

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

На правах рукопису

БОЛОТІН ПЕТРО АНДРІЙОВИЧ

**МОЛЕКУЛЯРНИЙ МЕХАНІЗМ СЕЛЕКТИВНОГО
ЗВ'ЯЗУВАННЯ АРОМАТИЧНОГО ЛІГАНДУ
З КОРОТКИМИ ФРАГМЕНТАМИ ДНК
У ВОДНОМУ РОЗЧИНІ**

Спеціальність 01.04.25 - біофізика

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата фізико-
математичних наук

ХАРКІВ 1997

AB 37.129

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Севастопольському Державному технічному університеті

Науковий керівник: доктор фізико-математичних наук,
професор Веселков Олексій Никонович

Офіційні опоненти:

1. Доктор фізико-математичних наук, професор
Суходуб Леонід Федорович
2. Доктор фізико-математичних наук, професор
Бержанський Володимир Наумович

Провідна організація: Інститут молекулярної біології і генетики
Національної академії наук України, м. Київ

Захист дисертації відбудеться "20" 03 1997 р. о
15⁰⁰ годині на засіданні Спеціалізованої вченої ради Д 02.02.13 Хар-
ківського державного університету, 310077, м. Харків, пл. Свободи, 4.

З дисертацією можна ознайомитися у Центральній науковій
бібліотеці Харківського державного університету

Автореферат розісланий "19" 02 1997 р.

Вчений секретар Спеціалізованої вченої ради, кандидат біоло-
гічних наук

Гаташ С.В.

ЛННБ України ім. В. Стефаника



00752450 (N)

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Багато антибіотиків, що використовують в клінічній практиці, у тому числі й ті, які мають антиканцерогенну активність, виявляють високу спорідненість до зв'язування з генетичним матеріалом клітини - молекулою ДНК. Ці сполуки можуть належати до структурно-різних сімейств, що передбачає різні можливі механізми та енергетику їх комплексоутворення з ДНК. Відомі два головних типу зв'язування лігандів з ДНК: - інтеркаляційне, тобто вбудування ароматичних молекул між площинами сусідніх пар базисів; - зовнішнє, коли антибіотик вбудовується у борозни подвійної спіралі ДНК. В деяких випадках можливі комбінації обох типів зв'язування. Для прогнозування медико-біологічних властивостей антибіотиків та ціленаправленої розробки нових лікарських засобів, для розуміння механізму функціонування антибіотиків на молекулярному рівні необхідно використання різноманітних теоретичних та експериментальних методів дослідження. Один з найбільш ефективних експериментальних методів для вивчення молекулярних комплексів у розчині є ЯМР-спектроскопія. На основі методів ЯМР, який по інформативності в цей час можна порівняти з рентгеноструктурним аналізом, встановлені структури ряду комплексів біологічно-активних речовин з ДНК та її фрагментами. В недостатній мірі вирішені питання, пов'язані з селективністю взаємодії лігандів з певними ділянками ДНК, що необхідно для з'ясування молекулярного механізму фізіологічної дії біологічно активних речовин. Складність будови та конформаційна мінливість полімерних нуклеїнових кислот обмежують можливість детального аналізу ролі тих чи інших взаємодій у стабілізації молекулярних структур у розчині. Разом з тим експериментально встановлено, що селективність, яку проявляють ліганди, спостерігається вже на коротких нуклеотідних послідовностях, включаючих відповідний сайт. Отже, важливі енергетичні та структурні характеристики комплексів лігандів з ДНК можуть бути виявлені шляхом вивчення їх взаємодії з модельними сполуками-олігонуклеотидами заданої послідовності базисів в ланцюгу.

Мета дослідження, виконаного в дисертаційній роботі - встановити основні закономірності інтеркаляційної взаємодії ароматичного ліганду- фенантридинного барвника бромістого етідію з дезокситетрануклеотидами різної послідовності основ у водно-соляним розчині. З'ясувати вплив нуклеотідного складу та послідовності основ у ланцюгу на особливості процесів комплексоутворення молекул. Для досягнення поставленої мети вирішувались задачі: розшифрування та віднесення сигналів протонів в одновірних та двовірних спектрах

розчинів досліджуваних молекул; вивчення закономірностей самоасоціації ароматичних лігандів, дезокситетрануклеотидів різної послідовності основ, визначення кількісних характеристик, необхідних для аналізу рівноваги у розчині барвник - олігонуклеотид; розробка методик визначення структурних та термодинамічних параметрів асоціації та комплексоутворення молекул на основі концентраційних і температурних залежностей протонних хімічних зсувів; вивчення комплексоутворення фенантридінового барвника бромістого етідію з тетравірамі різного нуклеотидного складу та послідовності основ у ланцюгу, встановлення основних типів утворення комплексів, їх структури та термодинамічних характеристик; аналіз характеру фізико-хімічних взаємодій, відповідальних за селективність зв'язування ароматичного барвника з компонентами нуклеїнових кислот.

Наукова новизна визначається результатами що входять в основні положення, виносимі на захист: - вперше на основі використання методів одомірної та двомірної ЯМР-спектроскопії проведено комплексне та систематичне дослідження взаємодії у водному розчині типічного інтеркалятора бромістого етідію з спеціально синтезованими синтетичними дезокситетрануклеотидами різної послідовності основ у ланцюгу. Встановлено переважну взаємодію бромістого етідію з піримідин-пуриноюю послідовністю основ в тетрануклеотиднім дуплексі, при цьому міцність зв'язування ліганда зменшується в наступному ряді: $d(CGCG) > d(GCGC) > d(ACGT) >> d(AGCT)$; - показано, що склад різного типу комплексів в розчині суттєво залежить від співвідношення початкових концентрацій взаємодіючих молекул та послідовності основ в ланцюзі дезокситетрануклеотидів. При взаємодії бромістого етідію з одноланцюговими та двоспіральними молекулами тетрануклеотидів зв'язування залежить від нуклеотидного складу, послідовності основ у ланцюгу, а також від типу нуклеотидів фланкуючих ділянки переважної посадки барвника; - розроблена методика розрахунків структур комплексів барвника з тетрануклеотидами по лімітним значенням протонних хімічних зсувів взаємодіючих молекул. Визначені просторові структури 1:2 та 2:2 комплексів бромістого етідію з дуплексами дезокситетрануклеотидів, проведено порівняльний аналіз геометричних особливостей комплексів молекул у розчині; - на основі сумісного аналізу експериментальних концентраційних та температурних залежностей хімічних зсувів барвника розраховано внески різного типу реакцій в розчині у сумарні теплові та ентропійні ефекти. Визначені термодинамічні параметри (вільні енергії Гіббса, ентальпії та ентропії) реакцій комплексоутворення бромістого етідію з дезокситетрануклеотидами $d(GCGC)$, $d(CGCG)$, $d(AGCT)$ та $d(ACGT)$ у водному розчині, зроблено висновок про характер фізико-хімічних взаємодій,

відповідальних за селективність зв'язування барвника з піримідин-пуриновими сайтами досліджених послідовностей.

Наукова та практична цінність роботи. Одержані в роботі експериментальні та теоретичні результати поглиблюють діючі уяви про взаємодію біологічно активних ароматичних молекул з нуклеїновими кислотами. Для з'ясування механізму селективного зв'язування ароматичних лігандів з ДНК вивчено комплексоутворення типового інтеркалятора бромістого етідію з компонентами нуклеїнових кислот, що відрізняються нуклеотидним складом, послідовністю основ в ланцюгу, числом місць переважної посадки ліганду та нуклеотидними кільцями, фланкуючими місця зв'язування барвника. Багато інтеркаляторів володіють хіміотерапевтичними властивостями, у тому числі і антиканцерогеною активністю, зокрема, бромістий етідій володіє трипановидними властивостями. Використання методів одномірної та двомірної ЯМР-спектроскопії дозволило виконати детальний аналіз комплексоутворення фрагментів нуклеїнових кислот з фенантридновим барвником у розчині. Дослідження показали, що характерні особливості взаємодії молекул, специфіка зв'язування бромістого етідію з певними ділянками одноланцюгових та двохспіральных нуклеїнових кислот проявляється вже на коротких нуклеотидних послідовностях. Подібні дослідження важливі для розуміння молекулярних механізмів взаємодії нуклеїнових кислот з білками та іншими біологічно важливими сполуками, для встановлення загальних принципів вибіркої взаємодії з генетичним матеріалом клітини. Запропоновані методики розрахунків структурних та термодинамічних параметрів комплексоутворення ароматичних молекул, одержаних за даними одномірної та двомірної ЯМР-спектроскопії утворюють основу для вирішення задач технології нових речовин з заданими біологічними властивостями. Конкретний внесок дисертанта полягає в тому, що їм виконані: підбір, обробка та аналіз літературних даних; розшифровка та віднесення сигналів протонів в одномірних та двомірних спектрах розчинів досліджуваних молекул; участь в розробці методик визначення структурних та термодинамічних параметрів асоціації та комплексоутворення молекул на основі концентраційних та температурних залежностей протонних хімічних зсувів; розробка алгоритмів розрахунку характеристик комплексоутворення та обчислювальних програм; аналіз та інтерпретація одержаних результатів. Апробація роботи. Основні результати досліджень, що ввійшли в дисертацію були представлені та обговорені на: ІХ Всесоюзному семінарі "Структура та динаміка молекул і молекулярних систем", Черногोलівка, 1992р.; семінарі Всесоюзного хімічного товариства ім. Д.І.Менделєєва "Молекулярна фізика и біофізика водних систем", Санкт-Петербург, 1993,1995рр.; семінарі департа-

менту фізики і хімії СевДТУ, Севастополь, 1993-1996рр.; Міжнародному науковому семінарі по ЯМР спектроскопії, Краков, грудень, 1994р.; 35-м Санибел-симпозіумі, Флорида, США, березень, 1995р.; Міжнародній науковій конференції, присвяченій 150-річчю народження І.Пулюя, Тернопіль, травень, 1995р.; Міжнародній конференції по ЯМР спектроскопії, Манчестер, Великобританія, липень, 1995р.. Міжнародному семінарі по ЯМР-спектроскопії високого розрішення, Севастополь, вересень, 1995р.; Тези перерахованих доповідей опубліковані.

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 19 робіт.

Структура дисертації. Робота складається з вступу, п'яти глав, заключення, висновків, додатка та списку цитованої літератури, що вклучає 207 найменувань. Матеріал викладено на 201 сторінці, що містить 37 таблиць та 45 малюнків.

КОРОТКИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У вступі обґрунтовується актуальність дослідження, викладені його цілі та задачі, вказана новизна отриманих результатів, їх наукова і практична вартість. Дани відомості про апробації роботи.

1. ВЗАЄМОДІЯ АРОМАТИЧНИХ ЛІГАНДІВ З ФРАГМЕНТАМИ НУКЛЕІНОВИХ КИСЛОТ

У першій главі, що містить огляд літературних даних, розглядається структура та конформаційні стани, компонентів нуклеїнових кислот (НК), рівноважна самоасоціація коротких нуклеотидних послідовностей та ароматичних молекул барвників, комплексоутворення олігонуклеотидів з ароматичними молекулами барвників та антибіотиків. У розділі 1 наведені описи просторової структури нуклеотидних ланцюгів та геометрії пар основ в нуклеотидній послідовності. Головна увага приділена результатам досліджень олігонуклеотидних послідовностей, одержаних методами одномірної та двомірної ЯМР-спектроскопії. Другий розділ присвячено огляду літературних даних по параметрам самоасоціації компонентів нуклеїнових кислот та ароматичних молекул барвників у розчині, структурним характеристикам утворюючихся асоціатів та їх термічної стабільності. Проведено аналіз результатів досліджень термодинаміки утворення асоціатів дезокситетрануклеотидів різної послідовності основ в ланцюзі, одержаних оптичними методами та методами

ЯМР-спектроскопії. У третьому розділі наведені результати робіт по комплексоутворенню ароматичних лігандів з короткими фрагментами нуклеїнових кислот у розчині. Особливу увагу приділено моделі інтеркаляційного зв'язування з двохспіральними олігонуклеотидними послідовностями. Наведені результати робіт по комплексам барвників з моно- та дінуклеотідами, а також з більш довгими послідовностями, які можуть служити у якості модельних систем для вивчення взаємодії біологічно активних речовин з нуклеїновими кислотами. Проаналізовано літературні відомості про селективність взаємодії барвників з певними ділянками НК. Зроблено висновок про те, що для з'ясування ролі тих чи інших фізико-хімічних факторів у механізмі виборчого зв'язування ліганда з олігонуклеотидними послідовностями необхідно мати кількісну інформацію про параметри утворення та структурні характеристики різного типу молекулярних комплексів барвників з олігонуклеотідами в розчині.

2. ФИЗИЧНІ ОСНОВИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО МЕТОДА ЯМР-СПЕКТРОСКОПІЇ

У другій главі коротко викладено основи теорії імпульсної ЯМР-спектроскопії та експериментальної техніки здобування та обробки спектрів протонного магнітного резонанса, необхідних для опису умов експерименту та інтерпретації одержаних даних. Показано доцільність використання в цій роботі методик гомоядерної кореляційної спектроскопії 2D-COSY і 2D-NOESY. Розглянуто можливість розрахунку структур інтеркалірованих комплексів за даними ядерного ефекту Оверхаузера (NOE). Наведені відомості про об'єкти дослідження та умови проведення експерименту. У роботі використано зразки барвника бромістого стидія (ЕВ) та антибіотика актиноміцина D (AMD) фірми "Sigma" (США). Дезокситетраїбонуклеозидтрифосфати 5'-d(GpCpGpC), 5'-d(CpGpCpG), 5'-d(ApCpGpT) та 5'-d(ApGpCpT) синтезовані компанією "Oswel DNA Servise" (Великобританія). Концентрації молекул у розчині визначали спектрофотометрично. Експерименти проводились в інтервалі температур 283+353 К, стабілізація температури виконувалась з точністю ± 1 К. Одномірні протонні спектри ЯМР вимірялись на імпульсному фур'є-спектрометрі "Jeol GSX 500" з резонансною частотою 500 МГц. Регістрація спектрів проводилась в діапазоні 10 кГц. Двомірні 2D-COSY і 2D-NOESY експерименти при вивченні комплексоутворення ЕВ з d(GCGC) і d(CGCG) проводились на тому ж спектрометрі. Спектри 2D-NOESY реєструвались з використанням стандартної імпульсної послідовності при ширині спектра SW=10 кГц,

2048 точок в період детектування (t_2), 512 прирощувань часів сволощі (t_1) і при фіксованих часах змішування $t_{m1}=90$ і $t_{m2}=200$ мс. Спектри 2D-COSY вимірялись також з використанням стандартної імпульсної послідовності при 2048 точок в t_2 і 256 прирощувань у t_1 . Підготовчий період складав 1с для 2D-COSY і 3с для 2D-NOESY експериментів відповідно. При дослідженні комплексоутворення EB з d(AGCT) та d(ACGT) використовувався спектрометр "Bruker AMX" з робочою частотою 600 МГц. В цьому разі реєстрація спектрів 2D-NOESY проводилась при наступних параметрах спектрометра: 4096 точок в період детектування і 512 прирощувань часів сволощі. Підготовчий період складав 2 с, імпульсну послідовність при кожному t_1 повторювали 16 разів. Хімічні зрушення у спектрах визначали відносно ДСС (2,2-диметил-2-силапентан-5 сульфокислота), в якості внутрішнього стандарту використовувався ТМА (бромід тетраметиламонія).

3. РІВНОВАЖНА САМОАСОЦІАЦІЯ АРОМАТИЧНИХ МОЛЕКУЛ БАРВНИКІВ ТА ДЕЗОКСИТЕТРАНУКЛЕОТИДІВ РІЗНОЇ ПОСЛІДОВНОСТІ ОСНОВ У ВОДНОМУ РОЗЧИНІ

Самоасоціація бромістого етідія та актиноміцина D. Характер концентраційних залежностей хімічних зсувів необмінюючихся протонів EB та необмінюючихся протонів пептидних кілець і хромофора AMD свідчить про те, що у водному розчині, ароматичні молекули барвника та антибіотика утворюють стопочні асоціати за рахунок вертикальної стекінг-взаємодії хромофорів молекул. Для інтерпретації експериментальних даних використані моделі нескінченномірної некооперативної та кооперативної самоасоціації молекул. У некооперативній моделі передбачається рівність рівноважних констант утворення асоціатів K_j так, що $K_1=K_2=...=K_j=K$. В наслідок розрахунків одержані середні по всіх протонах значення рівноважних констант димеризації молекул $K_d=(176 \pm 8.0)$ л/моль ($T=294$ К) для EB і $K_d=(1440 \pm 160)$ л/моль для AMD при $T=298$ К. Для оцінки імовірності утворення асоціатів молекул більш високого порядку, ніж димери використана кооперативна модель, в якій $K_1=\sigma K$ і $K_2=K_3=...=K$, де σ - параметр кооперативності. В результаті проведених розрахунків одержані значення $\sigma=(0.89 \pm 0.06)$ для EB та $\sigma=(1.49 \pm 0.1)$ для AMD. Величина $\sigma \approx 1$ для EB, свідчить про практичну відсутність кооперативності при самоасоціації барвника, а $\sigma > 1$ для AMD - про антикооперативний процес агрегації молекул антибіотика. Аналіз структур димерів EB та AMD у водному роз-

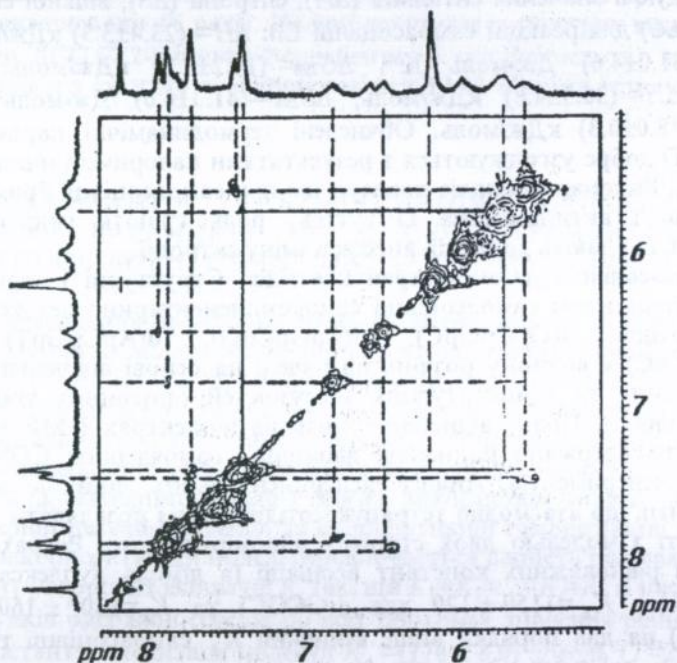
чині зроблено на основі розрахованих значень індукційованих хімічних зрушень протонів барвника та антибіотика $\Delta\delta = \delta_m - \delta_d$ і спектрів 2D-NOESY. Взаємне розміщення молекул у димері визначали шляхом встановлення відповідності величин $\Delta\delta$ з їх теоретичним значенням на основі кривих екранування ароматичних молекул, розрахованих квантовомеханічними методами.

На основі дослідження температурних залежностей хімічних зсувів протонів досліджених молекул визначені термодинамічні характеристики реакцій самоасоціації. Використано формалізм Вант-Гоффа для визначення термодинамічних параметрів реакцій. Одержані наступні значення ентальпії (ΔH), ентропії (ΔS), вільної енергії Гіббса (ΔG) для реакцій самоасоціації EB: $\Delta H = -(23.4 \pm 3.3)$ кДж/моль, $\Delta S_{298} = -(31.0 \pm 4.6)$ Дж·моль⁻¹·К⁻¹, $\Delta G_{298} = -(14.2 \pm 0.2)$ кДж/моль; для AMD: $\Delta H = -(30.3 \pm 4.8)$ кДж/моль, $\Delta S_{298} = -(41.3 \pm 6.6)$ Дж·моль⁻¹·К⁻¹, $\Delta G_{298} = -(18.0 \pm 0.3)$ кДж/моль. Обчислені термодинамічні параметри для AMD добре узгоджуються з результатами калориметричних досліджень. Виконаний аналіз показує, що при самоасоціації бромістого етідию і актиноміцина D суттєву роль грають гідрофобні взаємодії, що дають додатний внесок в зміну ентропії.

Самоасоціація дезокситетрануклеотидів. Структурні і термодинамічні параметри самоасоціації самокомплементарних дезокситетрануклеотидів d(GpCpGpC), d(CpGpCpG), d(ApCpGpT) та d(ApGpCpC) у водному розчині визначені на основі вивчення концентраційних та температурних залежностей протонних хімічних зсувів молекул. Повне віднесення сигналів в спектрах ПМР тетра-нуклеотидів одержано на основі двовірних гомоядерних COSY- і NOESY-експериментів. Аналіз експериментальних даних дозволив припустити, що взаємодія тетрануклеотидів можна розглядати у відповідності з моделлю двох станів - мономер-дуплекс. Розраховані значення рівноважних констант асоціації (в л/моль дуплекса при T=293 K): $K_A = 1150 \pm 120$ для d(GCGC) та $K_A = 1300 \pm 160$ для d(CGCG) на два порядки вище величини K_A самоасоціації тетрануклеотидів d(AGCT) і d(ACGT) ($K_A = 160 \pm 30$), що мають менш стабільні кінцеві А-Т пари. Одержані значення термодинамічних параметрів реакцій самоасоціації тетрануклеотидів у розчині підтверджують роль складу і послідовності основ у нуклеотидному ланцюгу у стабілізації спіральних структур.

4. КОМПЛЕКСОУТВОРЕННЯ АРОМАТИЧНОГО ЛІГАНДУ БРОМІСТОГО ЕТІДІЮ З ДЕЗОКСИТЕТРАНУКЛЕОТИДАМИ РІЗНОЇ ПОСЛІДОВНОСТІ ОСНОВ

Викладені результати дослідження комплексоутворення типового інтеркалятора бромістого етідію з самокомплементарними дезокситетрануклеотидами 5'-d(CpGpCpG), 5'-d(GpCpGpC), 5'-d(ApCpGpT), 5'-d(ApGpCpT). Вибір таких олігонуклеотидів обумовлений тим, що перший з тетрамірів містить два CG сайти, до яких EB виявляє специфічність взаємодії у дуплексі, другий і третій тетра-нуклеотиди



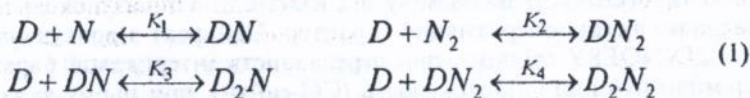
Мал.1. Розширення контурного 2D-NOESY спектру (600 МГц) розчину EB є дезокситетрануклеотидом 5'-d(ApGpCpT) в області слабого поля ($T=298$ К). Внутрішньомолекулярні зв'язки між протонами показано пунктирними лініями, міжмолекулярні - суцільними

мають в центрі по одному такому сайту, фланкорованому з 5'- та 3'-кінців різними нуклеозідами. Останній тетра-нуклеотид не має ні одного сайту з піримідин-пуриновою послідовністю основ. Все це дає можливість порівняльного аналізу сиквенса-специфічності зв'язування ліганду з різними сайтами послідовності. Данні двомірної гомоядерної спектроскопії 2D-NOESY (напр. мал.1) використані для іден-

тифікації протонів в спектрах ^1H ЯМР змішаних розчинів, а також для якісного визначення місць зв'язування барвника з тетра-нуклеотідами. В 2D-NOESY спектрі спостерігаються міжмолекулярні крос-піки достатньо високою інтенсивністю між орто- та пара/мета-протонами барвника и протоном $\text{H1}'(\text{G})$, що виразно видно на мал.1, представляючим розширення контурного 2D-NOE в області слабого поля.

Методика розрахунку параметрів комплексоутворення ароматичних лігандів з олигонуклеотідами базується на аналізі молекулярної рівноваги у розчині, виходячи з експериментальних концентраційних залежностей протонних хімічних зсувів. По знайденим значенням індуктованих хімічних зсувів протонів молекул у складі різних комплексів визначені найбільш імовірні структури утворюючихся молекулярних комплексів у розчині.

Взаємодія EB з 5'-d(GpCpGpC) і 5'-d(CpGpCpG). Аналіз 2D-NOESY спектрів розчинів EB з тетра-нуклеотідами показав, що барвник вбудовується у CG-сайти тетрамерів з боку малої канавки двохспірального дуплексу. Для кількісної оцінки взаємодії EB з тетра-нуклеотідами проаналізовано різні схеми утворення комплексів. Встановлено, що адекватною експерименту є схема, що враховує крім димеризації барвника і тетраміру, слідуючі рівноважні реакції у розчині:



Тут K_1, K_2, K_3, K_4 – рівноважні константи утворення комплексу 1:1 барвника з поодиноюю ниткою (DN) та 1:2 комплексу барвника з дуплексом (DN_2) тетра-нуклеотиду, а також утворення комплексу 2:1 двох молекул барвника з поодиноюю ниткою (D_2N) та 2:2 комплексу барвника (D_2N_2) з двома нитками тетра-нуклеотиду відповідно. За розрахунком по цій схемі спостерігаємий протоний хімічний зсув в молекулах барвника надається у вигляді

$$\delta = \frac{D}{D_0} (\delta_m + 2K_d D \delta_d + K_1 N \delta_1 + K_N K_2 N^2 \delta_2 + 2K_1 K_3 DN \delta_3 + 2K_N K_2 DN^2 \delta_4) \quad (2)$$

де D_0, D – початкова і рівноважна молярні концентрації барвника відповідно. Величини δ_m, δ_d, K_d и K_N визначені незалежно (гл.3) при дослідженні самоасоціації барвника і тетра-нуклеотидів у тих же умовах розчинника. Рівноважні константи $K_1 + K_4$ і граничні хімічні зсуви

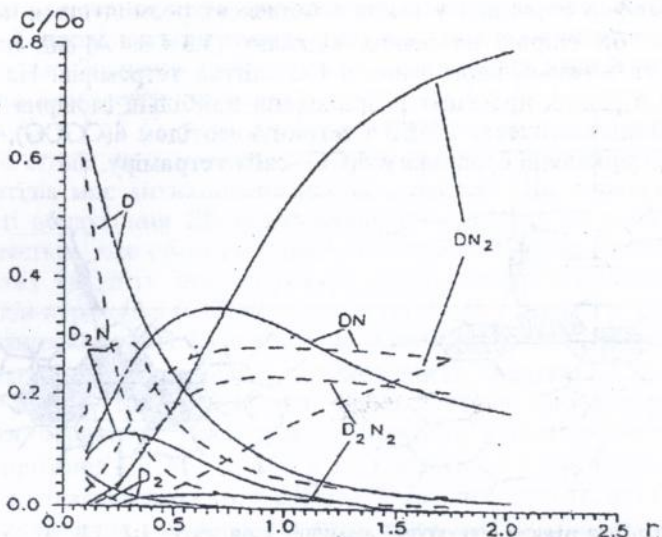
$\delta_1 + \delta_4$ відповідних комплексів знаходились як параметри моделі (2). Одержані середні значення констант утворення комплексів у л/моль при $T = 308$ К наведені у табл.1.

Таблиця 1

1:1	1:2	2:1	2:2	1:2 (скр)
K_1	K_2	K_3	K_4	K_5
EB+d(GCGC)				
9500 ± 3700	96000±18000	1300 ± 500	460 ± 240	-
EB+d(CGCG)				
21900 ± 5800	63100±12700	9900 ± 1700	87300±11500	-
EB+d(AGCT)				
4400 ± 1500	8800 ± 1500	2500 ± 700	850 ± 40	310 ± 50
EB+d(ACGT)				
14300 ± 3300	51500 ± 6400	1700 ± 600	2300 ± 800	100 ± 30

Порівняння рівноважних констант $K_1 + K_4$ показує їх суттєву різницю. Зв'язування другої молекули бромістого етідію з дуплексом $d(CGCG)_2$, в комплексі 2:2 також вигідно, як і посадка одної молекули в комплексі 1:2, в той час як зв'язування другої молекули EB з дуплексом $d(GCGC)_2$ на відміну від взаємодії з поодинокую ниткою має явно антикооперативний характер. Цей факт з врахуванням даних 2D-NOESY свідчить про переважність інтеркаляції барвника в піримідин-пуринову послідовність (CG-сайти), при цьому зв'язування бромістого етідію відповідає моделі "виключеного сусіда". Від'ємна кооперативність ($K_3 < K_1$) спостерігається при зв'язуванні EB з мономерами як тетра nukлеотиду $d(GCGC)$, так і $d(CGCG)$.

Розрахунки показують, що внесок загальну рівновагу різного типу комплексів визначається не тільки значеннями рівноважних констант реакцій, але і суттєво залежить від співвідношення початкових концентрацій тетра nukлеотиду і ліганда ($r = N_0/D_0$) (мал.2). Вміст 2:2 комплексу зневажливо мало при комплексоутворенні EB з $d(GpCpGpC)$ і велике при зв'язуванні барвника з ізомірним тетра nukлеотидом $d(CpGpCpG)$. При великих значеннях r переважаючою є доля 1:2 комплексів, що пов'язано з збільшенням імовірності утворення таких структур по мірі зростання концентрації дуплексу у розчині. Максимуми на концентраційних кривих для 1:1 і 2:1 комплексів спостерігаються при значеннях r , наближених до стехіометричних співвідношень.



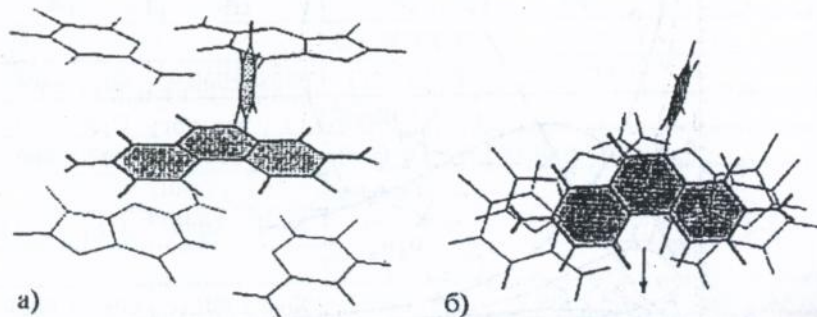
Мал.2. Відносний вміст молекулярних комплексів у змішанному розчині EB з тетра nukлеотідами 5'-d(GpCpGpC) (суцільні лінії) і 5'-d(CpGpCpG) (штриховані лінії) в залежності від $r = N_0/D_0$

Аналіз структур комплексів EB з тетра nukлеотідами зроблено на базі розрахованих граничних значень протонних хімічних зсувів δ_i ($i=1,2,3,4$), 2D-NOESY спектрів і квантовомеханічних кривих екранування азотистих основ. Структури розрахованих комплексів 1:2 і 2:2 EB з дослідженими дезокситетра nukлеотідами характеризуються параметрами спіралі, наведеними у таблиці 2.

Таблиця 2

Комплекс	1:2				2:2
	AGCT	ACGT	GCGC	CGCG	CGCG
Сайт	GC	CG	CG	CG	CG
D_z -rise	6.6 Å	6.8 Å	6.8 Å	6.6 Å	6.34 Å
Ω -twist	8°	11°	11°	8.3°	10°
ω -propel	-3°	4.1°	0.55°	-0.4°	-0.4°
τ -tilt	-2.9°	-4.5°	-5°	-5°	-5°
D_x -shift	0.48 Å	0.47 Å	0.4 Å	0.4 Å	0.4 Å
D_y -slide	-1.25 Å	-0.45 Å	0.45 Å	0.45 Å	0.45 Å
ρ -roll	2.5°	2.5°	1.6°	1.6°	1.6°
k-buckle	3.0°	6.0°	5.0°	5.0°	7.0°

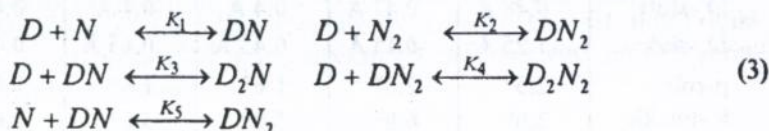
Хромофор барвника у таких комплексах розміщується перпендикулярно осі спіралі на рівних віддальх (3.3 + 3.4 Å) від площин верхньої та нижньої пари основ в CG-сайтах тетрамірів. На мал.3 показана в різних проєкціях розрахована найбільш імовірна структура дільниці комплексу 1:2 ЕВ з тетра nukлеотідом d(CGCG), відповідаюча інтеркаляції барвника в d(CG)-сайт тетраміру.



Мал.3.Розрахована структура дільниці комплексу 1:2 ЕВ з 5'-d(GpCpGpC), відповідаюча інтеркаляції барвника в d(CG)-сайт тетра nukлеотиду: а) вид на комплекс збоку із сторони широкої канавки спіральної дільниці; б) вид на комплекс зверху.

Розрахунки показали, що найбільш сильний вплив на скручування окремих протонів ЕВ оказує віддаль між парами основ в інтеркальованих комплексах D_2 та кут спірального обертання Ω (табл.2). Великі значення індукованих хімічних зсувів протонів ЕВ в 1:1 комплексах свідчать про те, що віддаль між площинами основ цитозину і гуаніну в комплексах барвника з поодинокую ниткою менше, ніж в комплексах з подвійною спіраллю.

Взаємодія ЕВ з 5'-d(ApGpCpT) та 5'-d(ApCpGpT). Аналіз концентраційних залежностей показав, що використання для CG-вміщуючих тетра nukлеотидів схема (1) не дає в цьому випадку задовільного узгодження з експериментом. Адекватною виявилась схема (3), в якій передбачена можливість утворення комплексу 1:2 ЕВ з тетра nukлеотидами двома різними засобами - безпосереднє зв'язування барвника з дуплексом та формування цього комплексу шляхом взаємодії мономера тетра nukлеотиду з 1:1 комплексом, де ЕВ грає роль "скріпки":



Необхідність урахування "скріпочного" комплексу обмовлена

тим, що рівноважні константи самоасоціації тетрамірів, маючих кінцеві А-Т пари, суттєво нижче, ніж K_N для С-С вміщаючих тетра-нуклеотидів. Значення розрахованих рівноважних констант для відповідних комплексів показані в таблиці 1. З табл.1 видно, що константи $K_3 < K_1$ і $K_4 < K_2$, то б то зв'язування другої молекули бромістого етидія як з поодинокую ниткою, так і з дуплексом тетра-нуклеотидів має антикооперативний характер. Що торкається імовірності вбудування ЕВ безпосередньо в дуплекс, то вона суттєво відрізняється для обох досліджених тетра-нуклеотидів (табл.1). Цей результат свідчить про існування селективного зв'язування ЕВ з піримідин-пуринової (СG) послідовністю основ у ланцюгу. При цьому порівняння констант K_2 для всіх досліджень дезокситетрануклеотидів дозволяє зробити висновок, що імовірність зв'язування бромістого етидія з (СG)-сайтом залежить від нуклеотидів, фланкіруючих місце посадки барвника. Розрахункові значення індуктованих хімічних зсувів протонів ЕВ $\Delta\delta_2$ та $\Delta\delta_5$ в 1:2 комплексах з дослідженими тетра-нуклеотидами близькі між собою. Це свідчить про те, що геометрія 1:2 комплексу не залежить від того, яким шляхом йшло його утворення. Аналіз геометрії молекулярних комплексів ЕВ з d(ACGT) та d(AGCT) (див.табл.2), показав, що структури 1:2 комплексів близькі до тих, які спостерігаються при інтеркаляції барвника в дуплекси тетра-нуклеотидів d(СpGpСpG) та d(GpСpGpC), тобто несуттєво залежать від послідовності основ та від того, які нуклеозиди фланкірують дільницю зв'язування з лігандом. Разом з тим, характер нуклеотидної послідовності суттєво впливає на імовірність утворення таких структур у розчині.

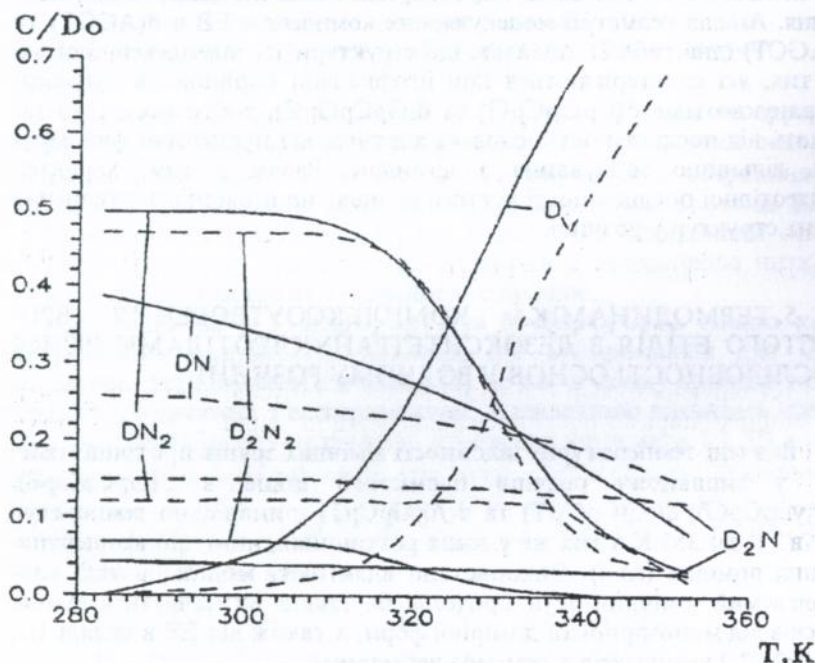
5. ТЕРМОДИНАМІКА КОМПЛЕКСОУТВОРЕННЯ БРО-МІСТОГО ЕТІДІЯ З ДЕЗОКСИТЕТРАНУКЛЕОТИДАМИ РІЗНОЇ ПОСЛІДОВНОСТІ ОСНОВ У ВОДНОМУ РОЗЧИНІ

Вивчені температурні залежності хімічних зсувів протонів молекул у змішаному розчині бромістого етидія з d(GpСpGpC), d(СpGpСpG), d(ApСpGpT) та d(ApGpСpT) у діапазоні температур від 283 К до 353 К в тих же умовах розчинника, що і при концентраційних вимірах (гл.4). Використано аддитивну модель, в якій спостерігасний хімічний зсув протонів барвника визначається сумою внесків від мономерної та димерної форм, а також від ЕВ в складі 1:1, 2:1, 1:2 і 2:2 комплексів з тетра-нуклеотидами

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

Функцію температури при цьому є мольні частки f_m, f_d, f_k ($k=1,2,3,4$) усіх компонентів у розчині. Знаходження мольних часток при різних температурах дозволяє визначити і температурну залежність рівноважних констант $K_1 + K_4$. Термодинамічні параметри комплексоутворення ΔH (ентальпія) та ΔS (ентропія) розраховувались двома засобами.

ЗАСІБ 1. Облікова методика передбачає використання параметричних регресійних рівнянь для опису залежності мольних долей від температури. Для комплексів EB з дуплексами тетрануклеотидів (DN_2, D_2N_2) були використані залежності, враховуючі кооперативний характер температурних перетворень в цих асоціатах у розчині. Залежності відносного вмісту C/D_0 різноманітних комплексів у розчині EB з $d(GCGC)$ та $d(CGCG)$ від температури представлено на мал.4.



Мал.4. Розрахункові залежності мольних долей від температури EB (D) і комплексів барбітурату з тетрануклеотідами $5'-d(GpCpGpC)$ (суцільні лінії) та $5'-d(CpGpCpG)$ (пунктирні лінії)

При низьких температурах барвник, в основному, знаходиться у зв'язаному стані. Доля 1:1 комплексів EB з тетра nukлеотідами залишається значною аж до високих температур $\approx 353\text{K}$, в той час як доля комплексів 2:1 достатньо мала у всьому дослідженому діапазоні температур. Температурні залежності 1:2 та 2:2 комплексів мають характерний вид кривих плавлення для двохспіральных олігонуклеотидів.

Найбільшу температуру переходу ($T_{\text{пл.}} \approx 334\text{K}$) має 1:2 комплекс барвника з d(CGCG) в той час як подібний комплекс з d(AGCT) володіє найменшою тепловою стабільністю ($T_{\text{пл.}} \approx 310\text{K}$). Комплекси вивчених тетра nukлеотидів і в мономерній і в дуплексній формі з двома молекулами бромістого етидія з менш міцним, чим відповідні комплекси з одною молекулою барвника. У цьому засобі використано формалізм Вант-Гоффа для визначення термодинамічних параметрів комплексоутворення молекул. Знайдені значення параметрів наведені у таблиці 3.

ЗАСІБ 2. За цим засібом рівноважні константи комплексоутворення та самоасоціації молекул, що входять у вираз для спостережасмого хімічного зсуву (2), виражались через параметри ΔH^0 та ΔS^0 у виді $K(T) = \exp(\Delta S^0/R - \Delta H^0/RT)$. Питомі термодинамічні параметри (ΔH^0 и ΔS^0) визначались шляхом мінімізації функціонала нев'язки експериментальних та розрахункових значень $\delta(T)$. Результати розрахунків засобом 2 також наведено у табл.3. Істотно, що термодинамічні параметри, знайдені двома різними засобами, в межах погрішності їх визначення добре узгоджуються один з одним. Великі мінусові значення ΔH для 1:1 комплексів можуть визначатись стекінг-взаємодією азотистих основ та хромофора барвника, а також електростатичною взаємодією між катіоном барвника та мінусовим зарядом фосфатних груп нуклеотидів. При формуванні 1:2 комплексів EB з тетра nukлеотідами основний внесок в мінусові значення термодинамічних параметрів вносять дисперсійні сили. Суттєву роль грають і гідрофобні взаємодії при зв'язуванні барвника з дуплексом. На основі проведеного аналізу можна зробити висновок, що виборче зв'язування бромістого етидія з піримідін-пуринової послідовністю основ обумовлена, головним чином, різноманітними конформаційними перебудовами тетра nukлеотидів при інтеркаляції барвника.

Таблиця 3

Термодинамічні параметри ΔG , ΔH (кДж/моль)
та ΔS (Дж/моль·К) реакцій комплексоутворення
бромистого етідія з дезокситетрануклеотідами

Комп- лекс	МЕТОД I			МЕТОД II	
	$\Delta G_{(298)}$	ΔH	$\Delta S_{(298)}$	ΔH^0	ΔS^0
5'-d(GpCpGpC)+EB					
1:1	-(25.9 ± 1.4)	-(100 ± 5)	-(250 ± 18)	-(100 ± 19)	-(249 ± 51)
2:1	-(19.7 ± 1.9)	-(60 ± 13)	-(136 ± 42)	-(83 ± 18)	-(213 ± 48)
1:2	-(31.1 ± 1.3)	-(83 ± 15)	-(174 ± 49)	-(94 ± 15)	-(210 ± 33)
2:2	-(18.1 ± 1.7)	-(90 ± 30)	-(243 ± 93)	-(110 ± 31)	-(308 ± 82)
5'-d(CpGpCpG) + EB					
1:1	-(28.1 ± 1.1)	-(104 ± 4)	-(254 ± 19)	-(133 ± 27)	-(346 ± 70)
2:1	-(25.2 ± 2.1)	-(71 ± 6)	-(154 ± 18)	-(79 ± 19)	-(178 ± 45)
1:2	-(29.9 ± 1.9)	-(78 ± 5)	-(160 ± 15)	-(69 ± 14)	-(131 ± 28)
2:2	-(31.6 ± 0.9)	-(107 ± 3)	-(253 ± 13)	-(100 ± 23)	-(234 ± 53)
5'-d(ApGpCpT) + EB					
1:1	-(21.4 ± 1.1)	-(108 ± 5)	-(280 ± 20)	-(131 ± 26)	-(357 ± 86)
2:1	-(20.0 ± 2.0)	-(114 ± 23)	-(306 ± 61)	-(106 ± 21)	-(279 ± 61)
1:2	-(23.2 ± 2.1)	-(82 ± 16)	-(190 ± 38)	-(75 ± 15)	-(168 ± 25)
5'-d(ApCpGpT) + EB					
1:1	-(23.0 ± 1.2)	-(95 ± 5)	-(234 ± 16)	-(110 ± 21)	-(284 ± 68)
2:1	-(19.0 ± 1.7)	-(86 ± 8)	-(216 ± 41)	-(94 ± 18)	-(244 ± 54)
1:2	-(23.9 ± 2.2)	-(67 ± 13)	-(140 ± 40)	-(79 ± 12)	-(179 ± 27)
2:2	-(19.8 ± 2.0)	-(124 ± 21)	-(339 ± 68)	-(115 ± 32)	-(311 ± 81)

ОСНОВНІ РЕЗУЛЬТАТИ ТА ВИСНОВКИ

В заключенні сформульовані основні результати та висновки одержані в дисертаційній роботі:

1. Вивчення самоасоціації фенантридного барвника бромістого етидія та антибіотика актиноміцина D, а також дезокситетрануклеотидів d(GCGC), d(CGCG), d(AGCT) та d(CGCG) виявило наступні основні закономірності: в димірних комплексах ароматичних лігандів має місце антипаралельна орієнтація хромофорів молекул, при цьому взаємна орієнтація хромофорів суттєво залежить від характеру їх бокових груп; найбільшу термічну стабільність серед досліджених дезокситетрануклеотидів має дуплекс $[(d(CpGpCpG))]_2$. Виявлені на основі кооперативної та некооперативної моделей взаємодії молекул барвників рівноважні константи, параметри кооперативності, термодинамічні характеристики реакцій, значення граничних хімічних зсувів протонів молекул в мономерних та асоціаціях.

2. Встановлено переважну взаємодію бромістого етидія з піримідин-пуриноюю послідовністю основ у тетрануклеотидному дуплексі, при цьому міцність зв'язування ліганда зменшується в наступному ряду: $d(CGCG) > d(GCGC) > d(ACGT) > d(AGCT)$. Виявлено селективне зв'язування бромістого етидію з піримідин-пуриновими сайтами одноланцюгової тетрануклеотидної послідовності, інтенсивність якої залежить від виду основ фланкуючих місця переважної посадки ліганда. Показано, що вміст різного типу комплексів у розчині суттєво залежить від співвідношення початкових концентрацій взаємодіючих молекул та послідовності основ у ланцюгу дезокситетрануклеотидів.

3. Розроблено методику розрахунку структур комплексів барвників з тетрануклеотидами по граничним значенням протонних хімічних зсувів взаємодіючих молекул. Вперше визначено просторові структури молекулярних комплексів 1:2 та 2:2 у розчині бромістого етидія з дуплексами дезокситетрануклеотидів різноманітної послідовності основ, встановлено геометричні особистості комплексів молекул та проведено порівняльний їх аналіз. Показано, що структури 1:2 комплексів, утворених шляхом інтеркаляції EB у CG дільниці досліджених тетрануклеотидів, практично не залежать від нуклеозидів, фланкуючих дільницю зв'язування з лігандом, однак, характер нуклеотидної послідовності суттєво впливає на розміри рівноважних констант комплексоутворення, а, отже, і на ймовірність утворення таких структур у розчині. Одержані результати свідчать про те, що обраність зв'язування бромістого етидія з піримідин-пуриноюю послідовністю викликана головним чином різноманітними конформаційними перебудовами тетрануклеотидів при інтеркаляції барвника.

4. Порівняльний аналіз комплексоутворення досліджених дезокситетрануклеотидів з інтеркаліруючими лігандами - бромістим етидієм та профлавіном дозволяє зробити висновок, що характерні закономірності рівноваги молекулярних асоціатів у розчині, імовірні типи утворюючихся комплексів є східними для ароматичних лігандів. Разом з тим, особливості хімічної структури інтеркаліруючих лігандів в значному ступені визначають специфіку їх зв'язування як з поодинокими, так і з двоспиральною формами нуклеотидних послідовностей.

5. Запропонована методика аналізу температурних залежностей хімічних зсувів протонів ліганда, дозволяюча диференціювати вклади різних реакцій комплексоутворення у сумарні теплові та ентропійні ефекти при взаємодії барвника з дезокситетрануклеотидами у розчині. Визначено термодинамічні параметри - ентальпії (ΔH), ентропії (ΔS), вільні енергії Гіббса (ΔG) для комплексів 1:1, 2:1, 1:2 та 2:2 бромістого етидія з дезокситетрануклеотидами. Порівняння значень ΔH та ΔS реакцій комплексоутворення барвника з одно- та двохланцюговими дезокситетрануклеотидами свідчить про більш суттєвий вплив гідрофобних взаємодій при зв'язуванні ліганду з дуплексами олігонуклеотидів.

Головні результати дисертації опубліковано у таких роботах:

1. Веселков А.Н., Дымант Л.Н., Барановский С.Ф., Болотин П.А., Паркес Х.Е., Дэвис Д. Исследование самоассоциации бромистого этидия в водном растворе методом ^1H -ЯМР-спектроскопии //Химическая физика.-1994.-Т. 13, № 11.- С.70-78.

2. Веселков А.Н., Дымант Л.Н., Барановский С.Ф. , Болотин П.А. и др. Исследование самоассоциации антибиотика актиномицина D в водном растворе методом ^1H -ЯМР-спектроскопии //Журн. структурн. химии.- 1995.-Т. 36., № 1 - С.81-88.

3. Веселков А.Н., Дымант Л.Н., Болотин П.А., Барановский С.Ф., Паркес Х., Дэвис Д. Исследование взаимодействия бромистого этидия с дезокситетрарибонуклеозидтрифосфатом 5'-d(GpCpGpC) методом ^1H -ЯМР-спектроскопии // Молекулярная биология.- 1995. - Т.29, Вып.2. - С.326-337.

4. Веселков А.Н., Дымант Л.Н., Болотин П.А., Барановский С.Ф. и др. Исследование комплексообразования бромистого этидия с самокомплементарным дезокситетрануклеотидом 5'-d(ApGpCpT)

методом одномерной и двумерной ^1H ЯМР-спектроскопии //Биофизика. – 1995.Т.40, Вып.6. – С.1189-1201.

5. Веселков А.Н., Дымант Л.Н., Болотин П.А., Барановский С.Ф. и др. Исследование взаимодействия бромистого этидия с самокомплементарным дезокситетрануклеотидом 5'-d(АрСрСрТ) в водном растворе методом ^1H -ЯМР спектроскопии //Биополимеры и клетка. – 1995. – Т.11, № 3,4. – С.42-54.

6. Веселков А.Н., Дымант Л.Н., Болотин П.А., Барановский С.Ф., Дэвис Д. Термодинамика взаимодействия фенантридинового красителя бромистого этидия с дезокситетрануклеотидом 5'-d(АрСрСрТ) //Биополимеры и клетка – 1995.– Т.11, № 5. – С.37-45.

7. Болотин П.А., Завьялова О.С., Веселков Д.А., Веселков А.Н. ^1H -ЯМР структурный и термодинамический анализ самоассоциации ароматических лигандов в водном растворе //Вестник СевГТУ –1996. –Вып.2. – С.31-36.

8. Веселков А.Н., Дымант Л.Н., Болотин П.А., Барановский С.Ф., Шипп Д., Дэвис Д. Исследование взаимодействия бромистого этидия с самокомплементарным дезокситетрануклеотидом 5'-d(СрСрСрС) в водном растворе методом ^1H -ЯМР-спектроскопии //Ж.структурн. химии. – 1996. – Т.37, № 1. – С.1243-1255.

9. Болотин П.А., Веселков А.Н. Самоассоциация дезокситетрарибонуклеотидов различной последовательности оснований в водном растворе //Вестник СевГТУ – 1996.– Вып.3 – С.42-47.

10. Веселков А.Н., Дымант Л.Н., Болотин П.А., Барановский С.Ф. и др. Термодинамический анализ взаимодействия бромистого этидия с дезокситетрарибонуклеотидом 5'-d(СрСрСрС) по данным протонного магнитного резонанса //Молекулярная биология. – 1996. – Т.30, Вып.1. – С.177-187.

11. Веселков А.Н., Барановский С.Ф., Дымант Л.Н., Болотин П.А., Паркес Х., Дэвис Д. Термодинамический анализ взаимодействия бромистого этидия с дезокситетрарибонуклеозидтрифосфатом 5'-d(АрСрСрТ) по данным ^1H ЯМР //Биофизика. – 1996. – Т.41.– С.

АННОТАЦИЯ

Болотин П.А. Молекулярный механизм селективного связывания ароматического лиганда с короткими фрагментами ДНК в водном растворе. На правах рукописи. Диссертация на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.25 - биофизика. Севастопольский государственный технический университет. г. Севастополь, 1997.

Методами одномерной и двумерной (2D-COSY и 2D-NOESY) ^1H - ЯМР спектроскопии (500 и 600 МГц) в растворе изучено комплексообразование ароматического лиганда-бромистого этидия с дезокситетрануклеотидами $5'$ -d(GpCpGpC), $5'$ -d(CpGpCpG), $5'$ -d(ApGpCpT) и $5'$ -d(ApCpGpT) различного нуклеотидного состава и последовательности. Разработана методика расчета параметров комплексообразования биологических молекул в водно-солевом растворе, которая предусматривает изучение самоассоциации ароматических лигандов и олигонуклеотидов в идентичных экспериментальных условиях. Определены термодинамические и структурные параметры самоассоциации фенантридинового красителя бромистого этидия и антибиотика актиномицина D, а также самокомплементарных дезокситетрануклеотидов. Рассчитаны структуры димерных комплексов исследованных ароматических лигандов. Определены равновесные константы образования различных комплексов EB с одно- и двухспиральными тетрануклеотидами в растворе. Установлено преимущественное взаимодействие EB с пиримидин-пуриновой CG последовательностью оснований как в двухцепочечных, так и одноцепочечных последовательностях олигонуклеотидов. Рассчитанные структуры интеркалированных комплексов EB с CG-сайтами последовательностей находятся в хорошем согласии с данными рентгеноструктурных исследований. Предложена методика анализа температурных зависимостей химических сдвигов протонов лиганда, позволяющая дифференцировать вклады различных реакций комплексообразования в суммарные тепловой и энтропийный эффекты при взаимодействии красителя с дезокситетрануклеотидами в растворе. Определены термодинамические параметры - энтальпии, энтропии и свободные энергии Гиббса для комплексов 1:1, 2:1, 1:2, и 2:2 EB с дезокситетрануклеотидами. Анализ показывает, что селективность связывания EB определяется в основном различными конформационными перестройками тетрануклеотидов при интеркаляции красителя.

SUMMARY

Bolotin P.A. Molecular mechanism of selective binding of aromatic ligand with short fragments of DNA in aqueous solution. Allrights reserved. Thesis for a Candidate's degree of Physical and Mathematical Sciences in Biophysics- Speciality 01.04.25. Sevastopol State Technical University, Sevastopol, 1997.

Complexation of the trypanocidal drug, ethidium bromide (EB), and the self-complementary deoxytetranucleotides, 5'-d(GpCpGpC), 5'-d(CpGpCpG), 5'-d(ApGpCpT) and 5'-d(ApCpGpT) of different base composition and sequence, in aqueous salt solution has been investigated using one-dimensional and two-dimensional (2D-COSY and 2D-NOESY) 500/600 MHz ¹H-NMR spectroscopy. A method of calculation of parameters of complex formation between biological molecules in aqueous solution has been developed which envisages the study of self-association of aromatic ligands and oligonucleotides under the same experimental conditions. Thermodynamical and structural parameters of self-association of phenanthridine drug EB, antibiotic actinomycin D and deoxytetranucleotides have been determined. The most favourable structures of dimer complexes of aromatic ligands have been calculated. Equilibrium constants of different complexes formation between EB and single- and double-stranded tetranucleotides in solution have been determined. It has been found that EB binds preferentially to the pyrimidine-purine CG-sites both in double-stranded and single-stranded oligonucleotides. The calculated intercalated complex of EB with CG-sites of deoxytetranucleotides studied are in good agreement with X-ray crystallographic measurements. A method has been developed for analysis of the temperature dependences of proton chemical shifts of the ligand, enabling the contributions for the formation of different types of complexes to the total thermal and entropy effects of drug complexation with deoxytetranucleotides in solution to be differentiated. The thermodynamical parameters-enthalpies, entropies and Gibbs free energies for 1:1, 2:1, 1:2 and 2:2 complexes between EB and deoxytetranucleotides have been determined. Analysis has shown that selective binding of EB is mainly determined by different reorganizations of the tetranucleotides conformations on drug intercalation.

Ключевые слова

Нуклеїнова кислота, ДНК, самоасоціація, комплексоутворення, інтеркаляція, бромістїї етідії (ЕВ), тетрануклеотід, ЯМР-спектроскопія, термодинамічні параметри, рівноважні константи, хімічні зсуви, ліганди.

АВ 37.129
АВ 37.129

Наукове видання

Болотін Петро Андрійович

МОЛЕКУЛЯРНИЙ МЕХАНІЗМ СЕЛЕКТИВНОГО ЗВ'ЯЗУВАННЯ АРОМАТИЧНОГО ЛІГАНДУ З КОРОТКИМИ ФРАГМЕНТАМИ ДНК У ВОДНОМУ РОЗЧИНІ

Сдано в набір 14.02.97 г. Подп. в печать 18.02.97г. Формат 60x 90/16.
Бум. тип. № 2. Офс. печ. Усл. п.л. 1,5. Тираж 100 экз. Заказ № 20.

Издательство "СевГТУ", Севастополь, 53, Стрелецкая балка, Студгородок, НМЦ.