8], полученную в результате аппроксимации квантовомеханических кривых экранирования для оснований нуклеиновых кислот [22],

Очевидно, полученные в результате анализа экспериментальных протонных химических сдвигов по модели (2) величины экранирования протонов PI в комплексе 1:2 фактически являются средними для двух возможных мест связывания красителя в pur-pur-сайты дезокситетрануклеотида 5'-d(TGCA), что подтверждается данными 2M-NOESY. Но поскольку в рассматриваемом дезокситетрануклеотиде имеются два pur-pur-участка — 5'-d(T-G) и 5'-d(C-A), — отличающихся составом оснований, то в настоящей работе определяли конформационные параметры двух возможных 1:2 комплексов, соответствующих интеркаляции PI в различные pur-pur-сайты.

Использовали алгоритм преобразований координат атомов и программу, реализующую этот алгоритм, разработанные в ИТЭБ РАН [23]. Последовательность преобразования координат в двойной спирали отвечала изменению параметров ω (пропеллер), k (излом пары), τ (наклон пары), π (крен), D_x (сдвиг), D_y (скольжение), Ω (закручивание), D_z (поднятие) [24]. Вычислительная процедура нахождения конформационных параметров интеркалированного комплекса достаточно подробно описана в работе [8]. На рис. 7 представлена в

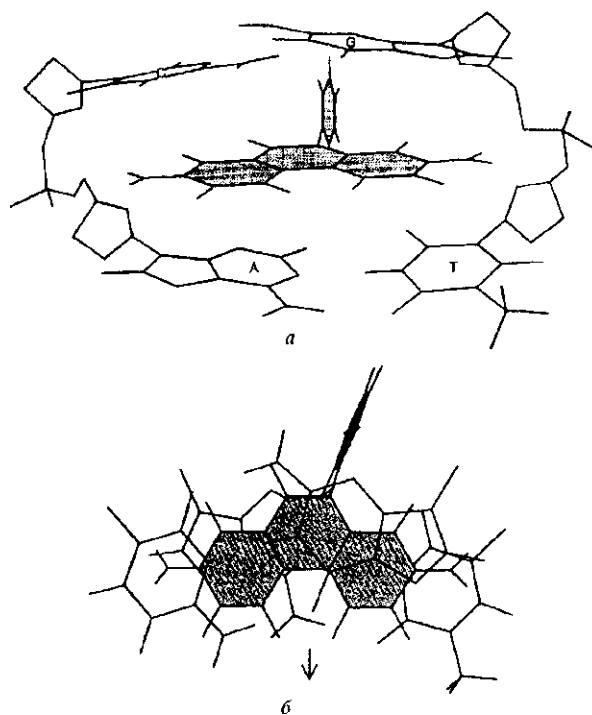


Рис. 7. Расчетная структура участка комплекса 1:2 пропидия с 5'-d(TGCA), соответствующая интеркаляции красителя в 5'-d(C-A)-сайт тетрануклеотида: а — вид на комплекс сбоку со стороны широкой бороздки спирального участка; б — вид на комплекс сверху, со стороны G-C-пары, показывающий степень перекрывания хромофора PI и пар оснований в интеркалированном комплексе; стрелка указывает направление к широкой бороздке; сахара не показаны

различных проекциях рассчитанная наиболее вероятная структура участка комплекса 1:2 PI с тетрануклеотидом 5'-d(TGCA), отвечающая интеркаляции красителя в 5'-d(C-A)-сайт тетрамера. Пространственное изображение структуры получено с помощью программы «Mathematica 2.2» (Wolfram Res, Ltd). Интеркалированный комплекс характеризуется следующими параметрами спирали: $D_z = 0,68$ нм; $\Omega = 17^\circ$; $\omega = -3,8^\circ$; $\tau = 0,6^\circ$; $D_x = 0,025$ нм; $D_y = 0,003$ нм; $\pi = 5,6^\circ$; $k = -7,0^\circ$. Хромофор красителя располагается перпендикулярно оси спирали на равных расстояниях ($D = 0,34$ нм) от плоскостей верхней и нижней пары оснований в 5'-d(C-A)-сайте. Раскручивание соседних пар спирали в месте интеркаляции составляет 19° ($\Omega = 17^\circ$), что заметно отличается от результатов рентгеноструктурных исследований комплекса d(Cp-

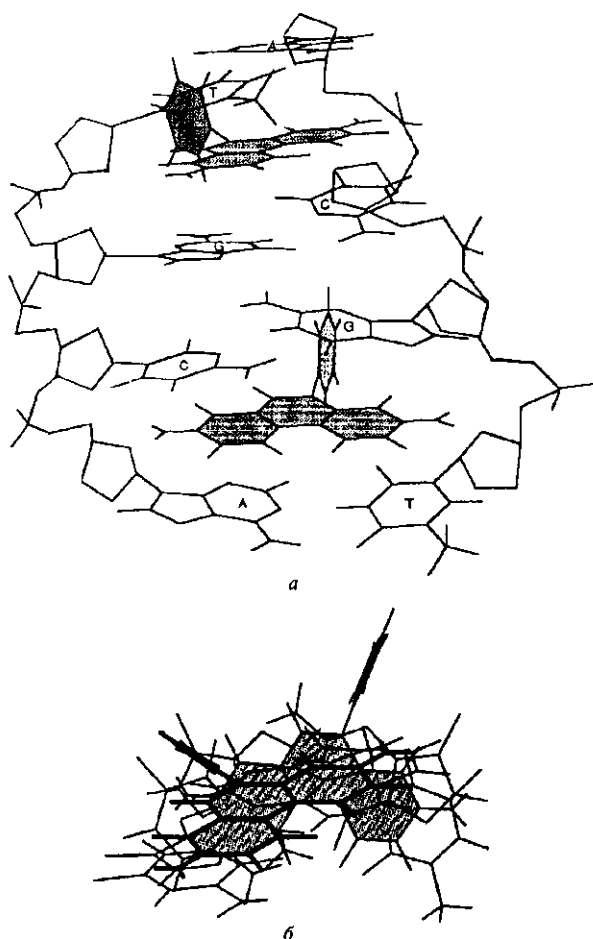


Рис. 8. Расчетная структура комплекса 2:2 пропидия с 5'-d(TGCA). Молекулы красителя интеркалированы в пиримидин-пуриновые d(T-G)- и d(C-A)-сайты тетрануклеотида: а — вид на комплекс сбоку со стороны большой канавки двойной спирали; б — вид на комплекс со стороны концевой пары А4-Т1, показывающий закручивание хромофоров пропидия вдоль оси спирали; сахара не показаны

G)₂ + EB в кристалле ($\Omega = 10^\circ$) [25] и результатов теоретических исследований этой системы [26, 27].

Аналогичные расчеты, проведенные для интеркалированного комплекса 1:2, который соответствует встраиванию красителя в другой *pur-pur*-сайт тетрамера (5'-d(TG)), свидетельствуют о нескольких отличных параметрах двойной спирали: $D_z = 0,66$ нм; $\Omega = 19^\circ$; $\omega = -4,9^\circ$; $\tau = -0,3^\circ$; $D_x = 0,025$ нм; $D_y = -0,006$ нм; $\pi = 5,5^\circ$; $k = 7,0^\circ$.

Наиболее вероятная расчетная структура комплекса 2:2 PI с дезокситетрануклеотидом представлена на рис. 8. Существенно, что в сравнении с комплексом 1:2 в сайтах комплекса 2:2 увеличива-

ются трансляционные параметры спирали $D_{y1} = 0,095$ нм и $D_{y2} = 0,045$ нм соответственно в 5'-d(T-G)- и 5'-d(C-A)-участках дуплекса и изменяются некоторые угловые параметры спирали, в частности, углы спирального вращения ($\Omega_1 = 11,8^\circ$ и $\Omega_2 = 17,5^\circ$). По-видимому, это связано с увеличением жесткости структуры, ограничением числа ее возможных конформационных состояний. Следует отметить, что, несмотря на качественно подобные структуры 1:2 и 2:2 комплексов фенантридиновых красителей EB [7, 11] и PI с d(TGCA), параметры двойной спирали в интеркалированных комплексах этих красителей значительно отличаются. Очевидно, наблюдаемые различия связаны со структурными особенностями боковых алкильных цепей фенантридиновых хромофоров EB и PI.

Что же касается конформации дезоксирибозных остатков тетрануклеотида d(TGCA), то здесь, как и в случае комплексообразования тетрамера с EB [7], из экспериментальных концентрационных зависимостей протонных химических сдвигов нельзя сделать столь определенных выводов, как это возможно при нахождении взаимной ориентации плоскостей ароматических оснований и хромофора красителя в составе интеркалированного комплекса. В то же время оценки с использованием суммарных констант спин-спиновой взаимодействия для H1' и H2', а также для H2'' протонов дезоксирибозы [28] дают основание сделать заключение о том, что пиримидиновые дезоксирибозные остатки находятся преимущественно в C3'-endo-, а пуриновые — в C2'-endo-конформациях.

Следует отметить, что наличие двух различных участков связывания красителя с дуплексом тетрануклеотида d(TGCA) накладывает определенные ограничения на возможность повышения точности определения структур комплексов, поскольку получаемые в расчетах структурные параметры являются, фактически, во временном масштабе ЯМР средними для двух мест интеркаляции лиганда. Более строго задача может быть решена при анализе взаимодействия интеркалирующих лигандов со специально синтезированными олигонуклеотидами с заданной последовательностью азотистых оснований. В частности, подобные исследования с дезокситетрануклеотидом d(CGCG), содержащим два одинаковых *pur-pur* d(C-G)-сайта, позволяют однозначно определить структуру участка комплекса 1:2 красителя с тетрамером [8].

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

D. A. Veselkov, P. O. Bolotin, V. O. Sigaev, L. N. Djimant, D. B. Davies, A. N. Veselkov

¹H NMR structural and thermodynamical analysis of complexation of propidium iodide with deoxytetranucleotide 5'-d(TpGpCpA) in aqueous solution

Summary

The interaction of phenanthridine dye propidium iodide with self-complementary deoxytetranucleoside triphosphate 5'-d(TpGpCpA) in aqueous salt solution has been studied by one- and two-dimensional 500 MHz ¹H NMR spectroscopy. The concentration and temperature dependences of proton chemical shifts of the interacting molecules have been measured. Different schemes of complexation of propidium with the tetranucleotide have been analysed and the equilibrium constants, free energy ΔG, enthalpies ΔH, entropies ΔS of different reactions leading to the formation of 1:1, 1:2, 2:1, 2:2 complexes have been determined. The specific features of the dynamic equilibrium of different complexes as a function of the drug-tetranucleotide ratio and temperature have been examined. It is concluded that propidium intercalates preferentially to pyrimidine-purine d(T-G)- and d(C-A)-sites of the tetranucleotide sequence. The most favourable structures of 1:2 and 2:2 propidium-tetranucleotide complexes have been constructed using the calculated values of induced chemical shift of dye protons and 2D-NOE spectra. A comparative analysis of the complexation of phenanthridine dyes, propidium iodide, ethidium bromide, and acridine dye proflavine with deoxytetranucleotide d(TGCA) under the same experimental conditions, has been made.

Д. О. Веселков, П. О. Болотін, В. О. Сігасєв, Л. Н. Димант, Д. Б. Девіс, О. Н. Веселков

Структурний і термодинамічний аналіз комплексоутворення йодистого пропідію з дезокситетрануклеотидом 5'-d(TpGpCpA) у водному розчині методом ¹H-ЯМР спектроскопії

Резюме

У роботі досліджено взаємодію барвника фенантридинового ряду йодистого пропідію з самокомплементарним дезокситетрарибонуклеозидтрифосфатом 5'-d(TpGpCpA) у водно-солевому розчині методом одномірної і двовимірної ¹H-ЯМР спектроскопії (500 МГц). Виміряно концентраційні і температурні залежності протонних хімічних зсувів взаємодіючих молекул. Розглянуто різні моделі утворення комплексів молекул барвника з тетрануклеотидом, розраховано рівноважні константи, вільної енергії ΔG, ентальпії ΔH і ентропії ΔS реакцій утворення комплексів складу 1:1, 2:1, 1:2 і 2:2. Виявлено особливості динамічної рівноваги комплексів різного типу в залежності від співвідношення концентрацій барвника і тетрануклеотиду та температури. Зроблено висновок стосовно переважаючої інтеркаляції пропідію в піримідин-пуринові d(T-G)- і d(C-A)-сайти тетрануклеотиду. На основі розрахованих значень індукованих хімічних зсувів для протонів барвника і даних 2D-NOESY визначено найвірогідніші просторові структури 1:2 і 2:2 комплексів пропідію з тетрануклеотидом. Проведено порівняльний аналіз параметрів комплексоутворення фенантридинових барвників йодистого пропідію і бромистого етидію, а також акридинового барвника профлавіну з дезокситетрануклеотидом d(TGCA) за ідентичних умов розчинника.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gale E. E., Cundliffe E., Reynolds P. E., Richmond M. N., Waring M. J. The molecular basis of antibiotic action.—London: John Wiley, 1981.—500 p.

2. Neidle S., Pearl L. H., Skelly J. V. DNA structure and perturbation by drug binding // *Biochem. J.*—1987.—243.—P. 1—3.
3. Blackburn G. M., Gait J. M. *Nucleic acids in chemistry and biology.*—Oxford; New-York; Tokyo: Oxford Univ. press, 1990.—P. 297—336.
4. Feigon J., Leupin W., Denny W. A., Keams 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. Bailey S. A., Graves D. A., Rill R., Marsch G. Influence of DNA base sequence on binding energetics of actinomycin D // *Biochemistry.*—1993.—32.—P. 5881—5887.
6. Bailey S. A., Graves D. A., Rill R. Binding of actinomycin D to the T(G)_nT motif of double-stranded DNA. Determination of the guanine requirement in non-classical, non-GpC binding sites // *Biochemistry.*—1994.—33.—P. 11493—11500.
7. Davies D. B., Karawajew L. N., Veselkov A. N. ¹H 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.
8. Davies D. B., Veselkov A. N. Structural and thermodynamical analysis of molecular complexation by ¹H NMR spectroscopy // *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*—1996.—92, N 19.—P. 3545—3557.
9. Hopkins H. P., Fumero J., Wilson W. D. Temperature dependence of enthalpy changes for ethidium and propidium binding to DNA: effect of alkylamine chains // *Biopolymers.*—1990.—29.—P. 449—459.
10. Marky L. A., Macgregor R. B. Hydration of dA-dT polymers; Role of water in the thermodynamics of ethidium and propidium intercalation // *Biochemistry.*—1990.—29.—P. 4805—4811.
11. Веселков А. Н., Завьялова О. С., Дымант Л. Н., Дэвис Д. Исследование комплексообразования бромистого этидия с самокомплементарным дезоксирибонуклеотидом 5'-d(TGCA) методом ¹H ЯМР-спектроскопии // *Журн. физ. химии.*—1996.—70, № 9.—С. 1617—1624.
12. Итон Р. Д., Веселков Д. А., Дымант Л. Н., Барановский С. Ф., Осетров С. Г., Дэвис Д. Б., Веселков А. Н. Исследование комплексообразования акридинового красителя профлавіна с дезокситетрануклеозидтрифосфатом 5'-d(TpGpCpA) в водном растворе методом ¹H ЯМР-спектроскопии // *Биополимеры и клетка.*—1998.—14, № 2.—С. 117—123.
13. Patel D. J., Canuel L. L. NMR investigations of complex formation between phenanthridinium dyes and deoxyguanosine 5'-monophosphate in aqueous solution // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1977.—74.—P. 5207—5211.
14. Веселков А. Н., Дымант Л. Н., Кодинцев В. В., Лисютин В. А., Паркес Х., Дэвис Д. Исследование самоассоциации молекул дезокситетрарибонуклеозидтрифосфатов d(TpGpCpA) в водном растворе методом ¹H-ЯМР спектроскопии // *Биофизика.*—1995.—40, № 3.—С. 283—294.
15. Davies D. B., Veselkov D. A., Veselkov A. N. Structure and thermodynamics of the hetero-association of aromatic molecules in aqueous solution determined by NMR spectroscopy // *Mol. Phys.*—1999.—97.—P. 439—451.
16. Veselkov A. N., Djimant L. N., Karawajew L., Kulikov E. L. Investigation of the aggregation of acridine dyes in aqueous solution by proton NMR // *Stud. Biophys.*—1985.—106.—P. 171—180.
17. Nelson J. W., Tinoco I., Jr. Intercalation of ethidium ion into DNA and RNA oligonucleotides // *Biopolymers.*—1984.—23, N 1.—P. 213—233.
18. McGhee J. D., von Hippel P. H. Theoretical aspects of

- DNA-protein interactions. Cooperative and noncooperative binding of large ligands to one dimensional homogeneous lattice // *J. Mol. Biol.*—1974.—86, N 3.—P. 469—489.
19. *Веселков А. Н., Завьялова О. С., Дымант Л. Н., Шипп Д., Дэвис Д.* Термодинамический анализ комплексообразования фенантридинового красителя бромистого этидия с дезокситетрануклеотидом 5'-d(ТрГрСрА) в водном растворе // *Журн. физ. химии.*—1997.—71, № 1.—С. 33—38.
20. *Ross P. D., Subramanian S.* Thermodynamics of protein association reaction: forces contributing to stability // *Biochemistry.*—1981.—20.—P. 3096—3102.
21. *Reinert K. E.* Anthracycline binding induced DNA stinering, bending and elongation. Stereochemical implications from viscometric investigation // *Nucl. Acids Res.*—1983.—11, N 10.—P. 3411—3430.
22. *Giessner-Prettre C., Pullman B.* Quantum mechanical calculations of NMR chemical shifts in nucleic acids // *Quart. Rev. Biophys.*—1987.—20, N 3/4.—P. 113—172.
23. *Poltev V. I., Teplukhin A. V.* Conformational implication of some nucleotide sequence // *Int. J. Quant. Chem.*—1989.—35, N 1.—P. 91—102.
24. *Dickerson R. E.* Definitions and nomenclature of nucleic acid structure parameters // *Biomol. Struct. and Dyn.*—1989.—6, N 4.—P. 627—634.
25. *Jain S. C., Tsai C. C., Sobell H. M.* Visualization of drug-nucleic acid interaction at atomic resolution. II Structure of an ethidium/dinucleoside monophosphate crystalline complex — ethidium:5'-iodocytidylyl-(3'-5')-guanosine // *J. Mol. Biol.*—1977.—14, N 2.—P. 317—331.
26. *Lybrand T., Kollman P.* Molecular calculations on the interaction of ethidium cation with double-helical DNA // *Biopolymers.*—1985.—24, N 8.—P. 1863—1879.
27. *Chen K.-X., Gresh N., Pullman B. A.* A theoretical exploration of conformational aspects of ethidium bromide intercalation into a d(CpG) minihelix // *Biopolymers.*—1987.—26, N 3.—P. 831—848.
28. *Searie M. S.* NMR studies of drug-DNA interactions // *Progr. NMR Spectr.*—1993.—25.—P. 403—480.

УДК 577.113

Надійшла до редакції 18.02.99