

Исследование комплексообразования бромистого этидия с одноцепочечным некомплементарным дезокситетрануклеотидом 5'-d(CpGpApA) в водном растворе методом ^1H -ЯМР спектроскопии

А. Н. Веселков*, С. Ф. Барановский, Л. Н. Дымант, Н. В. Петренко,
С. Г. Осетров, А. Такер¹, Д. Дэвис¹

Севастопольский Государственный техн. университет Министерства образования Украины
335053, Севастополь, Студгородок

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

Методом одно- и двухмерной ^1H -ЯМР спектроскопии (500 и 600 МГц) изучено комплексообразование в водно-солевом растворе красителя бромистого этидия (3,8-диамино-6-фенил-5-этил-фенантридин) с одноцепочечным некомплементарным дезокситетрануклеотидом 5'-d(CpGpApA). Измерены концентрационные зависимости химических сдвигов протонов взаимодействующих молекул при различных температурах ($T_1 = 298\text{ K}$ и $T_2 = 308\text{ K}$). Исследования самоассоциации тетрауклеотида показали малую вероятность образования дуплексов в растворе. В связи с этим в растворе основную роль играют комплексы красителя с одиночной нитью тетрауклеотида, что дает возможность проанализировать специфику взаимодействия ароматического лиганда с одноцепочечной ДНК. Рассмотрены различные схемы комплексообразования, определены равновесные константы и предельные значения химических сдвигов протонов бромистого этидия в комплексах. Сделан анализ относительного содержания комплексов различного типа и выявлены особенности динамического равновесия в зависимости от соотношения концентраций красителя и тетрауклеотида. На основе полученных данных сделан вывод о существовании сиквенс-специфичности связывания бромистого этидия с одноцепочечной нуклеотидной последовательностью. По расчетным значениям индуцированных химических сдвигов протонов красителя построены наиболее вероятные структуры комплексов 1:1 бромистого этидия с одиночной нитью дезокситетрануклеотида, соответствующие двум возможным типам встраивания красителя между основаниями цитозина и гуанина — с диаметрально противоположных сторон фенантридинового хромофора.

Введение. Избирательность комплексообразования лигандов с одноцепочечными последовательностями нуклеиновых кислот может играть важную роль в функционировании биологически активных веществ, в частности, в процессах транскрипции и репликации ДНК. Известно, что в некоторых бактериофагах молекула ДНК существует в виде одноцепочечной структуры [1]. Результаты экспериментальных исследований свидетельствуют о

*Correspondence address.

© А. Н. ВЕСЕЛКОВ, С. Ф. БАРАНОВСКИЙ, Л. Н. ДЫМАНТ, Н. В. ПЕТРЕНКО,
С. Г. ОСЕТРОВ, А. ТАКЕР, Д. ДЭВИС, 1996

высоком сродстве и избирательном связывании антибиотика актиномицина D [2, 3], акридинового красителя профлавина [4] и фенантридинового красителя бромистого этидия [5—7] с одноцепочечными дезоксирибонуклеотидами. Ароматические лиганды проявляют селективность взаимодействия и с одноцепочечной РНК. Так, недавно показано [8], что интеркалятор димид нафталина, к которому присоединены две молекулы тимидина, преимущественно связывается с одноцепочечной поли-А. Наблюдаемая селективность связывания, по мнению авторов, является результатом образования специфических водородных связей между основаниями аденина и тимина. Экспериментально установлено, что специфичность связывания ароматических лигандов с нативной ДНК проявляется уже на коротких самокомплементарных олигонуклеотидах, включающих в себя соответствующий участок [4—7, 9, 10]. Следовательно, можно ожидать, что необходимые энергетические и структурные характеристики комплексов лигандов с однонитчатой ДНК в растворе могут быть выявлены путем изучения их взаимодействия с малыми фрагментами одноцепочечных нуклеиновых кислот — некомплементарными олигонуклеотидами заданной последовательности оснований. В настоящей работе методом одномерной и двухмерной ^1H -ЯМР спектроскопии (500 и 600 МГц) проведено исследование взаимодействия бромистого этидия с некомплементарным дезокситетрарибонуклеозидтрифосфатом 5'-d(CpGpApA) в водном растворе. Такой тетрануклеотид содержит пиримидин-пуриновую d(C-G) последовательность, к которой бромистый этидий проявляет сиквенс-специфичность взаимодействия в дуплексе [5—7]. Вместе с тем специфика связывания может существенно изменяться при взаимодействии красителя с мономерными формами олигонуклеотидов [4]. Проведенный нами анализ комплексообразования бромистого этидия с самокомплементарными дезокситетрануклеотидами различной последовательности оснований в цепи [5—7] свидетельствует о достаточно высоких значениях равновесных констант образования комплексов 1:1 красителя с мономерами тетрануклеотидов в растворе. В связи с этим важным представляется непосредственное исследование комплексообразования красителя с однонитчатыми некомплементарными дезокситетрануклеотидами в идентичных экспериментальных условиях. Для получения наиболее полной информации о характере избирательного связывания лиганда с одноцепочечной нуклеотидной последовательностью целесообразно проведение подобных исследований со всевозможными комбинациями азотистых оснований в коротких некомплементарных олигонуклеотидах.

Материалы и методы. Бромистый этидий (рис. 1) фирмы «Sigma» (США) растворяли в D_2O с изотопной чистотой 99,95 % D («Sigma») и лиофилизировали. Затем взвешенное количество лиганда растворяли в дейтерированном 0,1 М фосфатном буфере (pD = 7,15). Концентрацию красителя

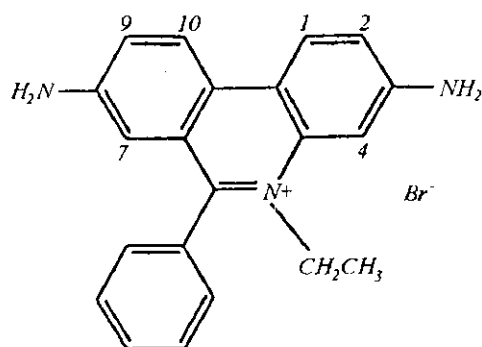


Рис. 1. Структурная формула катиона этидия (3,8-диамино-6-фенил-5-этил-фенантридин) с указанием необмениваемых протонов красителя

определяли спектрофотометрически: для бромистого этидия коэффициент экстинкции $\varepsilon = 5860 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ($\lambda = 480 \text{ nm}$) [11]. Дезокситетрарибонуклеозидтрифосфат 5'-d(CpGpApA) синтезирован компанией «Oswel DNA Service» (Великобритания). Образец также лиофилизовали из D_2O и растворяли в дейтерированном 0,1 М фосфатном буфере.

Одномерные спектры ^1H -ЯМР измерены на импульсном спектрометре «JEOL GSX 500» с резонансной частотой 500 МГц. Концентрационные измерения протонных химических сдвигов молекул выполнены при двух температурах $T_1 = 298 \text{ K}$ и $T_2 = 308 \text{ K}$ в интервале концентраций от 3,1 ммоль до 0,1 ммоль тетрауклеотида и при постоянной концентрации бромистого этидия ($C_0 = 1,15 \text{ ммоль}$) в растворе. Двухмерные гомоядерные TOCSY- и NOESY-эксперименты, использованные для отнесения сигналов необменивающихся протонов молекул и качественного определения характера комплексообразования красителя с олигонуклеотидом, выполнены на спектрометре «Bruker AMX» (600 МГц). Методика проведения эксперимента достаточно подробно описана в [12]. Одномерные и двухмерные спектры измеряли в стандартных ампулах с внешним диаметром 5 мм, минимальный объем раствора 5 мл. Химический сдвиг определяли относительно ДСС (2,2-диметил-2-силапентан-5-сульфокислота), в качестве внутреннего стандарта использовали ТМА (бромистый тетраметиламмоний).

Результаты и обсуждение Предварительно выполненные отнесения сигналов протонов дезокситетрануклеотида d(CGAA) [12], а также протонов бромистого этидия [13] позволили отождествить спектры смешанных растворов и выявить в спектрах 2M-NOESY возможные связи ядер молекулы красителя и тетрауклеотида. Отметим, что положение резонансов протонов в суммарном спектре достаточно надежно определяется по характеру изменения интенсивности сигналов в процессе титрования при постоянной концентрации красителя. На рис. 2 представлен спектр 2M-NOE (600 МГц) раствора бромистого этидия с тетрауклеотидом d(CGAA), полученный при времени смешивания $\tau_m = 200 \text{ мс}$. Существенно, что в

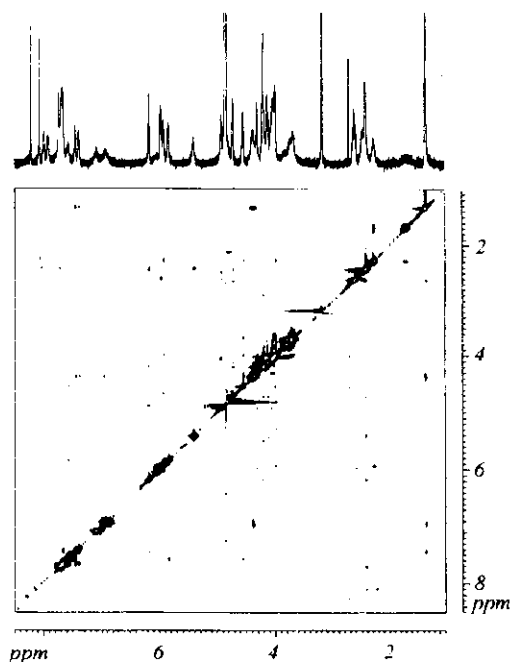


Рис. 2. 2M-NOE-спектр (600 МГц, $\tau_m = 200 \text{ мс}$) раствора бромистого этидия с дезокситетрануклеотидом 5'-d(CpGpApA) при исходных концентрациях красителя $D_0 = 1,15 \cdot 10^{-3} \text{ моль/л}$ и тетрауклеотида $N_0 = 1,66 \cdot 10^{-3} \text{ моль/л}$ ($T = 298 \text{ K}$)

2M-NOE-спектре при указанных условиях проведения эксперимента не наблюдаются межмолекулярные кросс-пики между протонами бромистого этидия и тетрауклеотида. Отсутствие, а точнее, пренебрежимо малая интенсивность кросс-пигов между протонами красителя и дезокситетрануклеотида может быть обусловлено следующими причинами: относительно большими расстояниями между протонами красителя и некомплементарного тетрауклеотида в месте связывания лиганда, а также сложным динамическим равновесием взаимодействующих молекул и их комплексов, приводящим к относительно малому процентному содержанию любого типа комплекса, образующегося в растворе.

Измеренные концентрационные зависимости химических сдвигов бромистого этидия в смешанном растворе приведены на рис. 3. Качественный анализ кривых свидетельствует о разном характере изменения химических сдвигов протонов красителя в растворе с некомплементарным дезокситетрануклеотидом по сравнению с самокомплементарными дезокситетрануклеотидами в тех же экспериментальных условиях [5—7]. В случае комплексообразования красителя с самокомплементарными дезокситетрануклеотидами, которые при низких температурах с большей вероятностью образуют в растворе дуплексные структуры [14], наблюдается существенное уменьшение наклона концентрационных зависимостей при отношении исходных концентраций дуплекса и лиганда $r = N_2/D_0 \geq 1$, что предполагает формирование преимущественно комплекса 1:2 одной молекулы красителя с двумя нитями тетрауклеотида [5—7]. Однако для комплекса бромистого этидия с некомплементарным дезокситетрануклеотидом d(CGAA) эксперимент свидетельствует о монотонном падении протонных химических сдвигов красителя при увеличении концентрации тетрауклеотида в растворе во всем исследованном диапазоне концентраций как при $T_1 = 298$ К, так и при $T_2 = 308$ К (см. рис. 3). Последнее, по-видимому, объясняется тем, что комплексы бромистого этидия с одноцепочечным некомплементарным дезокситетрануклеотидом обладают существенно большими степенями свободы в сравнении с таковыми с двухспиральными последовательностями самокомплементарных тетрауклеотидов. Для количественного анализа взаимодействия красителя с некомплементарным дезокситетрануклеотидом рассмотрена следующая схема молекулярных ассоциатов в растворе:

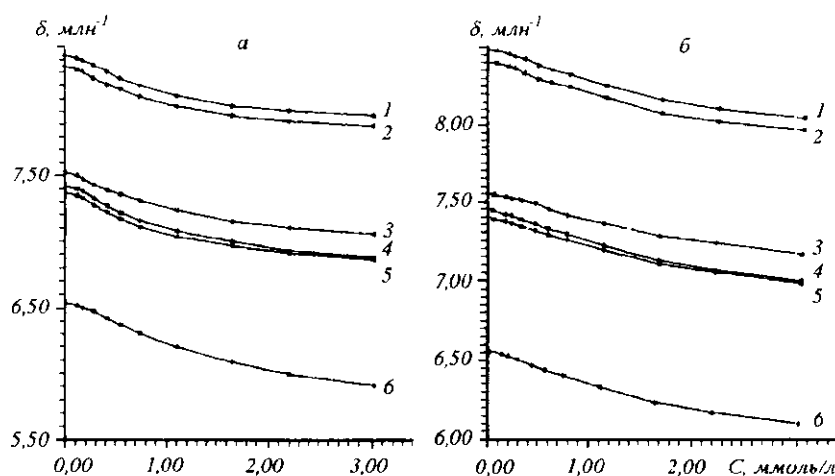
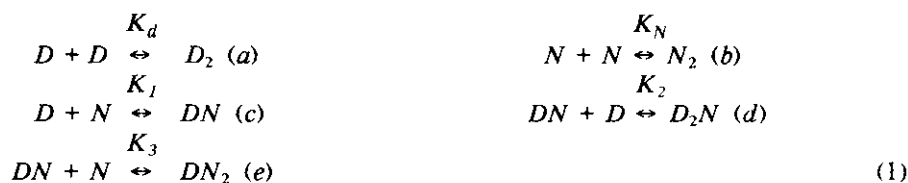


Рис. 3. Зависимости химических сдвигов протонов бромистого этидия от концентрации тетрауклеотида при постоянной концентрации бромистого этидия $D_0 = 1,15 \cdot 10^{-3}$ моль/л, $T_1 = 298$ К (а) и $T_2 = 308$ К (б): 1 — Н1; 2 — Н10; 3 — Н9; 4 — Н4; 5 — Н2; 6 — Н7



В предлагаемой схеме учтено, что в растворе имеет место равновесие взаимодействующих молекул, включающее в себя различные процессы образования комплексов красителя с тетрамером, а также реакции самоассоциации молекул. Ранее показано [12], что равновесная константа самоассоциации некомплементарного тетрануклеотида d(CGAA) ($K_N = 23,4 \pm 6,8$ л/моль) существенно меньше таковой для самокомплементарных дезокситетрануклеотидов [14]. Оценки показывают, что в этом случае можно пренебречь реакцией образования комплекса 1:2 путем непосредственного связывания красителя (D) с тетрануклеотидным дуплексом (N_2), которая является определяющей при связывании бромистого этидия с самокомплементарными дезокситетрануклеотидами [5—7]. Вместе с тем в расчетной схеме предусмотрена возможность образования 1:2-комплекса DN_2 за счет взаимодействия мономера тетрануклеотида с 1:1-комплексом DN (реакция 1e), где бромистый этидий играет роль «скрепки» [5—7]. Несмотря на то, что при комплексообразовании красителя с некомплементарным тетрануклеотидом наиболее значимыми являются комплексы 1:1 и 2:1 красителя с мономерными нуклеотидными последовательностями, расчет по моделям, в которых пренебрегали реакцией (1e) образования 1:2 комплекса через «скрепку», не приводил к удовлетворительным результатам. Что касается самоассоциации бромистого этидия, то при использованных в эксперименте концентрациях красителя можно ограничиться процессом димеризации молекул. Применительно к условиям эксперимента константа димеризации K_d с учетом ее зависимости от температуры принята равной 149 л/моль при $T_1 = 298$ К и $K_d = 114$ л/моль при $T_2 = 308$ К [13]. Химические сдвиги рассчитывали с использованием аддитивной модели:

$$\delta = D/D_0(\delta_m + 2K_dD\delta_d + K_1N\delta_1 + 2K_1K_3ND\delta_2 + K_1K_2N^2\delta_3). \quad (2)$$

Здесь D_0, N_0 — исходные молярные концентрации красителя и тетрануклеотида; D и N — равновесные молярные концентрации мономеров бромистого этидия и тетрануклеотида соответственно; $\delta_m, \delta_d, \delta_1, \delta_2, \delta_3$ — протонные химические сдвиги молекулы красителя в мономерной и димерной формах и в составе комплексов 1:1 (DN), 2:1 (D_2N) и 1:2 (DN_2) соответственно.

Величины δ_m и δ_d определены ранее [13] при исследовании самоассоциации бромистого этидия исходя из концентрационных зависимостей протонных химических сдвигов красителя в тех же экспериментальных условиях. Тогда наблюдаемый химический сдвиг δ является функцией неизвестных $\delta_1 \div \delta_3, K_1 \div K_3$. Такую многопараметрическую задачу целесообразно решать методом последовательного усложнения модели [5—7]: в качестве первоначального приближения использовали четырехпараметрическую модель, включающую в себя реакции самоассоциации молекул и комплексообразования красителя с мономером дезокситетрануклеотида (реакции a—d системы уравнений (1)). В следующей расчетной схеме дополнительно учтена равновесная реакция 1(e) формирования 1:2-комплекса через «скрепку». В процессе расчетов были также проанализированы другие схемы образования комплексов в растворе, учитывающие, например, дополнительное формирование комплексов 1:2 и 2:2 путем непосредственного связывания одной и двух молекул красителя с дуплексом тетрануклеотида. Однако вклад дополнительных реакций в суммарное равновесие в растворе оказался

пренебрежимо мал и в дальнейшем не учитывался при анализе процессов комплексообразования. Вычислительная процедура нахождения параметров модели, основанная на минимизации квадратичного функционала невязки с использованием экспериментальных концентрационных зависимостей химических сдвигов различных протонов красителя, достаточно подробно

Расчетные значения параметров (δ , млн^{-1} и K , 10^3 л/моль) комплексообразования бромистого этидия с 5'-d(CpGrArA) в водном растворе при $\text{pD} = 7,15$

Протон	δ_1	δ_2	δ_3	δ_m	K_1	K_2	K_3
T = 298 K							
H1	7,87	8,19	7,97	8,69	—	—	—
H10	7,90	8,06	7,87	8,63	—	—	—
H9	7,01	7,31	7,04	7,66	(20,0±1,9)	(11,3±2,1)	(6,6±1,8)
H4	6,84	7,18	6,86	7,55	—	—	—
H2	6,71	7,15	6,90	7,48	—	—	—
H7	5,96	6,35	5,85	6,67	—	—	—
T = 308 K							
H1	8,17	8,27	8,06	8,69	—	—	—
H10	8,04	8,08	8,00	8,63	—	—	—
H9	7,20	7,46	6,99	7,66	(11,5±1,0)	(4,1±1,3)	(3,3±1,2)
H4	7,11	7,33	6,95	7,55	—	—	—
H2	7,09	7,29	6,90	7,48	—	—	—
H7	6,26	6,41	6,09	6,67	—	—	—

описана в [15]. Сравнение рассчитанных равновесных констант образования комплексов 1:1, 2:1 и 1:2 бромистого этидия с некомплементарным дезокси-тетрануклеотидом d(CGAA) (таблица) со значениями констант $K_1 \div K_3$ для подобных комплексов этого красителя с самокомплементарными тетрануклеотидами [5—7] показывает их качественное отличие. Прежде всего обращает на себя внимание тот факт, что константа K_1 образования 1:1-комплекса бромистого этидия существенно больше значения K_3 связывания красителя с димером некомплементарного тетрануклеотида ($K_1 > K_3$). В случае комплексообразования бромистого этидия с самокомплементарными дезокситетрануклеотидами наблюдается обратная картина, когда $K_3 > K_1$, т. е. вероятность связывания красителя с дуплексом заметно выше, чем с одиночной нитью тетрамеров [5—7]. Следует отметить, что возможность специфического спаривания оснований при скольжении нитей некомплементарного дезокситетрануклеотида d(CGAA) одна относительно другой [12], по-видимому, сказывается на величине равновесной константы K_3 связывания красителя с димерной нуклеотидной последовательностью. Численные значения равновесных констант K_1 для реакций комплексообразования бромистого этидия с мономерами самокомплементарных дезокситетрануклеотидов [5—7] оказываются одного порядка с величиной K_1 для некомплементарного тетрануклеотида d(CGAA). Вместе с тем сравнительный анализ значений K_1 для исследованных тетрамеров показывает их существенную зависимость от нуклеотидной последовательности. Так, равновесная константа образования 1:1-комплекса бромистого этидия с d(ACGT) [6] примерно в три раза превышает величину K_1 для тетрамера

$d(CGAA)$ при одинаковых условиях эксперимента ($T = 298$ К, $0,1$ М фосфатный буфер). Этот результат свидетельствует о существовании сиквенс-специфичности при связывании ароматического лиганда бромистого этидия с одноцепочечными олигонуклеотидными последовательностями. Из данных таблицы видно, что равновесная константа $K_2 > K_1$, т. е. связывание второй молекулы бромистого этидия с одиночной нитью тетра-нуклеотида имеет антикооперативный характер. Подобная картина наблюдалась и при комплексообразовании красителя с мономерами самокомплементарных дезокситетрануклеотидов различной последовательности оснований в цепи [5—7]. Повышение температуры (см. таблицу) закономерно приводит к уменьшению равновесных констант комплексообразования бромистого этидия как с мономерной, так и с димерной формами дезокситетрануклеотида $d(CGAA)$ и к сравнительно небольшому изменению δ_i ($i = 1, 2, 3$). Таким образом, увеличение температуры от $T_1 = 298$ К до $T_2 = 308$ К не оказывает значительного влияния на величины предельных химических сдвигов красителя в составе комплексов, т. е. параметров, которые используются для анализа молекулярных структур. Знание равновесных констант образования комплексов при двух температурах позволяет оценить энтальпии комплексообразования молекул, используя соотношение Вант-Гоффа:

$$[d(\ln K)/d(1/T)] = -\Delta H/R. \quad (3)$$

Оценки показывают, что для комплексов 1:1 и 2:1 красителя с мономером тетра-нуклеотида $d(CGAA)$ энтальпии равны $\Delta H_1 = -(47 \pm 13)$ кДж/моль и $\Delta H_2 = -(77 \pm 20)$ кДж/моль соответственно. Связывание бромистого этидия с димером $d(CGAA)$ характеризуется значением $\Delta H_3 = -(53 \pm 22)$ кДж/моль, что по абсолютной величине примерно в два раза меньше энтальпии образования 1:2-комплексов красителя с самокомплементарными тетра-нуклеотидами в водном растворе [16]. Следует отметить, что проведенные расчеты ΔH_i ($i = 1, 2, 3$) носят лишь оценочный характер. Детальный анализ вкладов отдельных реакций в термодинамику комплексообразования молекул в условиях сложного равновесия в растворе может быть сделан на основании результатов расчетов термодинамических параметров исходя из температурных зависимостей протонных химических сдвигов красителя в смеси с тетрамером [16].

Значения индуцированных химических сдвигов протонов бромистого этидия $\Delta\delta_i = \delta_m - \delta_i$, где $i = 1, 2, 3$, соответствуют типу комплекса (см. таблицу), для всех протонов в комплексах одиночной нити тетра-нуклеотида с одной молекулой красителя $\Delta\delta_1$ превышают значения $\Delta\delta_2$ для соответствующих комплексов с двумя молекулами красителя. Очевидно, что расчетные значения $\Delta\delta_2$ в 2:1-комплексе — средние для двух связанных с тетра-нуклеотидом молекул бромистого этидия. Это позволяет предположить, что при комплексообразовании двух молекул красителя имеет место существенно различная экранировка протонов бромистого этидия в разных сайтах одноцепочечной тетра-нуклеотидной последовательности $d(CGAA)$. Что же касается значений индуцированных химических сдвигов $\Delta\delta_3$ в 1:2-комплексе при связывании бромистого этидия с димером тетра-нуклеотида, то они для всех протонов оказываются близкими к величине $\Delta\delta_1$ в комплексе одонитчатого тетра-нуклеотида с одной молекулой красителя. Высокая экранировка протонов красителя нуклеотидами одной нити может быть обеспечена только при условии уменьшения расстояния между хромофором бромистого этидия и ароматическими основаниями в месте связывания лиганда и изменения угловых конформационных параметров по сравнению с комплексом красителя с димером тетра-нуклеотида. Анализ значений индуцированных химических сдвигов для всех протонов бромистого этидия в комплексе 1:1 красителя с одиночной нитью дезокситетрануклеотида $d(CGAA)$ дает основание полагать, что в этом комплексе существует

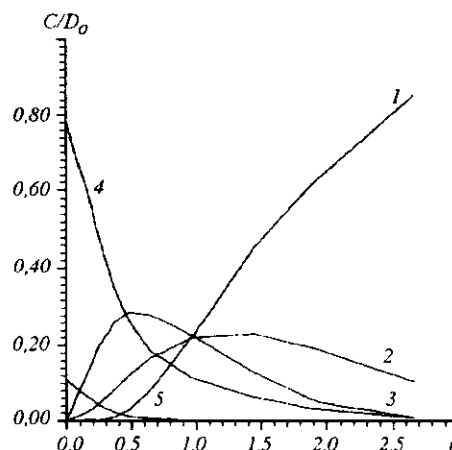


Рис. 4. Относительное содержание молекулярных комплексов в растворе в зависимости от $r = N_0/D_0$ при $D_0 = 1,15 \cdot 10^{-3}$ моль/л, $T = 298$ К: 1 — комплекс 1:2 (DN_2); 2 — комплекс 1:1 (DN); 3 — комплекс 2:1 (D_2N); 4 — мономер бромистого этидия (D); 5 — димер бромистого этидия (D_2)

большая вероятность присоединения красителя к нити тетрауклеотида как со стороны ароматического кольца, содержащего протоны Н2 и Н4, так и с противоположной стороны хромофора, где находятся протоны Н7 и Н9.

По найденным значениям констант реакций (см. таблицу) было рассчитано относительное содержание молекулярных ассоциатов в растворе в зависимости от $r = N_0/D_0$ — соотношения исходных концентраций нитей тетрауклеотида и красителя (рис. 4). Качественный характер полученных зависимостей для комплексообразования бромистого этидия с некомплементарным дезокситетрауклеотидом d(CGAA) согласуется с наблюдаемыми для самокомплементарных А—Т-содержащих дезокситетрауклеотидов [5—7]. Прежде всего следует отметить тот факт, что вклад в общее равновесие различного типа комплексов, как и в случае комплексообразования красителя с самокомплементарными тетрауклеотидами [5—7], определяется не только значениями равновесных констант реакций, но существенно зависит и от r . При $r < 1,0$ велика относительная концентрация комплексов 1:1 и 2:1 красителя с одноцепочечным тетрауклеотидом (кривые 2, 3). С ростом r наблюдается возрастание доли 1:2-комплекса, формирующегося через «скрепку» (кривая 1), несмотря на относительно малое значение равновесной константы K_3 . Высокая доля комплекса 1:2 при $r > 1$, образующегося через «скрепку», связана с увеличением концентрации мономеров тетрауклеотида с ростом r . Важно отметить, что как и в [5—7], максимумы на концентрационных кривых для комплексов 1:1 и 2:1 наблюдаются при значениях r , близких к стехиометрическим соотношениям исходных концентраций тетрауклеотида и красителя для соответствующих типов комплексов. Качественное объяснение такого хода зависимостей дано в работе [4]. Анализ динамического равновесия при комплексообразовании молекул существен для установления вклада каждого типа комплекса в экспериментально наблюдаемый протонный химический сдвиг и для корректной интерпретации двухмерных спектров 2D-NOESY, когда возникает вопрос о расчете структур образующихся комплексов по значениям интенсивностей сигналов NOE [5].

Структура комплексов. Анализ структур комплексов бромистого этидия с d(CGAA) проводили на основании рассчитанных предельных значений протонных химических сдвигов. Из таблицы видно, что $\Delta\delta_i = \delta_m - \delta_i$, определяющие индуцированные химические сдвиги протонов красителя в область сильного поля, находятся в пределах $0,32 \div 0,82$ млн⁻¹ для рассмотренных типов комплексов при $T = 298$ К, что свидетельствует о значительном экранирующем влиянии азотистых оснований на все протоны бромистого этидия и предполагает встраивание красителя между плоскостями осно-

ваний тетрауклеотида. Квантово-механические расчеты [17] показывают, что кольцевые токи азотистых оснований нуклеиновых кислот дают основной вклад ($\approx 70\%$) в экранирование ядер соседних молекул в сравнении с локальными диа- и парамагнитными эффектами и поляризуемостью связей. Для расчета химических сдвигов, вызванных кольцевыми токами, обычно применяют модель эквивалентного диполя [18], в которой действие круговых токов заменяется эквивалентным действием магнитных диполей, помещенных в центр каждого ароматического кольца молекулы. Соответствующим подбором величин магнитных моментов диполей и введением аппроксимирующих соотношений для учета дополнительного экранирования, не связанного с круговыми токами, можно получить достаточно точную оценку общего экранирования ядер азотистыми основаниями. Индуцированные химические сдвиги протонов красителя тогда могут быть рассчитаны следующим образом [4]:

$$\Delta\delta = \sum \mu_j f(R, \Psi) (1 - 3\cos^2\theta) / r_j^3, \quad (4)$$

где μ_j — магнитный момент эквивалентного диполя j -го ароматического кольца азотистого основания; r_j — расстояние от j -го диполя до рассматриваемого протона; θ_j — угол между направлением поля и вектором r_j ; $f(R, \Psi)$ — параметрическое регрессионное соотношение в виде многочлена для аппроксимации квантово-механических кривых экранирования; R, Ψ — полярные координаты в системе отсчета, связанной с осью спирали молекулы и плоскостью, в которой располагается хромофор ароматической молекулы красителя.

Экспериментальные исследования свидетельствуют о том, что гомополимеры могут находиться в виде одноцепочечных спиралей [19]. В настоящей работе рассчитывали экранирование протонов бромистого этидия соседними основаниями в комплексах 1:1 и 2:1 при вариации конформационных параметров спирали. Использовали алгоритм преобразований координат атомов нуклеотидных пар и программу, реализующую этот алгоритм, разработанные в ИТЭБ РАН [20]. Последовательность преобразований координат при расчетах индуцированных химических сдвигов протонов красителя отвечала изменению параметров ω (пропеллер), k (излом пары), τ (наклон пары), ρ (крен), D_x (сдвиг), D_y (скольжение), Ω (закручивание) и D_z (поднятие) [12]. Для того чтобы использовать такие преобразования координат нуклеотидных пар в двойной спирали, в процессе вычислений для одноцепочечного тетрауклеотида d(CGAA) достраивали вторую нить дуплекса из комплементарных оснований (d(GCTT)). Однако при расчете экранирования протонов красителя учитывали основания только одной нити спирали, а комплементарные основания второй нити исключали из рассмотрения. Построение структур комплексов проводили путем минимизации квадратичного функционала невязки значений индуцированных протонных химических сдвигов, полученных из экспериментальных концентрационных зависимостей (см. таблицу) и рассчитанных по соотношению (4) при вариации параметров спирали. Оценки с использованием суммарных констант спин-спинового взаимодействия для H1' и H2', H2'' протонов дезоксирибозы [22] позволили сделать заключение о том, что дезоксирибозные остатки тетрауклеотида 5'-d(CpGpApA) в растворе с бромистым этидием находятся преимущественно в C2'-эндо-конформации, соответствующей В-форме ДНК. Ранее показано [5—7], что в случае комплексообразования бромистого этидия с мономерами самокомплементарных дезокситетрануклеотидов краситель преимущественно связывается с сайтами, содержащими чередующиеся типы оснований в цепи (пиримидин-пуриновые или пурин-пиримидиновые сайты в последовательности). В связи с этим в расчетах полагали, что пиримидин-пуриновый участок (CG-сайт) последовательности d(CGAA) является местом преимущественной посадки красителя в

1:1-комплексе. На рис. 5 и 6 представлены в различных проекциях рассчитанные наиболее вероятные структуры комплексов 1:1 бромистого этидия с одноцепочечным дезокситетрануклеотидом d(CGAA), отвечающие встраиванию красителя в d(CG)-сайт тетрамера соответственно со стороны ароматического кольца, содержащего протоны Н7 и Н9, и с противоположной стороны хромофора, где находятся протоны Н2 и Н4. Структуры таких комплексов фактически отличаются тем, что в них имеет место антипараллельная ориентация хромофора красителя в С—G-участке тетрамера (фенантридиновый хромофор в структуре комплекса на рис. 5 развернут на 180° по отношению к представленной на рис. 6). Пространственное изображение структуры получено с помощью программы «Mathematica 2.0» (Wolfram Res. Ltd). Длины связей и валентные углы в структуре молекулы бромистого этидия, необходимые для проведения расчетов, взяты по данным рентгеноструктурного анализа [23]. При построении структур учитывали, что расчетные значения $\Delta\delta_1$ в 1:1-комплексе являются средними для двух возможных ориентаций красителя в интеркалированном комплексе. Комплекс 1:1 характеризуется следующими параметрами спирали: $D_2 = 6,38 \text{ \AA}$,

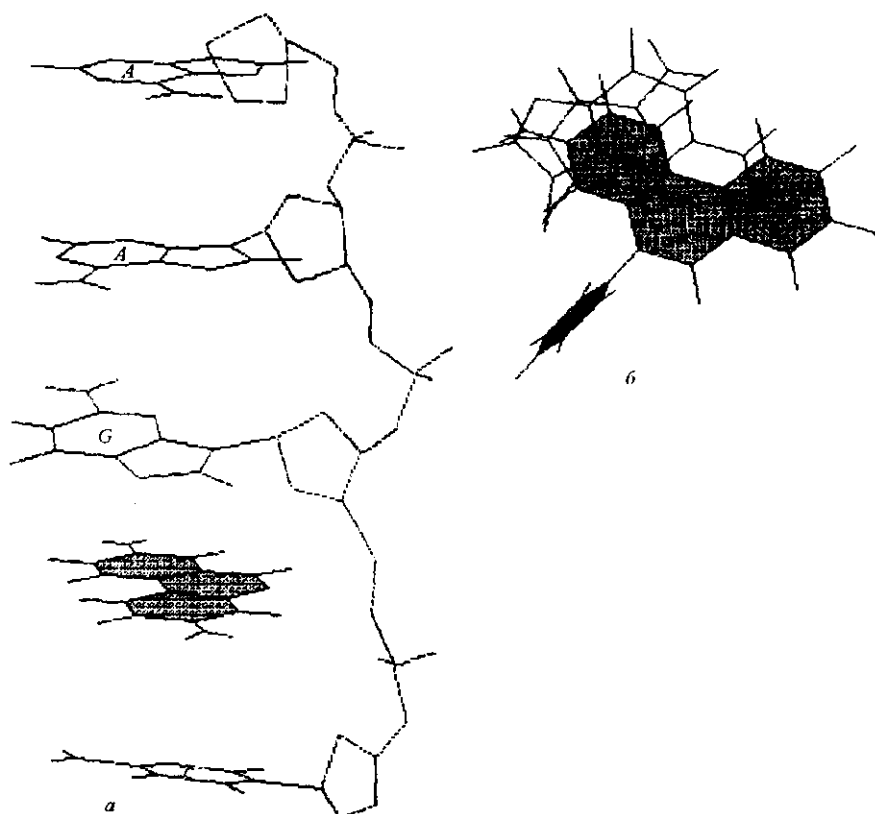


Рис. 5. Расчетная структура комплекса 1:1 бромистого этидия с 5'-d(CpGpApA), соответствующая встраиванию красителя в d(CG)-сайт одноцепочечного тетрануклеотида со стороны ароматического кольца, содержащего протоны Н7 и Н9: а — вид на комплекс сбоку. Хромофор красителя заштрихован; б — вид на d(CG)-сайт со встроенным красителем сверху, показывающий взаимное расположение плоскостей оснований и хромофора бромистого этидия в 1:1 комплексе

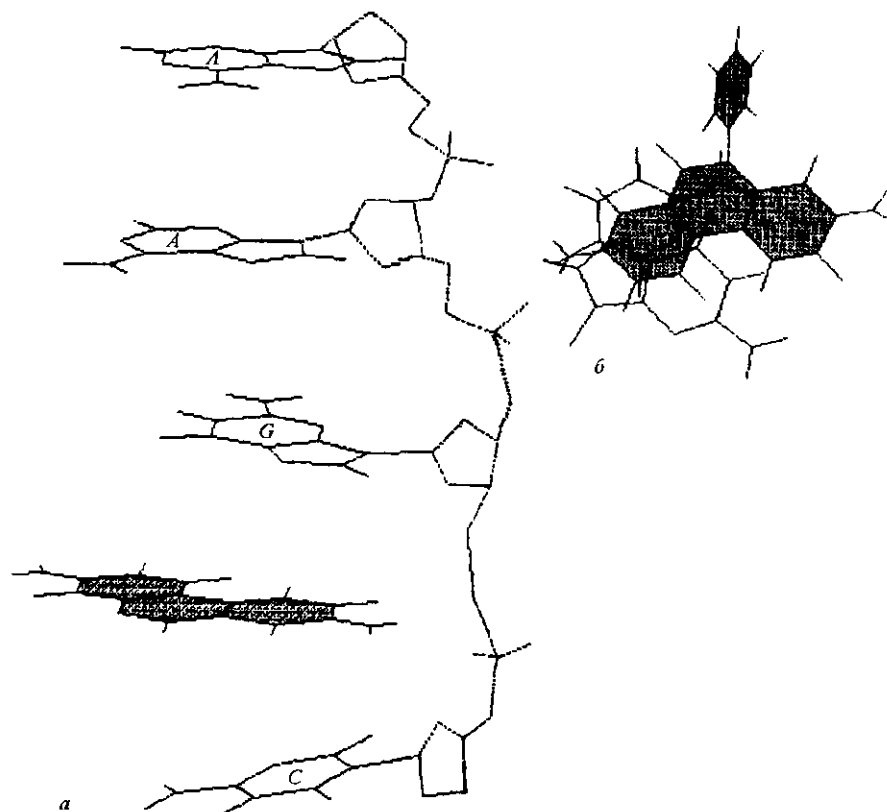


Рис. 6. Расчетная структура комплекса 1:1 бромистого этидия с 5'-d(CpGpApA), соответствующая встраиванию красителя в d(CG)-сайт одноцепочечного тетра nukлеотида со стороны ароматического кольца, содержащего протоны Н2 и Н4. Обозначения см. рис. 5

$\Omega = 28,5^\circ$, $\omega = 5^\circ$, $\tau = 0^\circ$, $D_x = -0,77 \text{ \AA}$, $D_y = 1,95 \text{ \AA}$, $\rho = 3,5^\circ$, $k = 3^\circ$. Хромофор красителя в 1:1-комплексах располагается перпендикулярно оси спирали на равных расстояниях (3,19 \AA от плоскостей оснований верхнего гуанина и нижнего цитозина в CG-сайте. Обращает на себя внимание уменьшение расстояния между плоскостями азотистых оснований, существенно больший сдвиг и угол закручивания оснований в 1:1-комплексе по сравнению с интеркалированным 1:2-комплексом красителя с тетра nukлеотидным дуплексом [5—7]. Одноцепочечная структура олигонуклеотида в отличие от дуплексной обладает значительно большей конформационной свободой. Можно предположить, что определенную роль в стабилизации 1:1-комплекса оказывает электростатическое взаимодействие между положительно заряженным азотом бромистого этидия и отрицательным фосфатом тетра nukлеотида.

Наиболее вероятная структура комплекса 2:1 бромистого этидия с одиночной нитью дезокситетра nukлеотида d(CGAA), отвечающая встраиванию красителя в CG- и AA-сайты тетрамера, рассчитана по методике, аналогичной описанной выше для 1:1-комплекса. Существенно, что в CG-сайте комплекса 2:1 возрастает (в сравнении с комплексом 1:1) расстояние между плоскостями соседних оснований ($D_2 \approx 6,85 \text{ \AA}$) и изменяются

некоторые угловые параметры спирали, в частности, углы спирального вращения и крена. Как уже отмечалось, получаемые в результате расчетов величины экранирования протонов бромистого этидия в 2:1-комплексе фактически являются средними для двух возможных мест связывания в сайты d(C-G) и d(A-A) дезокситетрануклеотида, отличающиеся составом и последовательностью оснований в цепи. В связи с этим для исследуемого некомплементарного тетрануклеотида не представляется возможным строго рассчитать структуру комплексов красителя с различными участками одноцепочечной последовательности. Такая задача может быть решена в результате изучения взаимодействия лигандов со специально синтезированными дезокситетрануклеотидами различной последовательности оснований [24]. Что касается 1:2-комплекса бромистого этидия с димером d(CGAA), то сравнение индуцированных химических сдвигов $\Delta\delta_3$ протонов красителя (см. таблицу) с рассчитанными значениями $\Delta\delta_3$ для 1:2-комплекса красителя с самокомплементарным тетрануклеотидом d(ACGT) [6] показывает их хорошее соответствие.

Следовательно, можно предположить, что так же, как и в 1:2-комплексе бромистого этидия с d(ACGT), краситель преимущественно встраивается в CG-сайт димера тетрануклеотида d(CGAA). При этом достаточно близкие значения величин экранирования всех протонов красителя в 1:2-комплексах бромистого этидия с этими тетрануклеотидами в одних и тех же экспериментальных условиях предполагают подобное пространственное расположение плоскостей пар оснований и хромофора красителя в интеркалированных комплексах.

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

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

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

Дослідження комплексоутворення бромистого етидію з одноланцюговим некомплементарним дезокситетрануклеотидом 5'-d(CpGpApA) у водному розчині методом ^1H -ЯМР спектроскопії

Резюме

Методом одновимірної та двовимірної ^1H -ЯМР спектроскопії (500 і 600 МГц) вивчено комплексоутворення у водно-сольовому розчині барвника бромистого етидію (3,8-діаміно-6-феніл-5-етилфенантридин) з одноланцюговим некомплементарним дезокситетрануклеотидом 5'-d(CpGpApA). Виміряно концентраційні залежності хімічних зсувів протонів взаємодіючих молекул за різних температур ($T_1 = 298$ і $T_2 = 308$ К). Дослідження самоасоціації тетрануклеотиду засвідчили малу вірогідність утворення дуплексів у розчині. У зв'язку з цим у розчині основну роль відіграють комплекси барвника з одиничною ниткою тетрануклеотиду, що дає змогу проаналізувати специфіку взаємодії ароматичного ліганда з одноланцюговою ДНК. Розглянуто різні схеми комплексоутворення, визначено рівноважні константи і граничні значення хімічних зсувів протонів бромистого етидію у комплексах. Зроблено аналіз відносного вмісту комплексів різного типу і виявлено особливості динамічної рівноваги в залежності від співвідношення концентрацій барвника і тетрануклеотиду. На основі отриманих даних зроблено висновок про існування сиквенспецифічності зв'язування бромистого етидію з одноланцюговою нуклеотидною послідовністю. За розрахунками індукованих хімічних зсувів протонів барвника побудовано найвірогідніші структури комплексів 1:1 бромистого етидію з одиничною ниткою дезокситетрануклеоти-

ду, які відповідають двом можливим типам вбудовування барвника між основами цитозину і гуаніну — з діаметрально протилежних сторін фенантридинового хромофора.

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

¹H-NMR investigation of complex formation of ethidium bromide with single-stranded non-complementary deoxytetranucleotide 5'-d(CpGpApA) in aqueous solution

Summary

Complex formation between the aromatic dye ethidium bromide (3,8-diamino-6-phenyl-5-ethyl-phenanthridine) and single-stranded non-complementary deoxytetranucleotide 5'-d(CpGpApA) in aqueous solution has been studied by one- and two-dimensional ¹H-NMR spectroscopy (500 and 600 MHz). Concentration dependences of proton chemical shifts of the interacting molecules were measured at different temperatures $T_1 = 298$ K and $T_2 = 308$ K. Investigations of the self-association of the tetranucleotide molecules have shown that there is a very low probability of duplex formation at the experimental conditions studied. It follows that the complexations of the dye molecules with the monomer of the tetranucleotide play the main role in the complex equilibrium in solution giving an opportunity to analyze the specificity of interactions of aromatic ligand with the single-stranded DNA. Different schemes of complex formation have been examined, equilibrium reaction constants and limiting chemical shifts of dye protons in different complexes have been determined. Analysis of the relative content of different types of complexes was made and special features of the dynamic equilibrium were revealed as a function of both the dye and tetranucleotide concentrations. The analysis has shown that there is a sequence-specific binding of ethidium bromide with the single-stranded oligonucleotide. The most favorable structures of 1:1 complexes of the dye with the single strand of the tetranucleotide corresponding to the drug binding from the opposite aromatic rings of the phenanthridine chromophore were constructed using the calculated values of induced chemical shifts of ethidium bromide protons.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Льюн Б. Гены. — М.: Мир, 1987. — 544 с.
2. Rill R. L., Hecker K. N. Biochemistry, mapping of drug binding sites on single-stranded DNA using Sequanase T7 DNA polymerase // Biochemistry. — 1995. — 34. — P. 15987—15999.
3. Graves D. E. Sequence selective binding of actinomycin D to duplex and single-strand DNA. Book of abstracts // Workshop on DNA-drug interactions (Madrid, 15—17 Nov., 1993). — P. 39.
4. Davies D. B., Djimant L. N., Veselkov A. N. ¹H NMR structure analysis of the interactions of proflavine with self-complementary deoxytetranucleotides of different base sequence // Nucleosides and Nucleotides. — 1994. — 13. — P. 637—655.
5. Веселков А. Н., Дымант Л. Н., Болотин П. А. и др. Исследование взаимодействия бромистого этидия с дезокситетрарибонуклеозидтрифосфатом 5'-d(GCGC) методом ¹H-ЯМР спектроскопии // Молекуляр. биология. — 1995. — 29, № 2. — С. 326—338.
6. Веселков А. Н., Дымант Л. Н., Болотин П. А. и др. Исследование взаимодействия бромистого этидия с самокомплементарным дезокситетрануклеотидом 5'-d(ApCpCpT) в водном растворе методом ¹H-ЯМР спектроскопии // Биополимеры и клетка. — 1995. — 11, № 3—4. — С. 42—54.
7. Веселков А. Н., Дымант Л. Н., Болотин П. А. и др. Исследование взаимодействия бромистого этидия с самокомплементарным дезокситетрануклеотидом 5'-d(CpCpCpG) в водном растворе методом ¹H-ЯМР спектроскопии // Журн. структур. химии. — 1996. — 37, № 1. — С. 124—1255.
8. Takenaka S., Manabe M., Yokoyama M. et al. Specific binding to poly A of a naphthalene diimide carrying thymine groups // J. Chem. Soc. Chem. Commun. — 1996. — 22. — P. 379—380.
9. Bailey S. A., Graves D. A., Rill R., Marsh G. Influence of DNA base sequence on binding energetics of actinomycin D // Biochemistry. — 1993. — 32. — P. 5881—5887.
10. 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 nonclassical, non-GpC binding sites // Ibid. — 1994. — 33. — P. 11493—11500.
11. Bresloff J. L., Crothers D. M. Equilibrium studies of ethidium-polynucleotide interaction // Ibid. — 1981. — 20. — P. 3547—3553.
12. Веселков А. Н., Барановский С. Ф., Петренко Н. В. и др. Исследование самоассоциации молекул некомплементарных дезокситетрануклеотидов различной последовательности оснований в водном растворе методом ¹H-ЯМР спектроскопии // Биополимеры и клетка. — 1996. — 12, № 4. — С. 38—48.
13. Davies D. B., Djimant L. N., Veselkov A. N. ¹H NMR investigation of self-association of

- aromatic drug molecules in aqueous solution. Structural and thermodynamical analysis // *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*—1996.—92, N 3.—P. 383—390.
14. *Веселков А. Н., Дэвис Д., Дымант Л. Н. и др.* 1M- и 2M-¹H ЯМР исследование самоассоциации дезокситетрарибонуклеозидтрифосфатов различной последовательности оснований в водном растворе // *Биополимеры и клетка.*—1991.—7, № 5.—С. 15—22.
 15. *Veselkov A. N., Djimant L. N., Karawajew L. S., Kulikov E. L.* Investigation of the aggregation of acridine dyes in aqueous solution by ¹H NMR // *Stud. Biophys.*—1985.—106, N 3.—P. 171—180.
 16. *Веселков А. Н., Дымант Л. Н., Болотин П. А. и др.* Термодинамический анализ взаимодействия бромистого этидия с дезокситетрарибонуклеотидом 5'-d(GpCpGpC) по данным протонного магнитного резонанса // *Молекуляр. биология.*—1996.—30, № 1.—С. 1—11.
 17. *Giessner-Prettre C., Pullman B.* Quantum mechanical calculations of NMR chemical shifts in nucleic acids // *Quart. Revs Biophys.*—1987.—20, N 3/4.—P. 113—172.
 18. *Abraham R. J.* The application of aromatic ring currents in the elucidation of drug-ligand and metallo-porphyrin complexations // *Nuclear magnetic resonance spectroscopy in molecular biology.*—Dordrecht: D. Reidel publ. comp., 1978.—P. 461—479.
 19. *Зенгер В.* Принципы структурной организации нуклеиновых кислот.—М.: Мир, 1987.—584 с.
 20. *Полтев В. И., Теплухин А. В.* Взаимодействие оснований и конформационные проявления последовательностей повторяющихся нуклеотидов // *Молекуляр. биология.*—1987.—21, № 1.—С. 102—115.
 21. *Dickerson R. E.* Definitions and nomenclature of nucleic acid structure parameters // *J. Biomol. Struct. and Dyn.*—1989.—6, N 4.—P. 627—634.
 22. *Searle M. S.* NMR studies of drug-DNA interactions // *Progr. NMR Spectr.*—1993.—25.—P. 403—480.
 23. *Jain S. C., Tsai C.-C., Sobell H. M.* Visualization of drug-nucleic acid interactions at atomic resolution. II. Structure of an ethidium/dinucleoside monophosphate crystalline complex ethidium: 5'-iodocytidyl-(3'-5')-guanosine // *J. Mol. Biol.*—1977.—14, N 2.—P. 317—331.
 24. *Веселков А. Н., Завьялова О. С., Дымант Л. Н., Дэвис Д.* Исследование комплексообразования бромистого этидия с самокомплементарным дезокситетрануклеотидом 5'-d(TGCA) методом ¹H-ЯМР спектроскопии // *Журн. физ. химии.*—1996.—70, № 9.—С. 1623—1630.