



Структура и функция биополимеров

УДК 577.113

А. Н. Веселков, Д. Дэвис, Л. Н. Дымант, Х. Паркес

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПРОФЛАВИНА С ДЕЗОКСИТЕТРАРИБОНУКЛЕОЗИДТРИФОСФАТОМ 5'-d(ApCpGpT) МЕТОДОМ ОДНО-И ДВУХМЕРНОЙ ¹H-ЯМР-СПЕКТРОСКОПИИ

Изучено комплексообразование акридинового красителя профлавина с самокомплементарным дезокситетрарибонуклеозидтрифосфатом 5'-d(ApCpGpT) в водно-солевом растворе методом одно- и двухмерной ¹H-ЯМР-спектроскопии (500 МГц). Двухмерная гомоядерная ПМР-спектроскопия (2M-COSY и 2M-NOESY) использована для полного отнесения сигналов протонов молекул в растворах и для качественного анализа характера взаимодействия профлавина с тетрануклеотидом. Измерены концентрационные зависимости протонных химических сдвигов молекул. По предложенным моделям комплексообразования определены равновесные константы реакций и предельные значения химических сдвигов протонов красителя в составе комплексов. Построена наиболее вероятная структура 1:2 комплекса красителя с тетрануклеотидом исходя из расчетных значений индуцированного химического сдвига протонов профлавина и 2M-NOESY-спектра.

Введение. Комплексы акридиновых красителей с олигонуклеотидами могут служить в качестве модельных систем связывания ароматических молекул с нуклеиновыми кислотами. В ряде работ (см., например, [1—5]) показано, что ароматические лиганды проявляют специфичность во взаимодействии с определенными последовательностями азотистых оснований в нуклеотидной цепи. Экспериментально установлено, что указанная специфичность практически не зависит от длины нуклеотидной цепи и характера последовательностей, примыкающих к месту связывания [3, 5]. Некоторая избирательность существует уже при взаимодействии ароматических молекул с самыми короткими фрагментами двухспиральных нуклеиновых кислот — динуклеотидными дуплексами [1, 6]. Следовательно, важные характеристики комплексообразования красителей с нативной ДНК могут быть выявлены при изучении их взаимодействия с малыми фрагментами нуклеиновых кислот — самокомплементарными олигонуклеотидами заданной последовательности оснований в цепи. Наиболее эффективным методом получения непосредственной информации о структуре молекулярных комплексов в растворе является ЯМР-спектроскопия. В последнее время широко стали применяться методики двухмерного ЯМР (2M-ЯМР), использование которых наряду с одномерной ЯМР-спектроскопией позволяет более детально проанализировать закономерности комплексообразования лигандов с олигонуклеотидами в растворе. Следует отметить, что в растворе (особенно в случае коротких олигонуклеотидов) имеет место сложное динамическое равновесие молекул и их комплексов, которое следует учитывать при интерпретации экспериментальных результатов.

В настоящей работе методом одно- и двухмерной ЯМР-спектроскопии (500 МГц) проведено исследование комплексообразования профлавина с самокомплементарным дезокситетрарибонуклеозидтрифосфатом 5'-d(ApCpGpT), содержащим CG-сайт в центре тетрамера. Выбор такого олигонуклеотида обусловлен тем, что профлафин прояв-

© А. Н. ВЕСЕЛКОВ, Д. ДЭВИС, Л. Н. ДЫМАНТ, Х. ПАРКЕС, 1991

ISSN 0233-7657. БИОПОЛИМЕРЫ И КЛЕТКА. 1991. Т. 7. № 6

ляет специфичность взаимодействия с пиримидин-пуриновой последовательностью оснований в дуплексе. Связывание профлавина с самыми короткими нуклеотидными последовательностями — динуклеотидами CpG и d(CpG) достаточно хорошо изучено как в растворе [7, 8], так и в кристалле [9, 10]. Представляет интерес выяснение влияния добавочных концевых нуклеозидов, фланкирующих центральный CG-сайт в тетра-нуклеотиде, на характер комплексообразования красителя в растворе.

Для анализа закономерностей равновесия в растворе и определения равновесных констант образования различного вида комплексов измерены концентрационные зависимости химических сдвигов необмениваемых протонов дезокситетрануклеотида и красителя. Данные гомоядерной корреляционной 2М-ЯМР-спектроскопии (2М-COSY и 2М-NOESY) использованы для полного отнесения сигналов в спектре ¹H-ЯМР дезокситетрануклеотида, а также для качественного определения характера комплексообразования красителя с олигонуклеотидом.

Материалы и методы. Профлавин («Sigma», США) использовали без дополнительной очистки, трижды лиофилизировали из D₂O с изотопной чистотой 99,95 % D («Sigma») и растворяли в дейтерированном 0,1 М фосфатном буфере. Концентрацию красителя определяли спектрофотометрически — для профлавина коэффициент экстинкции $\epsilon = 41\,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ ($\lambda = 444 \text{ нм}$) [11]. Дезокситетрарибонуклеозидтрифосфат 5'-d(ApCpGpT) синтезирован компанией «OSWEL DNA SERVICE» (Великобритания). Образец также трижды лиофилизировали из D₂O и растворяли в дейтерированном 0,1 М фосфатном буфере (pD 6,6). Растворы для концентрационных измерений, в которых процентное содержание профлавина поддерживалось постоянным, готовили добавлением свежеприготовленного раствора профлавина заданной концентрации в исходную смесь тетра-нуклеотида и красителя. В случае регистрации двухмерных спектров ЯМР предварительно осуществляли дегазацию исследуемых образцов продувкой их азотом в течение ~ 20 мин.

Все протонные спектры ЯМР измерены на импульсном спектрометре «JEOL GSX 500» с резонансной частотой 500 МГц. Остаточный сигнал НОД насыщался в период детектирования. Химический сдвиг определяли относительно DSS (2,2-диметил-1-силапентан-5-сульфокислота), в качестве внутреннего стандарта использовали TMA (бромид тетраметиламмония). Измерения проводили в стандартных ампулах с внешним диаметром 5 мм, минимальный объем исследуемого раствора — 0,5 мл. Отнесение сигналов в спектрах ¹H-ЯМР, отождествление химических и пространственных связей ядер осуществляли с помощью двухмерных спектроскопий корреляции химических сдвигов — 2М-COSY (через гомоядерное скалярное спин-спиновое взаимодействие) и 2М-NOESY (через гомоядерную кросс-релаксацию). Спектры 2М-NOESY регистрировали при T = 293 К с использованием стандартной последовательности импульсов при ширине спектров SW = 10 000 Гц, 2 048 точек в период детектирования (t_2), 512 приращений времени эволюции (t_1) и при фиксированном времени смешивания $\tau_m = 300$ мс. Спектры 2М-COSY измеряли при той же температуре, используя 2 048 точек в t_2 и 256 приращений в t_1 . Период восстановления составлял 1 с для 2М-COSY и 3 с для 2М-NOESY. Для увеличения чувствительности импульсную последовательность при каждом значении t_1 повторяли 16 и 32 раза для 2М-COSY и 2М-NOESY-экспериментов соответственно. Температуру образцов поддерживали с помощью JEOL NM-GVT3 терморегулятора.

Результаты и обсуждение. Протонный спектр профлавина не отличался от измеренного ранее [12]. Как и многие другие плоские ароматические молекулы, профлавин образует в растворе межмолекулярные комплексы благодаря стэкинг-взаимодействию хромофоров красителя, константа самоассоциации профлавина $K = 700 \pm 150 \text{ л/моль}$ при T = 294 К (0,1 М фосфатный буфер). Отнесение сигналов в спектре

ПМР тетрануклеотида 5'-d(ApCpGpT) получено на основании двухмерных гомоядерных COSY и NOESY-экспериментов при концентрации образца $2,5 \cdot 10^{-3}$ моль/л. Спектр 2M-COSY использовали для выявления протонов, связанных *J*-взаимодействием и принадлежащих отдельному дезоксирибозному кольцу, а также для идентификации необменивающихся протонов по *J*(H5, H6)- и *J*(CH₃, H6)-корреляциям в основаниях цитозина и тимина. Из 2M-NOESY на основе анализа крсс-пиков между ароматическими протонами и протонами дезоксирибозы по известной схеме [13] определено, какие сигналы протонов сахарного

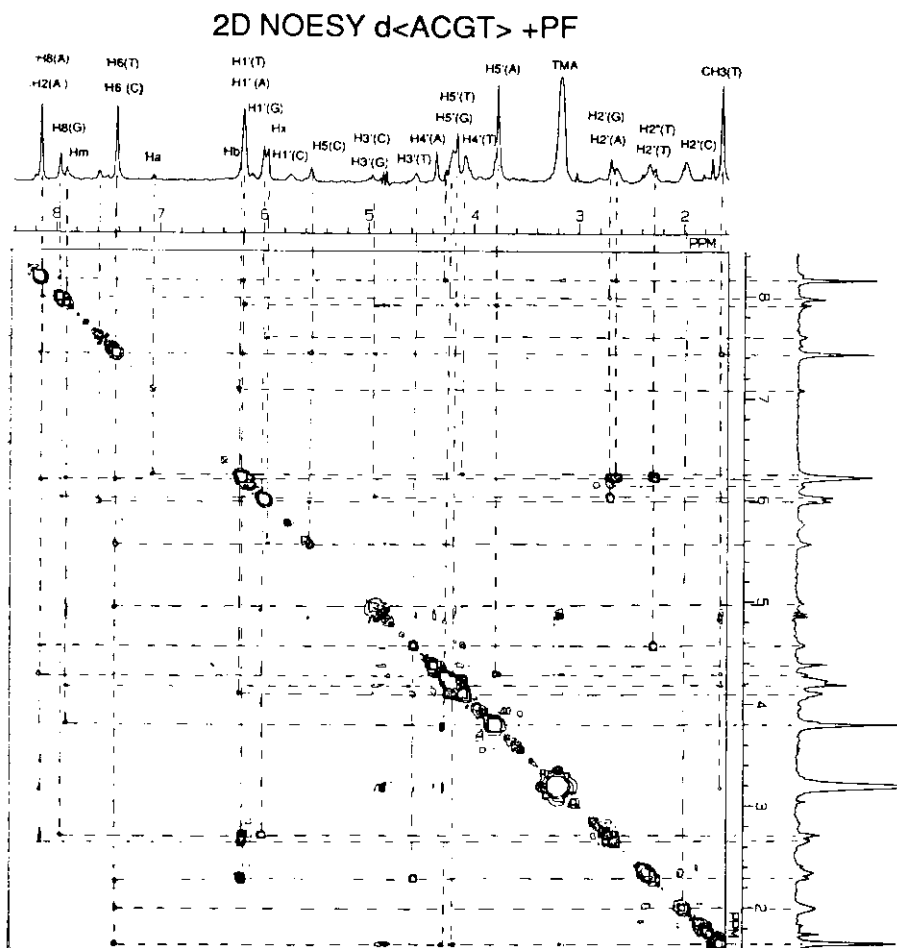


Рис. 1. 2M-NOE-спектр раствора профлавина с тетрануклеотидом 5'-d(ApCpGpT) при исходных концентрациях профлавина $P_0 = 0,446 \cdot 10^{-3}$ моль/л и тетрануклеотида $N_0 = 1,2 \cdot 10^{-3}$ моль дуплекса/л

кольца и нуклеотидного основания относятся к отдельному нуклеозиду и в каком порядке углеводные остатки связаны в олигомерную цепь. Предварительно выполненное отнесение сигналов протонов исследуемого тетрануклеотида [14] позволило произвести отождествление спектров смешанных растворов и выявить возможные связи ядер молекул профлавина и тетрамера через пространство. Отметим, что положение резонансов протонов профлавина в суммарном спектре достаточно надежно определяется по характеру изменения интенсивности сигналов в процессе титрования при постоянной концентрации красителя. На рис. 1 представлен спектр 2M-NOE раствора профлавина с тетрануклеотидом 5'-d(ApCpGpT), связи между различными протонами показаны пунктирными линиями. Видно наличие крсс-пиков между протонами профлавина и протонами внутренних нуклеозидов, что сви-

детельствует о преимущественном встраивании профлавина в С—G-сайт тетрамера.

Измеренные концентрационные зависимости химических сдвигов протонов профлавина в смешанном растворе представлены на рис. 2. Для количественной оценки взаимодействия профлавина с тетрауклеотидом 5'-d(АpСpGpT) были проанализированы различные схемы образования комплексов. Как отмечалось, в растворе имеет место динамическое равновесие взаимодействующих молекул, включающее в себя различные процессы комплексообразования красителя с тетрамером, а

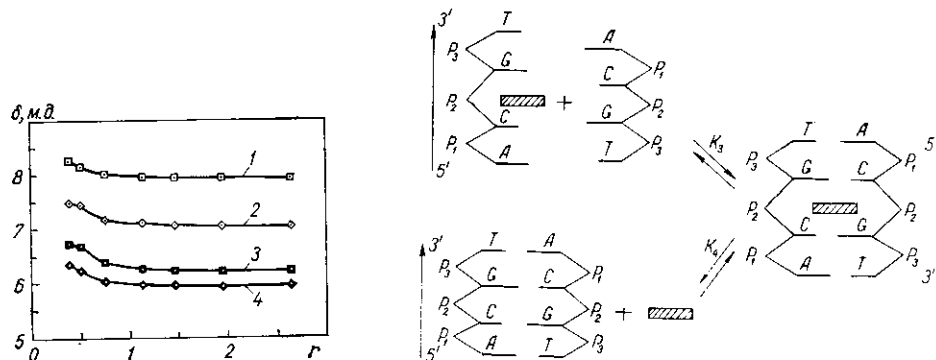
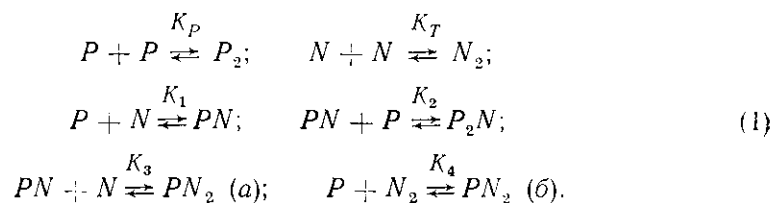


Рис. 2. Зависимость химических сдвигов протонов профлавина от отношения исходных концентраций красителя и тетрауклеотида в дуплексной форме $r = N_0/P_0$ при постоянной концентрации профлавина $P_0 = 0,446 \cdot 10^{-3}$ моль/л; 1— H_M ; 2— H_A ; 3— H_B ; 4— H_X

Рис. 3. Схематическое представление реакций формирования 1 : 2 комплексов в растворе

также реакции самоассоциации молекул. Что касается самоассоциации профлавина, то при использованных в эксперименте концентрациях красителя можно ограничиться процессом димеризации молекул. Применительно к условиям эксперимента константа димеризации K_p с учетом ее зависимости от температуры принята равной 300 л/моль [15]. Величина константы K_T самоассоциации тетрауклеотида 5'-d(АpСpGpT) была определена нами ранее при исследовании концентрационных зависимостей протонных химических сдвигов тетрамера. При $T = 293$ К в 0,1 М фосфатном буфере (рD 6,6) расчетное значение K_T составило 160 ± 30 л/моль дуплекса [14]. Для количественного анализа взаимодействия красителя с тетрауклеотидом рассмотрена следующая схема образования молекулярных ассоциатов в растворе:



В предлагаемой схеме комплексообразования вследствие малости исходных концентраций сделано допущение об определяющей роли двухкомпонентных взаимодействий в растворе. Предусмотрена возможность образования 1 : 2 комплекса (PN_2) профлавина с тетрауклеотидом двумя различными способами — непосредственным связыванием красителя с дуплексом и формированием этого комплекса путем взаимодействия мономера тетрауклеотида с 1 : 1 комплексом (PN), где профлавин играет роль «скрепки». Учитывая законы действующих масс для реакций (1) и закон сохранения массы в виде

$$\begin{aligned}
 P_0 &= P + 2X + Z + 2R + W; \\
 N_0 &= N + 2Y + Z + R + 2W,
 \end{aligned}
 \tag{2}$$

где P_0 , N_0 — исходные молярные концентрации красителя и тетра-нуклеотида; P , N — равновесные молярные концентрации мономеров профлавина и тетра-нуклеотида; X , Y , Z , R , W — равновесные молярные концентрации димеров профлавина (P_2), тетра-нуклеотида (N_2), комплекса 1:1 красителя с одиночной нитью тетра-нуклеотида (PN), комплекса 2:1 двух молекул красителя с одиночной нитью (P_2N), комплекса 1:2 красителя с дуплексом тетра-нуклеотида (PN_2) соответственно, получаем следующую систему уравнений:

$$2(K_P + K_1K_2N)P^2 + (1 + K_1N + K_1K_3N^2 + K_TK_4N^2)P - P_0 = 0; \quad (3)$$

$$2(K_T + K_1K_3P + K_TK_4)N^2 + (1 + K_1P + K_1K_2P^2)N - N_0 = 0.$$

Химические сдвиги рассчитывали с использованием аддитивной модели, в которой измеряемые химические сдвиги протонов красителя (δ) при конечной концентрации вещества представлялись в виде суммы вкладов мономерных и ассоциированных форм, доли которых зависят от концентрации

$$\delta = f_M\delta_M + f_d\delta_d + f_1\delta_1 + f_2\delta_2 + f_3\delta_3 + f_4\delta_4. \quad (4)$$

Здесь f_M , f_d , f_1 — f_4 — равновесные мольные доли красителя в мономерной (P), димерной (P_2) формах и в составе комплексов 1:1 (PN), 2:1 (P_2N), 1:2 (PN_2 , реакция 1a) и 1:2 (PN_2 , реакция 1б) соответственно; δ_M , δ_d , δ_1 — δ_4 — химические сдвиги протонов молекулы красителя в мономере, димере и в комплексах. С учетом (2) выражение (4) запишем в виде

$$\delta = P/P_0(\delta_M + 2K_PP\delta_d + K_1N\delta_1 + 2K_1K_2PN\delta_2 + K_1K_3N^2\delta_3 + K_TK_4N^2\delta_4). \quad (5)$$

Величины δ_M и δ_d можно считать известными. Они были определены ранее [10] при исследовании самоассоциации профлавина исходя из концентрационных зависимостей протонных химических сдвигов красителя в тех же условиях растворителя (0,1 М фосфатный буфер). Тогда наблюдаемый химический сдвиг δ является функцией неизвестных δ_1 — δ_4 , K_1 — K_4 , P и N . Концентрации красителя P и тетра-нуклеотида N , в свою очередь, зависят от K_1 — K_4 , P_0 и N_0 и могут быть найдены из системы уравнений (3). Поиск восьми параметров δ_1 — δ_4 , K_1 — K_4 модели (5) целесообразно проводить вариационным методом путем минимизации квадратичного функционала невязки [12, 16] с использованием экспериментальных концентрационных зависимостей химических сдвигов различных протонов красителя. Вычислительная процедура минимизации функционала невязки предусматривает предварительное определение равновесных концентраций P и N при вариации каждого из искомого параметров. Это требует на каждом итерационном цикле обращения к подпрограмме решения системы нелинейных уравнений (3). Анализ промежуточных значений P и N позволяет задавать физически обоснованный диапазон изменения параметров K_1 — K_4 и тем самым конкретизировать поиск минимума функционала невязки. Такая многопараметрическая задача потребовала решения в два этапа: первоначальное приближение находили методом случайного поиска безусловного минимума (программа MIN 31 математического обеспечения ЭВМ ЕС [17]), дальнейшую оптимизацию выполняли симплексным методом Нелдера—Мида [18]. Отметим, что в процессе расчетов были проанализированы также другие схемы образования комплексов в растворе, учитывающие, например, дополнительно формирование 2:2 комплекса или же, наоборот, исключают те или иные реакции из схемы (1). Рассматриваемая здесь схема реакций дает наилучшее соответствие расчетных и экспериментальных значений протонных химических сдвигов. Важно, что расчет по моделям, в которых преобладали реакцией образования 1:2 комплекса через «скрепку», не привел к удовлетворительным результатам.

Усредненные значения найденных параметров модели (5) пред-

ставлены в таблице. Характерно, что равновесная константа реакции K_2 много меньше K_1 , т. е. связывание второй молекулы профлавина с одиночной нитью имеет явно антикооперативный характер. Аналогично, интеркаляция второй молекулы в дуплекс с образованием 2 : 2 комплекса, как показали дополнительные расчеты, также явно антикооперативна. По-видимому, краситель преимущественно встраивается в центральный CG-сайт тетрамера, поэтому присоединение еще одной молекулы профлавина как к одиночной нити тетрануклеотида, так и в дуплекс маловероятно. Сравнение значений констант K_3 и K_4 показывает, что образование 1 : 2 комплекса через «скрепку» является более предпочтительным процессом, чем интеркаляция красителя непосредственно в дуплекс. Следует учитывать, что, согласно схеме реакций (1), параметры K_1 — K_4 являются равновесными константами образования комплексов и должны быть одинаковыми для всех протонов. Усредненные значения этих параметров составляют $K_1 = 22\,000 \pm 1\,800$ л/моль, $K_2 = 1\,520 \pm 380$ л/моль, $K_3 = 15\,700 \pm 2\,300$ л/моль, $K_4 = 4\,880 \pm 1\,220$ л/моль. Отметим, что константы образования 1 : 1 и 1 : 2 комплексов профлавина с тетрануклеотидом на порядок выше таковых для комплексов 1 : 1 и 1 : 2 красителя с динуклеотидными последовательностями [7]. Сравнение рассчитанных относительно одинакового стандарта значений предельных химических сдвигов протонов профлавина в составе 1 : 2 комплекса с динуклеотидами CpG и GpC и тетрануклеотидом d(ApCpGpT) показывает их существенное отличие для протонов H_M и H_X . Это свидетельствует о различной геометрии комплексов, образующихся при интеркаляции профлавина в дирибонуклеотид и соответствующий сайт дезокситетрануклеотида. В определенной мере это может быть связано с конформационными различиями между дезоксирибо- и рибонуклеотидными последовательностями. В частности, наблюдаются разные структуры комплексов 1 : 2 профлавина с CpG и d(CpG) в кристаллическом состоянии [9, 10]. Проведенные нами ранее исследования по комплексообразованию профлавина с динуклеотидами показали, что при взаимодействии красителя с одиночной нитью структуры 1 : 1 комплексов с CpG и GpC существенно различаются [8]. При этом в 1 : 1 комплексе профлавина с CpG краситель ориентирован по отношению к нити динуклеотида боковым бензольным кольцом хромофора. Подобная ориентация плоской молекулы профлавина в CG-сайте будет создавать благоприятные условия для посадки второй одноцепочечной молекулы тетрануклеотида на «скрепку» с образованием 1 : 2 комплекса. На рис. 3 дано схематическое представление двух реакций, приводящих к формированию 1 : 2 комплексов в растворе.

Из таблицы видно, что расчетные значения химических сдвигов протонов профлавина δ_3 и δ_4 в 1 : 2 комплексе практически одинаковые. Это свидетельствует о том, что геометрия этого комплекса не зависит от того, каким путем шло его образование. Значения δ_1 и δ_2 различаются между собой, при этом индуцированные химические сдвиги $\Delta\delta_i = \delta_M - \delta_i$, $i = 1, 2$ для всех протонов профлавина значительно меньше в 2 : 1 комплексе в сравнении с 1 : 1 комплексом. Очевидно, что расчет-

Расчетные значения параметров комплексообразования профлавина с 5'-d(ApCpGpT)*

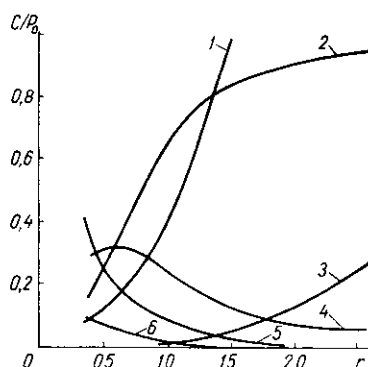
Параметр	Протон				Параметр	Протон			
	H_M	H_A	H_B	H_X		H_M	H_A	H_B	H_X
$K_1, 10^3$ л/моль	24,50	19,66	20,77	23,19	δ_1 , м. д.	7,75	7,10	6,34	5,85
$K_2, 10^3$ л/моль	2,02	1,31	2,60	0,77	δ_2 , м. д.	8,25	7,30	6,61	5,91
$K_3, 10^3$ л/моль	14,19	18,19	17,65	12,57	δ_3 , м. д.	7,95	7,03	6,19	5,93
$K_4, 10^3$ л/моль	6,63	3,85	3,45	5,58	δ_4 , м. д.	8,09	7,09	6,15	5,90
					δ_M , м. д.	8,78	7,90	7,06	6,86

* Химические сдвиги представлены относительно стандарта DSS.

ное значение $\Delta\delta_i$ в 2 : 1 комплексе является средним для двух связанных с тетрауклеотидом молекул красителя. Если предположить, что одна молекула встроена в центральный СГ-сайт, то другая — присоединяется, по всей вероятности, снаружи путем вертикального стэкинга к концевым нуклеотидам, поскольку экранирование ее протонов незначительно.

По найденным значениям констант реакций было рассчитано относительное содержание молекулярных комплексов в растворе в зависимости от $r = N_0/P_0$ — соотношения исходных концентраций дуплекса тетрауклеотида и красителя (рис. 4). Видно, что вклад в общее равновесие в растворе комплексов различного вида определяется не только значениями равновесных констант реакций, но зависит существенно и от r . Так, при $r = 0,5$ относительное содержа-

Рис. 4. Относительное содержание молекулярных комплексов в растворе в зависимости от отношения исходных концентраций тетрауклеотида в дуплексной форме и красителя $r = N_0/P_0$ при $P_0 = 0,446 \cdot 10^{-3}$ моль/л: 1 — мономер тетрауклеотида; 2 — 1 : 2 комплекс PN_2 , формирующийся через «скрепку»; 3 — димер тетрауклеотида N_2 ; 4 — 1 : 1 комплекс PN ; 5 — мономер профлавина P ; 6 — 2 : 1 комплекс P_2N



ние всех ассоциатов сравнимо по величине. С увеличением r наблюдается значительный рост доли 1 : 2 комплекса, формирующегося через «скрепку» (рис. 4, кривая 2), что связано с высокой вероятностью образования такой структуры по мере возрастания концентрации мономеров тетрауклеотида. Кривая 4, характеризующая долю 1 : 1 комплекса PN в растворе, имеет максимум при r , близком к стехиометрическому соотношению исходных концентраций красителя и тетрауклеотида. Вклад 2 : 1 комплекса в общее равновесие в растворе становится пренебрежимо малым уже при $r \geq 1$. Что касается относительного содержания комплекса 1 : 2, формирующегося путем интеркаляции красителя в дуплексе, то несмотря на довольно высокое значение константы реакции K_4 , оно оказалось малым во всем диапазоне изменения r . Это обстоятельство связано, в первую очередь, с низкой константой самоассоциации тетрауклеотида 5'-d(ApCpGpT), в результате чего заметное количество тетрауклеотида в дуплексной форме (кривая 3) появляется в растворе лишь при больших значениях r , когда свободного красителя нет (кривая 5) там уже практически нет.

Проведенный анализ динамического равновесия в растворе позволяет сделать заключение о том, что вклад каждого типа комплекса в экспериментально наблюдаемый химический сдвиг протонов зависит от вероятности его образования и определяется как значениями равновесных констант реакций, существенно зависящих от температуры раствора, так и величинами исходных концентраций красителя и олигонуклеотида. В связи с этим нельзя *a priori*, без предварительного расчета утверждать, какой тип комплекса преобладает в растворе. Вместе с тем в подавляющем большинстве опубликованных работ по связыванию интеркалирующих лигандов с короткими олигонуклеотидами интерпретация экспериментальных результатов проводится без соответствующего количественного анализа. Так, в последних работах Делепьерра и др. [19—21] тип комплекса в растворе устанавливали по соотношению концентраций взаимодействующих молекул, а предельные химические сдвиги протонов в составе комплексов определяли путем вычисления разности между экспериментальными значениями химических сдвигов протонов красителя и значениями химических сдвигов при бесконечном разбавлении, т. е. в мономере. Очевидно,

подобный подход к анализу комплексообразования в растворе и нахождению предельных химических сдвигов не является достаточно корректным. Вместе с тем авторы использовали полученные таким образом данные при обсуждении структур комплексов в растворе, что может привести к существенным ошибкам в определении положения хромофора красителя в комплексах.

В настоящей работе анализ структур комплексов профлавина с тетра nukлеотидом сделан на основании рассчитанных предельных значений протонных химических сдвигов и 2M-NOE-спектра. Большие величины индуцированного химического сдвига протонов в область

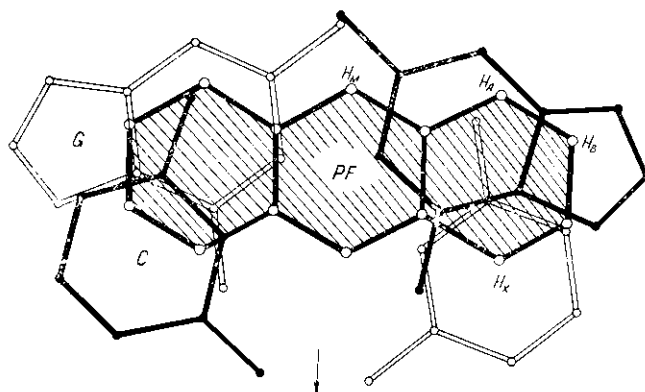


Рис. 5. Структура 1:2 комплекса профлавина с 5'-d(ApCpGpT). Вид сверху на CG-сайт в направлении, перпендикулярном плоскостям оснований и хромофора красителя. Атомы верхней пары оснований, связи между ними, а также связи между атомами интеркалированного красителя окрашены черным. Стрелка указывает направление к широкой канавке спирали

сильного поля $\Delta\delta_i = \delta_M - \delta_i$ ($i=1, 3, 4$) для соответствующего типа комплекса свидетельствуют о значительном экранирующем влиянии круговых токов оснований на все протоны профлавина, что предполагает встраивание хромофора красителя между плоскостями азотистых оснований тетра nukлеотида. Квантовомеханический расчет экранирующего действия оснований нуклеиновых кислот, выполненный в [22], показывает, что наибольший индуцированный химический сдвиг для протонов молекулы, находящейся между гуанином и цитозином на расстоянии 0,34 нм от них, может достигать 1,7÷1,8 м.д. Найденные значения $\Delta\delta_i$ (см. таблицу) для всех протонов красителя в составе комплексов находятся в пределах 0,7÷1,0 м.д., что свидетельствует о достаточно сильном перекрытии плоскостей рассматриваемых ароматических молекул. На рис. 5 представлена наиболее вероятная структура комплекса 1:2, полученная с использованием кривых экранирования Гейсснер—Претте и Пуллмана [22] в предположении, что в комплексе расстояние между азотистыми основаниями составляет 0,68 нм. Профлавин в этой структуре интеркалирован в (C-3'—5'-G)-сайт из большого желобка спирального участка со стороны атомов N(7) и N(4) CG-пар оснований. Интеркаляция красителя в CG-сайт подтверждается наличием кросс-пиков между протонами профлавина и внутренних нуклеозидов $H_B-H5'(G)$ и $H_X-H5(C)$ в спектре 2M-NOE (см. рис. 1). Кроме того, наблюдаются существенно большие изменения химических сдвигов протонов внутренних цитозина (C) и гуанина (G) в сравнении с протонами внешних оснований тетра nukлеотида при титровании. В процессе построения структуры комплекса рассматривались различные допустимые взаимные расположения пар оснований в месте интеркаляции для спирали в В-форме [23]. Следует отметить, что число зарегистрированных кросс-пиков между протонами красителя и тетра nukлеотида в 2M-NOE-спектре мало для однозначного определения геометрии комплекса **только по этим данным**. Кроме того, интенсивность кросс-пиков также недостаточна для надеж-

ного определения расстояния между взаимодействующими протонами. Заметим при этом, что количественная интерпретация 2M-NOE, как показали исследования Рейда и др. [24], является довольно корректной лишь при регистрации NOE-спектра с временами смещения, не превышающими 100 мс. Только в этом случае можно считать эффективные времена корреляции межпротонных векторов одинаковыми для всех взаимодействующих ядер и проводить расчет межъядерных расстояний по известной методике, исходя из начальной скорости возрастания NOE. Проведение же подобного эксперимента с малыми временами смещения для рассматриваемой молекулярной системы требует весьма больших времен накопления. Однако даже при этом вряд ли можно достигнуть требуемых для последующего расчета интенсивностей кросс-пиков, так как расстояние между ядрами красителя и тетрауклеотида в месте интеркаляции, как это видно из представленной на рис. 5 структуры 1 : 2 комплекса, достаточно велико. Необходимо также учитывать, что вследствие сложного характера комплексообразования в растворе имеются различные молекулярные ассоциаты, причем доля их существенно зависит от соотношения исходных концентраций молекул (см. рис. 4). В данной работе 2M-NOE-спектр получен при $r = 2,65$, когда относительное содержание 1 : 2 комплекса является преобладающим. Для увеличения интенсивности кросс-пиков потребовалось бы повысить концентрации красителя и соответственно тетрауклеотида, но это может затруднить интерпретацию данных вследствие большей вероятности агрегации молекул в растворе.

Анализ предельных значений химических сдвигов δ_1 (см. таблицу) для комплекса 1 : 1 профлавина с одиночной нитью тетрауклеотида дает основание полагать, что в этом комплексе краситель ориентирован по отношению к нити тетрауклеотида боковым бензольным кольцом хромофора с максимальным перекрытием плоскостей взаимодействующих ароматических молекул. Но даже при такой оптимальной с точки зрения экранирования протонов профлавина структуре комплекса индуцированные химические сдвиги протонов, оцененные по кривым экранирования [22], соответствующим расстоянию между плоскостями молекул 0,34 нм, оказываются меньше тех, которые получаются из расчетных значений δ_1 . Отсюда можно предположить, что расстояние между плоскостями оснований гуанина и цитозина в комплексе красителя с одиночной нитью будет отличаться от наблюдаемого в комплексе с двойной спиралью. Необходимое экранирование протонов достигается при расстоянии между основаниями $\sim 0,64$ нм, которое вполне вероятно вследствие большой конформационной свободы одноцепочечной последовательности нуклеотидов.

Таким образом, проведенные исследования комплексообразования тетрауклеотида 5'-d(ApCpGpT) с типичным интеркалятором профлавином позволили выявить основные характерные особенности сложного равновесия молекулярных структур в растворе и наличие в исследованной нуклеотидной последовательности сайта преимущественного связывания красителя. Можно ожидать проявления подобных характерных свойств и при взаимодействии других ароматических лигандов с короткими фрагментами нуклеиновых кислот в растворе.

Резюме

Вивчено комплексоутворення акридинового забарвника профлавіну з самокомплементарним дезокситетрарибонуклеозидтрифосфатом 5'-d(ApCpGpT) у водно-соляному розчині методом ¹H-ЯМР-спектроскопії (500 МГц). Двовірна гомоядерна ПМР-спектроскопія (2M-COSY та 2M-NOESY) використана для повного віднесення сигналів протонів молекул в розчинах і для якісного аналізу характеру взаємодії профлавіна з тетрауклеотидом. Виміряно концентраційні залежності протонних хімічних зсувів молекул. На основі запропонованих моделей комплексоутворення визначені рівноважні константи реакцій та граничні значення хімічних зсувів протонів забарвника у складі комплексу. Досліджено відносний зміст комплексів різних типів в розчині та виявлені

особливості динамічної рівноваги в залежності від співвідношення концентрацій забарвника і тетра-нуклеотида. Виходячи з приведених даних зроблено висновок про переважний зв'язок профлавіну з CG-сайтом тетра-нуклеотиду в мономірній та дуплексній формах. Побудована найбільш імовірна структура 1:2 комплексу забарвника з тетра-нуклеотидом, що базується на розрахункових значеннях індукваного хімічного зсуву протонів профлавіну і 2D-NOESY-спектру.

Summary

Complex formation between acridine dye proflavine and self-complementary deoxytetra-ribonucleoside triphosphate 5'-d(ApCpGpT) in water-salt solution has been studied by the method of one-dimensional and two-dimensional $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy (500 MHz). Two-dimensional homonuclear $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy (2D-COSY and 2D-NOESY) was used for complete assignments of proton signals of molecules in solution and for qualitative analysis of the nature of interactions of proflavine with tetranucleotide. Concentration dependences of proton chemical shifts of the molecules have been measured at 293 K. Analysis of relative content of different types of complexes has been made and special features of dynamic equilibrium have been revealed as a function of correlation of dye and tetranucleotide concentrations. Based on the obtained results a conclusion has been made about preferential intercalation of proflavine to CG-site of tetranucleotide in duplex form. The most favourable structure of 1:2 complex of dye with tetranucleotide has been constructed using calculated values of induced chemical shifts of proflavine protons and 2D-NOESY spectra.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Krugh T. R., Reinhardt C. G.* Evidence for sequence preferences in the intercalative binding of ethidium bromide to dinucleoside monophosphates // *J. Mol. Biol.*— 1975.— 97, N 1.— P. 133—162.
2. *Patel D. J., Canuel L. L.* Sequence specificity of mutagenic acid complexes in solution // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*— 1977.— 74.— P. 2624—2628.
3. ^1H and ^{31}P NMR investigations of actinomycin D binding selectivity with oligodeoxyribonucleotides containing multiple adjacent d(GC) sites / E. V. Scott, R. L. Jones, D. L. Banville et al. // *Biochemistry.*— 1988.— 27, N 3.— P. 915—923.
4. *Reid D. G., Salisbury S. A., Williams D. H.* Proton nuclear Overhauser effect study of the structure of an actinomycin D complex with a self-complementary tetranucleoside triphosphate // *Ibid.*— 1983.— 22, N 6.— P. 1377—1385.
5. *Reassessment of structural characteristics of the d(CGCG)₂: Actinomycin D complex from complete ^1H and ^{31}P NMR* / M. Delepierre, C. V. Heijenoort, J. Igolen et al. // *J. Biomol. Struct. and Dyn.*— 1988.— 7, N 3.— P. 557—589.
6. *Веселков А. Н., Дымант Л. Н., Барановский С. Ф.* Определение термодинамических параметров взаимодействия профлавіна с рибодинуклеозидмонофосфатами CpG и GpC в водном растворе по данным протонного магнитного резонанса // *Молекуляр. биология.*— 1987.— 21, № 4.— С. 1110—1116.
7. *Веселков А. Н., Дымант Л. Н., Барановский С. Ф.* Исследование взаимодействия профлавіна с изомерными дирибонуклеозидмонофосфатами CpG и GpC методом протонного магнитного резонанса // *Там же.*— 1986.— 20, № 5.— С. 1244—1250.
8. *Veselkov A. N., Karawajew L., Djimant L. N.* Proton magnetic resonance study of complex formation between proflavine and ribodinucleotide monophosphates in aqueous solution // *Stud. biophys.*— 1987.— 120, N 1.— P. 87—107.
9. *Structure of a dinucleosidephosphate-drug complex as model for nucleic acid-drug interactoin* / S. Neidle, A. Achari, G. L. Taylor et al. // *Nature.*— 1977.— 269, N 5626.— P. 304—307.
10. *Neidle S.* Structural aspects of drug-DNA complexes: molecular modelling of intercalative interactions // *Drugs Exp. Clin. Res.*— 1986.— 12, N 6/7.— P. 455—462.
11. *Albert A.* The acridines L.— New York: Edward Arnold LTD, 1966.— 604 p.
12. *Веселков А. Н., Дымант Л. Н., Куликов Э. Л.* Применение вариационных методов обработки экспериментальных данных при исследовании агрегации молекул акридиновых красителей методом ЯМР высокого разрешения // *Хим. физика.*— 1984.— 3, № 8.— С. 1101—1108.
13. *Reid B. R.* Sequence-specific assignments and their use in NMR studies of DNA structure // *Quart. Revs Biophys.*— 1987.— 20.— P. 1—34.
14. *1M- и 2M- ^1H ЯМР исследование самоассоциации дезокситетрарибонуклеозидтрифосфатов различной последовательности оснований в водном растворе* / А. Н. Веселков, Д. Дэвис, Л. Н. Дымант и др. // *Биополимеры и клетка.*— 1991.— 7, № 5.— С. 15—22.
15. *Веселков А. Н., Дымант Л. Н., Барановский С. Ф.* Термодинамические параметры самоассоциации молекул профлавіна в водном растворе // *Хим. физика.*— 1989.— 8, № 9.— С. 1282—1285.

16. Investigation of the aggregation of acridine dyes in aqueous solution by proton NMR / A. N. Veselkov, L. N. Djimant, L. S. Karawajew, E. L. Kulikov // Stud. biophys.— 1985.— 106, N 3.— P. 171—180.
17. Математическое обеспечение ЕС ЭВМ. Безусловная минимизация функций.— Минск : Изд-во ин-та математики АН БССР, 1981.— Вып. 17.— 134 с.
18. Минимизация в инженерных расчетах на ЭВМ / С. Ю. Гуснин, Г. А. Омелянов, Г. В. Резников, В. С. Сироткин.— М. : Машиностр., 1981.— 120 с.
19. ¹H-NMR studies of a monointercalating drug into a d(CpGpCpG)₂ minihelix / M. Delepierre, A. Delbarre, B. L. Déstaintot, J. Igolen // Biopolymers.— 1987.— 26, N 5.— P. 981—1000.
20. Delepierre M., Mujinh Dinh T., Roques B. P. ¹H-NMR studies of a monointercalating drug into a d(CpGpApTpCpG) minihelix // Ibid.— 1989.— 28, N 11.— P. 2097—2113.
21. Delepierre M., Mujinh Dinh T., Roques B. P. Bisintercalation of ditercalinium into a d(CpGpApTpCpG)₂ minihelix: a ¹H- and ³¹P-NMR study // Ibid.— P. 2115—2142.
22. Giessner-Prettre C., Pullman B. Quantum mechanical calculations of NMR chemical shifts in nucleic acids // Quart. Revs Biophys.— 1987.— 20.— P. 113—172.
23. Berman H. M., Neidle S., Stodola R. K. Drug-nucleic acid interactions: conformational flexibility at the intercalation site // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1978.— 75, N 2.— P. 828—832.
24. NMR distance measurements in DNA duplexes: sugars and bases have the same correlation times / B. R. Reid, K. Banks, P. Flynn, W. Nerdal // Biochemistry.— 1989.— 28, N 26.— P. 10001—10007.

Севастоп. приборостр. ин-т,
Лондон. ун-т, Беркбек колледж

Получено 01.03.91

УДК 577.3+543.51+612

Л. Ф. Суходуб

ВОЗМОЖНОСТИ МЯГКОИОНИЗАЦИОННОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ В МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

В обзоре собраны данные, демонстрирующие возможности мягкоионизационной масс-спектрометрии (МИ-МС) в молекулярно-биологических исследованиях по двум направлениям: термодинамическом и структурно-аналитическом.

Дано описание методики температурно-зависимой полевой масс-спектрометрии, с помощью которой впервые были поставлены эксперименты по измерению термодинамических характеристик ряда биологических ассоциатов: уотсон-криковские, «неправильные» и др. пары оснований, стопочные димеры оснований, комплексы «аминокислота—основание», гидраты оснований и их пар. Сделан анализ этих данных в сочетании с теорией. Показаны перспективы МИ-МС в изучении продуктов гидролиза (распада) лекарственных препаратов в физиологическом растворе и аддуктов их взаимодействия с ДНК.

Введение. Масс-спектрометрический метод исследования вещества, открытый в начале века Астоном, в настоящее время относится к разряду наиболее широко используемых аналитических методик. Его практическое применение началось с физики и химии с момента появления в 50-е годы первых промышленных образцов. Дальнейшее развитие метода позволило перейти к изучению медико-биологических и экологических объектов. В итоге в наши дни масс-спектрометрия (МС) становится неотъемлемым инструментальным методом как научно-производственных, так и академических лабораторий различного профиля. Подтверждением этому служат, например, данные о том, что в США на 1987 г. около 5000 ученых используют МС в качестве основного исследовательского инструмента и примерно 1500 из них принимают участие в ежегодных конференциях по МС и родственным направлениям, организуемым американским обществом по МС [1].

Методы мягкой ионизации в масс-спектрометрии. Разработка и внедрение мягкоионизационных (МИ) методик в МС вызвали настоящий взрыв аналитико-молекулярных исследований в биологических науках. Это обусловлено, прежде всего, возможностью проведения анализа ранее недоступных, труднолетучих, высокополярных и/или термо-

© Л. Ф. СУХОДУБ, 1991