

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

ТЕРМОДИНАМИКА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ФЕНАНТРИДИНОВОГО КРАСИТЕЛЯ БРОМИСТОГО ЭТИДИЯ С ДЕЗОКСИТЕТРАНУКЛЕОТИДОМ 5'-d(ApCpGpT)

На импульсном ЯМР спектрометре (500 МГц) исследованы температурные зависимости химических сдвигов необменивающихся протонов бромистого этидия в смеси с дезокситетрарибонуклеозидтрифосфатом 5'-d(ApCpGpT) в водном растворе. Используются оригинальные методики расчета термодинамических параметров комплексообразования, которые позволяют в условиях сложного равновесия в растворе выделить вклад в результирующее изменение энтальпии (ΔH) и энтропии (ΔS) каждой из реакций, приводящих к формированию комплексов 1:1, 2:1, 1:2 и 2:2 молекул красителя и тетрацуклеотида. Определены свободные энергии Гиббса, энтальпии и энтропии для реакций.

Введение. Ранее [1] методом одномерной и двухмерной спектроскопии ^1H -ЯМР изучено комплексообразование фенантридинового красителя бромистого этидия с самокомплементарным дезокситетрарибонуклеозидтрифосфатом 5'-d(ApCpGpT) при фиксированной температуре. На основе исследований концентрационных зависимостей химических сдвигов ядер взаимодействующих молекул и двухмерных спектров NOE определены типы образующихся в растворе комплексов, найдены их равновесные концентрации и построены наиболее вероятные структуры этих комплексов. Термодинамические исследования важны для анализа характера межмолекулярных взаимодействий в процессе связывания лигандов с олигонуклеотидными последовательностями. В недавно опубликованном обзоре [2], посвященном исследованию взаимодействия лигандов с ДНК методом ЯМР спектроскопии, отмечается, что для лучшего понимания процессов узнавания на молекулярном уровне требуется более детальное по сравнению с имеющимся в настоящее время термодинамическое описание, включающее анализ закономерностей изменения как энтальпии ΔH , так и энтропии ΔS при связывании лигандов с ДНК и коррелирующее с соответствующими структурными исследованиями.

В настоящей работе для определения термодинамических характеристик реакций комплексообразования изучены температурные зависимости химических сдвигов протонов молекул в растворе бромистого этидия и дезокситетрануклеотида 5'-d(ApCpGpT). Используются предложенные ранее [3] методики расчета термодинамических параметров комплексообразования, которые позволяют в аддитивном приближении дифференцированно оценить вклады реакций, приводящих к формированию различных типов комплексов в условиях равновесия в растворе.

Методика эксперимента. Одномерные спектры ^1H -ЯМР измерены на импульсном спектрометре «JEOL GSX 500» с резонансной частотой 500 МГц в диапазоне температур от 283 до 353 К. Двухмерные гомоядерные COSY- и NOESY-эксперименты, использованные для отнесения сигналов всех необменивающихся протонов в ПМР спектрах смешанных растворов, выполнены при фиксированной температуре $T = 298$ К на спектрометре «Bruker WHX» (600 МГц). Химические сдви-

большие изменения положения резонансных линий в спектрах с повышением температуры наблюдаются для всех необменивающихся протонов красителя, резонансы протонов тетрауклеотида испытывают значительно меньшие смещения. Существенно зависит от температуры и ширина спектральных линий, их тонкая структура отчетливо проявляется в области высоких температур. Следует отметить, что качественно аналогичный характер температурных изменений $^1\text{H-NMR}$

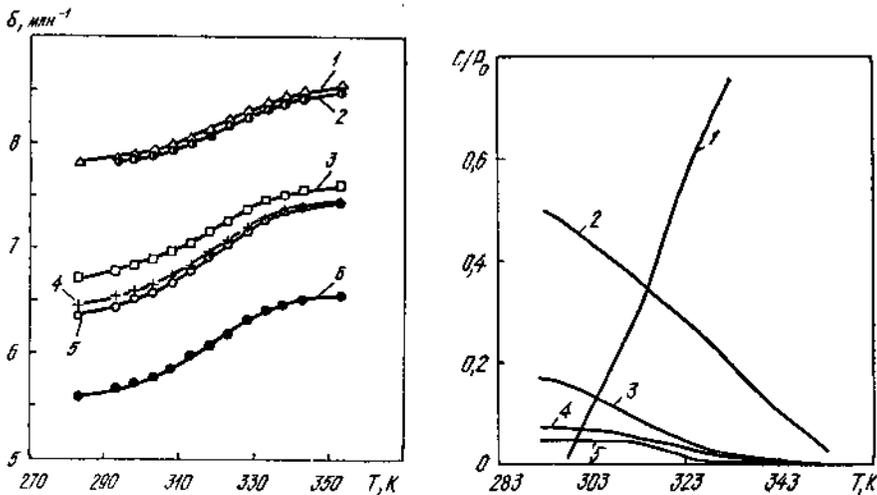


Рис. 2. Экспериментальные температурные зависимости химических сдвигов протонов бромистого этидия в растворе красителя с тетрауклеотидом 5'-d(ApCpGpT) ($D_0 = -1,23 \cdot 10^{-3}$ M, $N_0 = 2,14 \cdot 10^{-3}$ M): 1 — H1; 2 — H10; 3 — H9; 4 — H4; 5 — H2; 6 — H7

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

спектров наблюдается и в водных растворах акридинового красителя профлавина с 5'-d(ApCpGpT) в идентичных экспериментальных условиях [6].

На рис. 2 приведены температурные зависимости химических сдвигов протонов бромистого этидия в растворе с тетрауклеотидом. Обращает на себя внимание тот факт, что эти экспериментальные кривые имеют явно выраженную S-образную форму. Последнее, очевидно, обусловлено кооперативным характером распада комплексов красителя с дуплексом тетрауклеотида при повышении температуры и выходом бромистого этидия в раствор. Ранее [1] на основании концентрационных зависимостей химических сдвигов протонов молекул и спектров 2M-NOE показано, что в растворе существует равновесие различных типов комплексов красителя с тетрауклеотидом, а также мономерных и ассоциированных форм взаимодействующих молекул. При этом в растворе бромистого этидия с дезокситетрауклеотидом 5'-d(ApCpGpT) при достаточно малых концентрациях образцов ($\sim 0,5 \cdot 10^{-3}$ M) наиболее вероятными являются процессы димеризации молекул и образование комплексов 1:1, 2:1, 1:2 и 2:2. Учитывали возможность формирования комплекса 1:2 бромистого этидия с тетрауклеотидом d(ACGT), как и в случае с профлавином [6], двумя различными способами — непосредственное связывание красителя с дуплексом и образование этого комплекса в результате взаимодействия мономера тетрауклеотида с 1:1-комплексом, где бромистый этидий играет роль «скрепки». Такие «скрепочные» 1:2-комплексы бромистого этидия с d(ACGT), в отличие от профлавина, не имеют существенного значения для суммарного равновесия в растворе, что определяется достаточно низкой вероятностью их формирования из-за особенностей химической структуры фенантридинового красителя. Последнее связано с наличием в молекуле бромистого этидия достаточно объемных боко-

вых заместителей — фенольного кольца и этильной группы, расположенных в пространстве вне плоскости фенантридинового хромофора, которые создают определенные стерические препятствия для образования «скрепленного» комплекса в растворе [1].

Термодинамические параметры реакций комплексообразования оценивали на основе аддитивной модели для наблюдаемого химического сдвига. Для этого определяли зависимости мольных долей различного типа комплексов от температуры [3]:

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

где δ_{mi} , δ_{di} , δ_{1i} — δ_{4i} и $f_m(T)$, $f_d(T)$, $f_1(T)$ — $f_4(T)$ — значения химических сдвигов i -го протона бромистого этидия и равновесные мольные доли красителя при температуре T для его моно- и димерной форм, а также для указанных выше комплексов с тетрануклеотидом соответственно. В соотношении (1) предполагается, что величины δ_{mi} , δ_{di} , δ_{1i} — δ_{4i} не зависят от температуры в исследованном температурном интервале. Допустимость такого приближения показана при исследовании взаимодействия акридинового красителя профлавина с ди- и тетрануклеотидами [3, 7]. В предлагаемой модели (1) влияние температуры на значения δ учитывается тем, что мольные доли f_m , f_d и f_1 — f_4 , однозначно связанные с равновесными константами образования комплексов K_1 — K_4 , являются функцией температуры. Установление значений констант равновесия при различных температурах позволяет определить термодинамические параметры комплексообразования — энтальпию (ΔH) и энтропию (ΔS) для указанных типов комплексов. Величины ΔH и ΔS , как и в [3], рассчитывали двумя различными способами.

Способ 1. Расчетная методика предусматривает использование параметрических регрессионных уравнений для анализа зависимости мольных долей f_m , f_d , f_1 — f_4 от температуры. Подробное описание методики составления регрессионных уравнений для соответствующих типов комплексов дано в работе [3]. Вычислительный эксперимент показал, что использование регрессионных уравнений в виде многочленов 2-го и 3-го порядков относительно температуры для анализа мольных долей димеров бромистого этидия и комплексов красителя с мономером тетрануклеотида, как это делалось ранее в случае комплексообразования профлавина с дезокситетрануклеотидами [3], оказалось недостаточно эффективным для аппроксимации «явно выраженных» S -образных экспериментальных зависимостей (рис. 2). В связи с этим для мольных долей димерного комплекса красителя, а также для комплексов 1:1 и 2:1 бромистого этидия с тетрануклеотидами использовали экспоненциальные зависимости от температуры [8], что позволило получить более точную аппроксимацию экспериментальных кривых. Как и ранее [3], регрессионные уравнения конкретизировали с учетом известных мольных долей при температуре $T_1 = 298$ К, найденных в процессе исследований концентрационных зависимостей химических сдвигов взаимодействующих молекул [1]. Учитывали также тот факт, что при высоких температурах ($T_0 \approx 373$ К) практически весь краситель в растворе находится в мономерной форме, т. е. $f_m(T_0) = 1$. В результате температурная зависимость химического сдвига протонов бромистого этидия может быть представлена в форме:

$$\begin{aligned} \delta_i(T) = & f_m(T) \delta_{mi} + \left\{ f_d(T_1) \exp \left[a_d \frac{(T_1 - T)}{(T_0 - T)} \right] \right\} \delta_{di} + \\ & + \left\{ f_1(T_1) \exp \left[a_1 \frac{(T_1 - T)}{(T_0 - T)} \right] \right\} \delta_{1i} + \left\{ f_2(T_1) \varphi(T) \exp \left[a_2 \frac{(T_1 - T)}{(T_0 - T)} \right] \right\} \delta_{2i} + \\ & + \sum_{k=3,4} f_k(T_1) \frac{1 + S_k(T_1)}{1 + S_k(T)} \delta_{ki}, \quad (2) \end{aligned}$$

где a_d , a_1 , a_2 — параметры регрессионных уравнений для мольных долей димеров красителя и комплексов 1:1 и 2:1 бромистого этидия с мономером тетрауклеотида: $\varphi(T)$ — параметрическое регрессионное соотношение в виде многочлена; $S_k T = (T/\theta_k)^{b_k}$, θ_k и b_k — параметры регрессионных уравнений для мольных долей комплексов 1:2 и 2:2 бромистого этидия с дуплексом тетрауклеотида. Аппроксимирующие зависимости для $f_3(T)$ и $f_4(T)$ представлены в форме, обычно используемой для описания кооперативных переходов типа «спираль — клубок» [3]. Величина θ_k при такой записи регрессионного уравнения соответствует температуре «плавления» комплекса, т. е. температуре, при которой мольная доля данного комплекса уменьшается в два раза по сравнению с его содержанием при низких температурах (~ 273 К). Величину $f_m(T)$, входящую в уравнение (2), находили из соотношения

$$f_m(T) + f_d(T) + \sum_{k=1}^4 f_k(T) = 1. \quad (3)$$

Вычислительная процедура нахождения параметров регрессионных уравнений, основанная на минимизации квадратичного функционала невязки с использованием экспериментальных температурных зависимостей химических сдвигов различных протонов красителя, достаточно подробно описана в [3].

На рис. 3 представлены зависимости мольных долей различных типов комплексов, а также мономеров бромистого этидия от температуры. Характерно, что здесь во многом проявляются те же закономерности, которые имели место при комплексообразовании акридинового красителя профлавина с рассматриваемым тетрауклеотидом [6]. Видно, что при низких температурах краситель в основном находится в связанном состоянии. Содержание 1:1-комплексов монотонно уменьшается с повышением температуры, но остается значительным вплоть до высоких температур ($T \approx 353$ К), в то время как доля комплекса 2:1 достаточно мала во всем исследованном диапазоне температур. Бромистый этидий оказывает стабилизирующий эффект на двухспиральную структуру дезокситетрауклеотида 5'-d(ApCpGpT); характерная температура перехода $T_{пл}$ (температура «плавления») для дуплекса в растворе с бромистым этидием примерно на 16 °С превышает такую для тетрамера без лиганда [5]. Величина $T_{пл}$, определяемая непосредственно по экспериментальным зависимостям химического сдвига (рис. 2), приблизительно на 4–5 °С меньше, чем температура «плавления» комплекса 1:2 (кривая 3, рис. 3). В связи с этим важно отметить, что экспериментально наблюдаемые кривые «плавления» для подобных многокомпонентных систем имеют усредненный характер, и без соответствующего количественного анализа нельзя однозначно судить о температурной стабильности того или иного ассоциата в растворе. Как показано ранее [1, 9], относительное содержание различного вида комплексов существенно зависит не только от температуры раствора, но и от соотношения исходных концентраций красителя и тетрауклеотида, а также от последовательности нуклеотидов в тетрамере.

Равновесные константы комплексообразования $K_1 \dots K_4$ при различных температурах были 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 тетрауклеотидом d(ACGT) в растворе использовали формализм Вант-Гоффа. На рис. 4 приведены зависимости Вант-Гоффа $\ln K = f(1/T)$, по которым определяли термодинамические параметры комплексообразования молекул. Энтропию рассчитывали из свободной энергии Гиббса $\Delta G = -RT \ln K$ и энтальпии:

$$\Delta S = -(\Delta G - \Delta H)/T. \quad (4)$$

Полученные значения свободной энергии, энтальпии и энтропии реакций бромистого этидия с тетра nukлеотидом 5'-d(ApCpGpT) в водном растворе приведены в таблице.

Способ 2. Данная методика определения термодинамических параметров комплексообразования молекул предусматривает использование соотношения для наблюдаемого химического сдвига протонов красителя в растворе с тетра nukлеотидом 5'-d(ApCpGpT) при фиксированной температуре T [1]:

$$\delta_i = D/D_0 (\delta_{mi} + 2K_d D \delta_{di} + K_1 N \delta_{1i} + 2K_1 K_2 D N \delta_{2i} + K_T K_3 N^2 \delta_{3i} + 2K_T K_3 K_4 D N^2 \delta_{4i}), \quad (5)$$

где K_d , K_T — константы димеризации; D , N — концентрации мономеров красителя и тетра nukлеотида соответственно; D_0 — исходная молярная концентрация красителя. Константы реакций комплексообразования $K_1 - K_4$, а также реакций димеризации красителя K_d и тетрамера K_T , входящие в (5), определяются через соответствующие термодинамические параметры ΔH и ΔS согласно соотношению

$$K(T) = \exp\left(\frac{\Delta S^0}{R} - \frac{\Delta H^0}{RT}\right) \quad (6)$$

в предположении, что величины H^0_a , S^0_a не зависят существенно образом от температуры в исследованном диапазоне температур. Термодинамические параметры самоассоциации бромистого этидия ΔH^0_d , ΔS^0_d и тетра nukлеотида ΔH^0_T , ΔS^0_T были найдены ранее [5, 10] при изучении температурных зависимостей химических сдвигов молекул в аналогичных экспериментальных условиях. Таким образом, если учесть известные значения δ_m , δ_d , $\delta_1 - \delta_4$ [1, 4], то наблюдаемый химический сдвиг в соотношении (5) является функцией восьми параметров ΔH^0_j , ΔS^0_j ($j=1-4$). Минимизация функции невязки экспериментальных и

Термодинамические параметры ΔG (ккал/моль), ΔH (ккал/моль) и ΔS (ккал/моль $^{-1}$ ·K $^{-1}$) реакций образования комплексов бромистого этидия с дезокситетрануклеотидом 5'-d(ApCpGpT) в водном растворе

Комплекс	Химическая реакция*	Способ расчета		
		1-й		
		ΔG (298 K)	ΔH	ΔS (298 K)
1:1	$D + N \xrightleftharpoons{k_1} DN$	-(6,60 ± 0,15)	-(22,7 ± 3,8)	-(54,0 ± 9,2)
2:1	$D + DN \xrightleftharpoons{k_2} D_2N$	-(5,89 ± 0,1)	-(20,5 ± 5,2)	-(49,0 ± 12,4)
1:2	$D + N_2 \xrightleftharpoons{k_3} DN_2$	-(6,94 ± 0,04)	-(16,0 ± 2,0)	-(30,4 ± 3,9)
2:2	$D + DN_2 \xrightleftharpoons{k_4} D_2N_2$	-(6,29 ± 0,08)	-(29,7 ± 2,3)	-(78,6 ± 6,3)

Комплекс	Химическая реакция*	Способ расчета	
		2-й	
		ΔH^0	ΔS^0
1:1	$D + N \xrightleftharpoons{k_1} DN$	-(26,4 ± 3,5)	-(65,6 ± 9,8)
2:1	$D + DN \xrightleftharpoons{k_2} D_2N$	-(22,5 ± 3,6)	-(54,0 ± 9,7)
1:2	$D + N_2 \xrightleftharpoons{k_3} DN_2$	-(18,9 ± 3,0)	-(40,0 ± 8,0)
2:2	$D + DN_2 \xrightleftharpoons{k_4} D_2N_2$	-(27,6 ± 5,2)	-(72,0 ± 14,0)

* D — молекула бромистого этидия; N и N_2 — однонитчатая (мономерная) и двухнитчатая (дуплексная) формы тетра nukлеотида.

расчетных значений δ позволяет установить оптимальные значения термодинамических параметров реакций образования комплексов в растворе. Важно отметить, что термодинамические параметры, найденные двумя различными способами, в пределах погрешности их определения хорошо согласуются.

Из таблицы видно, что все рассматриваемые реакции комплексообразования бромистого этидия с дезокситетрануклеотидом 5'-d(ApCpGpT) являются экзотермическими. Последнее характерно для процессов агрегации, включающих в себя стэкинг-взаимодействие систем с делокализованными π -электронами [11]. Сравнение термодинамических параметров комплексообразования бромистого этидия и акридинового красителя профлавина с d(ACGT) [6] при одинаковых условиях показывает, что образование комплексов 1:1 и 2:1 этих красителей с мономером тетрануклеотида характеризуется близкими значениями ΔH и ΔS , в то время как при связывании бромистого

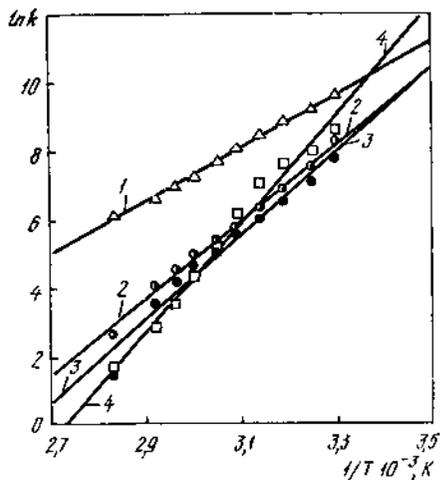


Рис. 4. Зависимость $\ln K$ от $1/T$ для реакций комплексообразования бромистого этидия с тетрануклеотидом 5'-d(ApCpGpT): 1 — комплекс 1:2; 2 — 1:1; 3 — 2:1; 4 — 2:2

этидия с дуплексом тетрамера величины энтальпии и энтропии оказываются существенно более отрицательными, чем в случае профлавина. В целом термодинамические параметры реакций взаимодействий ароматического лиганда с олигонуклеотидами могут определяться следующими факторами [12]:

1) молекулярными взаимодействиями (водородными связями — H-связи, гидрофобными, ван-дер-ваальсовыми и электростатическими);

2) конформационными изменениями в тетрануклеотиде и красителе;

3) изменением гидратации, высвобождением иона или протона при взаимодействии молекул.

К сожалению, в литературе нет единого мнения о величине вклада в измеряемые термодинамические параметры каждого из рассмотренных выше факторов. Считается, что комплексообразование ароматических молекул происходит, главным образом, в результате дисперсионных ван-дер-ваальсовых взаимодействий, которые характеризуются отрицательными энтальпией и энтропией [13]. Сравнение структур 1:2-комплексов фенантридинового и акридинового красителей с рассматриваемым дезокситетрануклеотидом [1, 6] свидетельствует о существенно большем взаимном перекрывании фенантридинового хромофора с плоскостями ароматических азотистых оснований в месте интеркаляции, что предполагает большую роль дисперсионных сил при комплексообразовании бромистого этидия, чем акридинового красителя профлавина. Следовательно, можно полагать, что основной вклад в отрицательные значения термодинамических параметров комплексообразования бромистого этидия с дезокситетрануклеотидом 5'-d(ACGT) вносят дисперсионные силы.

Вместе с тем, при комплексообразовании возможны такие процессы, которые вносят положительный вклад в суммарное изменение энтальпии и энтропии [14]:

а) раздвижение находящихся в состоянии стэкинг-взаимодействия пар оснований в дуплексе с образованием полости для встраивающейся молекулы;

- б) изменение сольватной оболочки при образовании комплекса;
- в) изменение конформации лиганда при связывании с олигонуклеотидным дуплексом.

Положительный энтропийный вклад, прежде всего, определяется гидрофобными взаимодействиями, связанными с переносом молекулы красителя в место интеркаляции. Термодинамический анализ комплексообразования интеркалирующих лигандов — производных эллиптицина с ДНК [15] свидетельствует об определяющей роли гидрофобных взаимодействий в сравнении с другими видами взаимодействий, включая электростатические. В случае коротких олигонуклеотидов, когда в растворе существует сложное равновесие молекулярных ассоциатов, влияние тех или иных сил при формировании комплексов лиганда с одно- и двухцепочечными последовательностями может быть существенно различным. Значительный вклад гидрофобных взаимодействий наблюдается в случае реакции образования комплексов 1 : 2 профлавина с дуплексом дезокситетрануклеотида d(ACGT) [6], характеризующейся положительным изменением энтропии. Что же касается формирования комплекса 1 : 2 бромистого этидия с d(ACGT), то здесь изменение энтропии имеет достаточно большое отрицательное значение, но оно все же заметно меньше по абсолютной величине, чем ΔS для других типов комплексов лиганда с этим тетрамером. Это позволяет предположить, что гидрофобные взаимодействия также играют довольно значительную роль при формировании 1 : 2-комплексов бромистого этидия с тетрауклеотидом в растворе. Безусловно, в 1 : 2-комплексе бромистого этидия с d(ACGT) существенный вклад в отрицательное значение ΔS может вносить возрастание жесткости спиральной структуры при встраивании молекулы красителя [16]. Энтропия при этом уменьшается вследствие ограничения числа возможных конформационных состояний [17]. В случае же 2 : 2-комплекса, когда две молекулы лиганда присоединяются к дуплексу тетрауклеотида, довольно большие отрицательные значения ΔH и ΔS по сравнению с 1 : 2-комплексом косвенно подтверждают высказанное в [1] предположение о наиболее вероятном присоединении второй молекулы бромистого этидия к 1 : 2-комплексу снаружи за счет вертикального стэкинга к концевым парам оснований. Такой процесс комплексообразования не требует раздвижения оснований в тетрауклеотиде, что привело бы к ослаблению дисперсионных взаимодействий и к соответствующему увеличению энтропии и энтропии. По-видимому, при формировании этого комплекса влияние фактора, связанного с увеличением жесткости спиральной структуры, может так же, как и в 1 : 2-комплексе, играть существенную роль и определять (дополнительно к дисперсионным взаимодействиям) отрицательное изменение энтропии.

Авторы благодарны Объединенному исследовательскому центру Лондонского университета за предоставленную возможность использовать для измерений ЯМР-спектрометры 500 и 600 МГц в Беркбек и Куни Мэри колледжах.

Проведенные исследования частично финансировались Грантом N UD 7000 Международного научного фонда.

О. Н. Веселков, Л. М. Дилант, П. О. Бологин, С. Ф. Барановский, Д. Девис

ТЕРМОДИНАМІКА ВЗАЄМОДІЇ ФЕНАНТРИДИНОВОГО БАРВНИКА БРОМИСТОГО ЕТИДІЮ З ДЕЗОКСИТЕТРАНУКЛЕОТИДОМ 5'-d(ApCpGpT)

Резюме

На імпульсному ЯМР спектрометрі (500 МГц) досліджено температурні залежності хімічних зсувів протонів, що не обмінюються, бромистого етидію в суміші з дезокси-тетрарибонуклеозидтрифосфатом 5'-d(ApCpGpT) у водному розчині. Використано оригінальні методики розрахунку термодинамічних параметрів комплексоутворення, які дозволяють за умов складної рівноваги у розчині вирішити внесок у результуючу

зміну ентальпії (ΔH) і ентропії (ΔS) кожної з реакцій, які призводять до формування комплексів 1:1, 2:1, 1:2 і 2:2 молекул барвника і тетрануклеотиду. Визначено вільні енергії Гіббса, ентальпії і ентропії для цих реакцій.

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

THERMODYNAMICS OF PHENANTRIDINIUM DYE ETHIDIUM BROMIDE INTERACTION WITH DEOXYTETRANUCLEOTIDE 5'-d(ApCpGpT)

Summary

Temperature dependences of the chemical shifts of non-exchangeable ethidium bromide protons in a mixture with the deoxytetranucleoside triphosphate 5'-d(ApCpGpT) in aqueous solution have been investigated with a pulsed n. m. r. spectrometer (500 MHz). Original methods of calculation of thermodynamic parameters of complexing, which gives an opportunity to get individual contributions of each reaction leading to the formation of 1:1, 1:2, 2:1 and 2:2 complexes of dye and tetranucleotide molecules in conditions of the composite equilibrium in solution, have been used. The free Gibbs energies, enthalpies and entropies of these reactions have been determined.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Veselkov A. N., Djimant L. N., Bolotin P. A. и др.* Исследование взаимодействия бромистого этидия с самокомплементарным дезокситетрануклеотидом 5'-d(ApCpGpT) в водном растворе методом ^1H -ЯМР спектроскопии // Биополимеры и клетка.— 1995.— 11, № 3—4.— С. 42—54.
2. *Searle M. S.* NMR studies of drug-DNA interactions // *Progr. NMR Spectr.*— 1993.— 25.— P. 403—480.
3. *Davies D. B., Djimant L. N., Veselkov A. N.* ^1H NMR thermodynamical analysis of the interactions of proflavine with self-complementary deoxytetranucleotides of different base sequence // *Nucleosides and Nucleotides.*— 1994.— 13, N 1—3.
4. *Veselkov A. N., Djimant L. N., Baranovskiy S. Ф. и др.* Исследование самоассоциации бромистого этидия в водном растворе методом ^1H -ЯМР спектроскопии // *Хим. физика.*— 1994.— 13, № 11.— С. 72—80.
5. *Veselkov A. N., Дэвис Д., Дымант Л. Н. и др.* 1M- и 2M- ^1H -ЯМР исследование самоассоциации дезокситетрануклеозидтрифосфатов различной последовательности оснований в водном растворе // *Биополимеры и клетка.*— 1991.— 7, № 5.
6. *Дымант Л. Н., Веселков А. Н.* Термодинамика взаимодействия акридинового красителя профлафина с дезокситетрануклеотидом 5'-d(ApCpGpT) // *Хим. физика.*— 1992.— 11, № 7.— С. 921—927.
7. *Veselkov A. N., Djimant L. N., Baranovskiy S. Ф.* Определение термодинамических параметров взаимодействия профлафина с дирибонуклеозидмонофосфатами CpC и CpG в водном растворе по данным протонного магнитного резонанса // *Молекуляр. биология.*— 1987.— 21, № 4.— С. 1110—1116.
8. *Евсеев А. М., Николаева Л. С.* Математическое моделирование химических равновесий.— М.: Изд-во МГУ, 1988.— 192 с.
9. *Davies D. B., Djimant L. N., Veselkov A. N.* ^1H NMR structural analysis of the interactions of proflavine with self-complementary deoxytetranucleosides of different base sequence // *Nucleosides and Nucleotides.*— 1994.— 13, N 1—3.— P. 637.
10. *Veselkov A. N., Djimant L. N., Завьялова О. С. и др.* Термодинамические параметры самоассоциации молекул бромистого этидия в растворе // *Хим. физика.*— 1994.— 13, № 12.— С. 161—164.
11. *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.
12. *Charles J. B.* Thermodynamics of the daunomycin DNA interaction: ionic strength dependence of the enthalpy and entropy // *Biopolymers.*— 1985.— 24.— P. 403—419.
13. *Ross P. D., Subramanian S.* Thermodynamics of protein association reaction: forces contributing to stability // *Biochemistry.*— 1981.— 20.— P. 3096—3102.
14. *Hopkins H. P., Fumero J., Wilson W. D.* Temperature dependence of enthalpy changes for ethidium and propidium binding to DNA // *Biopolymers.*— 1990.— 29.— P. 445—459.
15. *Schwaller M. A., Dodin G., Aubard J.* Thermodynamics of drug-DNA interactions: Entropy-driven intercalation and enthalpy-driven outside binding in the ellipticine series // *Ibid.*— 1991.— 31.— P. 519—527.
16. *Reinert K. E.* Antracycline binding induced DNA stiffening, binding and elongation. Stereochemical implications from viscometric investigation // *Nucl. Acids Res.*— 1983.— 11.— P. 3411—3430.
17. *Sturtevant J. M.* Heat capacity and entropy changes in processes involving proteins // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*— 1977.— 74.— P. 2236—2240.

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

Получено 02.03.95