

УДК 577.113

А.Н. ВЕСЕЛКОВ, Р.ДЖ. ИТОН, С.Ф. БАРАНОВСКИЙ, С.Г. ОСЕТРОВ, П.А. БОЛОТИН,
Л.Н. ДЫМАНТ, В.И. ПАХОМОВ, Д.Б. ДЭВИС

**КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ АНТИБИОТИКА ДАУНОМИЦИНА
С ДЕЗОКСИТЕТРАРИБОНУКЛЕОЗИДТРИФОСФАТОМ
5'-d(CpGpCpG) В ВОДНОМ РАСТВОРЕ**

Представлены результаты исследования комплексообразования антибиотика дауномицина с дезокситетрануклеотидом 5'-d(CpGpCpG) в водно-солевом растворе методом одномерной и двумерной (2M-TOCSY и 2M-NOESY) ^1H ЯМР спектроскопии (500 МГц). Измерены концентрационные и температурные зависимости протонных химических сдвигов молекул, на основании которых рассчитаны равновесные константы реакций, относительное содержание различных типов комплексов в зависимости от концентраций и температуры, предельные значения химических сдвигов протонов дауномицина в составе различных комплексов и термодинамические параметры ΔH и ΔS комплексообразования молекул. Анализ полученных результатов позволяет сделать вывод о том, что местами преимущественной посадки дауномицина являются триплетные нуклеотидные последовательности. Связывание второй молекулы дауномицина как с одноцепочечной, так и с дуплексной формой тетрамера носит выраженный антикооперативный характер, что объясняется наличием у антибиотика положительно заряженного аминокислотного остатка, создающего стерические препятствия для посадки второй молекулы антибиотика на короткую тетра-нуклеотидную последовательность. По расчетным значениям индуцированных химических сдвигов протонов дауномицина и данным 2M-NOE построена наиболее вероятная пространственная структура 1:2-комплекса антибиотика с дезокситетрануклеотидом.

ВВЕДЕНИЕ

Дауномицин является противоопухолевым препаратом антрациклиновой группы антибиотиков, в молекулярной структуре которых содержится тетрагидротетраценхинонный хромофор из четырех компланарных шестичленных колец (рис. 1). Химиотерапевтическая эффективность дауномицина связана с его способностью взаимодействовать с ДНК и ингибировать при этом синтез ДНК и РНК [1,2].

Известно, что антрациклиновый антибиотик дауномицин не проявляет столь явной и однозначной сиквенс-специфичности при взаимодействии с ДНК, как это имеет место для ряда других интеркалирующих лигандов [3]. Данные о селективном связывании дауномицина с синтетическими дезоксиолигонуклеотидами довольно проти-

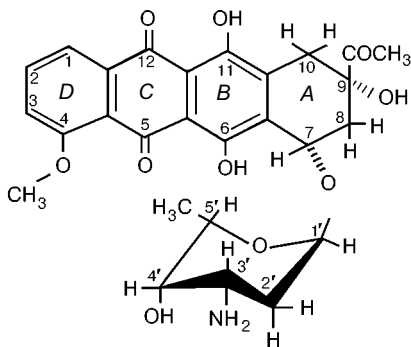


Рис. 1. Структурная формула молекулы дауномицина

воречивы [4], и можно лишь сделать вывод о том, что антибиотик дауномицин преимущественно связывается с полинуклеотидами, содержащими чередующиеся пурин-пиримидиновые (pur-pur) последовательности оснований в цепи [5]. Теоретические исследования [6, 7] сиквенс-специфичности взаимодействия дауномицина с ДНК также дают противоречивые результаты. Так, моделирование взаимодействия антибиотика с тетрамерными дуплексами ДНК [6] свидетельствует о преимущественной интеркаляции лиганда в pur-pur-участки, при этом энергетически наиболее выгодное связывание дауномицина происходит в *d*(TrA)-сайты дезокситетрануклеотидов. Результаты теоретических расчетов для гексамерных дуплексов ДНК [7] позволяют сделать заключение о том, что в качестве специфических мест посадки дауномицина выступают триплетные последовательности, при этом оптимальный участок включает АТ-пару оснований. Экспериментальные исследования, проведенные с нативной ДНК в растворе [8], свидетельствуют о наличии GC-пар оснований в местах преимущественного связывания дауномицина. В работе [9] показано, что местами преимущественной посадки антибиотика дауномицина являются триплеты, содержащие две соседние GC-пары оснований различной последовательности, фланкированные АТ-парой оснований. Однако требование наличия А или Т оснований с 5'-конца триплета не абсолютно — три последовательные GC-пары в цепи являются также допустимыми местами связывания дауномицина в олигонуклеотиде [9].

В настоящей работе методом одномерной и двумерной ^1H ЯМР спектроскопии (500 МГц) исследовано комплексообразование антрациклинового антибиотика дауномицина с дезокситетрануклеотидом 5'-*d*(CpGpCpG) в водном растворе.

Выбор олигонуклеотида в настоящей работе обусловлен тем, что тетрамер имеет один pur-pur-сайт (*d*(G-C)-сайт) и два pur-pur *d*(C-G)-сайта в последовательности. При этом рассматриваемый дезокситетрануклеотид содержит триплетные последовательности, соответствующие местам преимущественного связывания антибиотика, обнаруженным в работе [9]. Особенности динамического равновесия молекул в растворе, возможные типы комплексов дауномицина с дезокситетрануклеотидом и их структуры определяли на основе исследования концентрационных зависимостей протонных химических сдвигов взаимодействующих молекул и двумерных спектров НОЕ. Термодинамические характеристики реакций комплексообразования дауномицина с тетрамером рассчитывали из температурных зависимостей химических сдвигов молекул в растворе. Отметим, что ЯМР спектроскопия имеет определенные преимущества в сравнении с калориметрическими и оптическими исследованиями комплексов молекул, поскольку дает возможность детализировать многокомпонентные реакции в растворе и дифференцировать вклады различных реакций комплексообразования в суммарные тепловой и энтропийный эффекты взаимодействия молекул в растворе [10, 11]. Ранее [10, 11] в тех же экспериментальных условиях, что и в настоящей работе, изучено связывание акридинового красителя профлавина и фенантридинового красителя бромистого этидия с рассматриваемым дезокситетрануклеотидом 5'-*d*(CpGpCpG) методом ^1H ЯМР спектроскопии. Сравнительный анализ структур комплексов, а также термодинамических параметров комплексообразования интеркалирующих лигандов различной химической структуры с одинаковыми фрагментами ДНК в идентичных экспериментальных условиях важен для выяснения природы сиквенс-специфичности связывания лигандов с определенными нуклеотидными последовательностями.

МЕТОДИКА

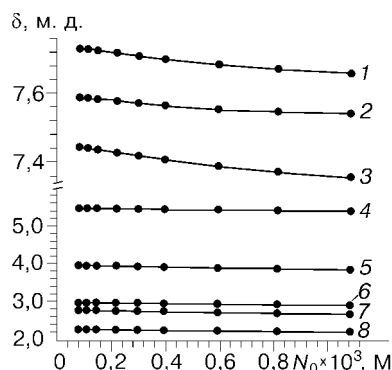
Дауномицин ("Sigma") использовали без дополнительной очистки, лиофилизировали из D₂O с изотопной чистотой 99,95 % D и растворяли в дейтерированном 0,1 М фосфатном буфере (pD 7,1), содержащем 10⁻⁴ моль/л ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота). Концентрацию антибиотика определяли спектрофотометрически — для дауномицина коэффициент экстинкции $\epsilon = 11500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ($\lambda=480 \text{ nm}$) [12, 13]. Дезокситетрарибонуклеозидтрифосфат 5'-d(CpGpCpG) синтезирован компанией OSWEL DNA SERVICE (Великобритания). Образцы олигонуклеотида также лиофилизировали из D₂O и растворяли в дейтерированном 0,1 М фосфатном буфере, содержащем 10⁻⁴ моль/л ЭДТА. 1М- и 2М- ¹H ЯМР-спектры измерены на спектрометре "Bruker DRX" с резонансной частотой 500 МГц. Химические сдвиги необменивающихся протонов измеряли относительно внутреннего стандарта ТМА (бромид тетраметиламмония). Методика приготовления образцов и проведения эксперимента описана в [11, 14]. Концентрационные измерения протонных химических сдвигов молекул выполнены при двух температурах (303 и 323 К) в интервале концентраций тетрауклеотида от 1,62 до 0,05 ммоль/л и постоянном процентном содержании дауномицина в растворе ($\approx 0,86 \text{ ммоль/л}$). Температурные зависимости химических сдвигов протонов молекул в смешанном растворе измерены в диапазоне температур от 283 до 333 К. Двумерные гомоядерные TOCSY, NOESY и ROESY эксперименты, использованные для отнесения сигналов необменивающихся протонов молекул и для качественного определения характера комплексообразования антибиотика с олигонуклеотидом, проводили при $T=303 \text{ K}$. Для изучения поведения резонансов обменивающихся протонов, в частности имино-протонов GC-пар оснований, измерения ПМР спектров делали в растворах, содержащих 90 % H₂O и 10 % D₂O с использованием специальной последовательности импульсов, предложенной в работе [15], для подавления резонансного пика растворителя. Температура образца в процессе эксперимента поддерживалась с помощью терморегулятора BVT-3000.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Предварительно выполненное отнесение сигналов протонов дауномицина [16] и исследуемого дезокситетрануклеотида [17] позволило провести отождествление спектров смешанных растворов и выявить возможные связи ядер молекул антибиотика и тетрамера. В спектрах 2М-NOESY и 2М-ROESY таких растворов, полученных при различных временах смешивания ($\tau_{m1}=90 \text{ ms}$ и $\tau_{m2}=200 \text{ ms}$), наблюдается лишь небольшое количество межмолекулярных кросс-пиков между протонами дауномицина и тетрамера, как это имеет место и при исследовании связывания интеркалирующих лигандов — профлавина и бромистого этидия с данным дезокситетрануклеотидом [10, 11]. Так, в спектре 2М-NOE раствора дауномицина с тетрамером 5'-d(CGCG) наблюдаются межмолекулярные кросс-пики между протонами H2', H2'' аминсахарного остатка антибиотика и протонами H1'(C3) цитозина, что позволяет сделать заключение о преимущественной интеркаляции хромофора антибиотика в pur-pur-сайт d(C1-G2) в начале тетрауклеотидной последовательности.

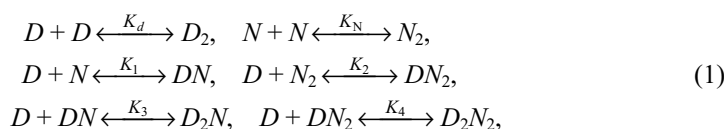
Количественная оценка взаимодействия дауномицина с дезокситетрануклеотидом проводилась, как и ранее [10, 11], на основе анализа экспериментальных концентрационных зависимостей химических сдвигов протонов молекул при различных температурах (рис. 2). Рассмотрено динамическое равновесие, включающее как образование различного типа комплексов антибиотика с тетрамером,

Рис. 2. Экспериментальные концентрационные зависимости химических сдвигов необменивающихся протонов дауномицина в растворе с дезокситетрануклеотидом 5'-d(CGCG) при $T = 323$ К, $D_0 = 0,861 \cdot 10^{-3}$ М:
1 — Н1, 2 — Н2, 3 — Н3, 4 — Н1', 5 — ОСН₃, 6 — Н10e, 7 — Н10a, 8 — Н8a



так и реакции ассоциации молекул. По условиям эксперимента константа димеризации K_d дауномицина принята равной 290 и 125 л/моль при $T_1 = 303$ К и $T_2 = 323$ К соответственно [16].

В общей схеме взаимодействия молекул учтены следующие равновесные реакции в растворе:



где D и N — концентрации мономеров дауномицина и тетрануклеотида. При расчете по этой схеме наблюдаемый протонный химический сдвиг в молекуле антибиотика представлен в виде [10, 11]

$$\delta = D/D_0(\delta_m + 2K_dD\delta_d + K_1N\delta_1 + K_NK_2N^2\delta_2 + 2K_1K_3DN\delta_3 + 2K_NK_2K_4DN^2\delta_4). \quad (2)$$

Минимизацию функционала невязки проводили по восьми параметрам: δ_1 — δ_4 — предельные значения химических сдвигов протонов антибиотика в составе 1:1-, 1:2-, 2:1- и 2:2-комплексов, K_1 — K_4 — равновесные константы соответствующих типов комплексов. Детальное описание вычислительной процедуры нахождения параметров изложено в предыдущих работах [10, 11]. Отметим, что рассматриваемая модель (2) предполагает достаточно быстрый обмен в равновесных реакциях комплексообразования. Проведенные в настоящей работе ЯМР эксперименты свидетельствуют об отсутствии существенного уширения резонансных сигналов протонов во всем исследованном диапазоне концентраций и температур. Это подтверждает допустимость использования аддитивной модели при описании зависимости наблюдаемых протонных химических сдвигов от концентрации и температуры.

Полученные в результате расчетов значения равновесных констант K_1 — K_4 представлены в табл. 1. Важно отметить, что расчетные значения констант ком-

Т а б л и ц а 1

Расчетные значения равновесных констант и термодинамических параметров ΔH , ΔS реакций образования комплексов дауномицина с дезокситетрануклеотидом 5'-d(CGCG) при температуре 303 К

Комплекс	$K_i, 10^3 \text{ M}^{-1}$	$-\Delta H, \text{ кДж/моль}$	$-\Delta S, \text{ Дж/(моль}\cdot\text{К)}$
1:1	$35,2 \pm 9,9$	$92,0 \pm 8,6$	217 ± 22
2:1	$5,9 \pm 2,5$	$45,7 \pm 14,7$	79 ± 25
1:2	580 ± 160	$47,6 \pm 8,4$	47 ± 8
2:2	$34,8 \pm 11,8$	$51,4 \pm 17,0$	83 ± 27

плексообразования дауномицина с дезокситетрануклеотидами, полученные нами исходя из концентрационных зависимостей протонных химических сдвигов молекул, измеренных в H_2O , совпадают (в пределах $\pm 10\%$) с приведенными в табл. 1. Таким образом, замена растворителя H_2O на D_2O не оказывает существенного влияния на поведение олигонуклеотидных последовательностей в растворе и их комплексообразование с ароматическими лигандами. Этот результат согласуется с выводами работы [18]. Значения констант K_1 — K_4 для реакций комплексообразования профлавина [10] и бромистого этидия [11] с тетрануклеотидом $5'-d(CGCG)$ в идентичных экспериментальных условиях существенно отличаются как в качественном, так и в количественном отношении от значений в табл. 1. Обращает на себя внимание то, что вероятность образования в растворе комплекса 1:2 дауномицина с $5'-d(CGCG)$, характеризуемая константой K_2 , существенно выше, чем других комплексов в водном растворе. При этом величина константы K_2 примерно на порядок превышает соответствующие значения констант для реакций образования подобного типа комплексов между тетрануклеотидом и бромистым этидием [11] и на два порядка — комплекса с акридиновым красителем профлавином [10]. В отличие от сравнительно простых интеркаляторов — профлавина и бромистого этидия, хромофоры которых не содержат массивных боковых групп или цепей, в структуре антибиотика дауномицина к тетрагидротетрацен-хинонному хромофору присоединено массивное положительно заряженное аминокислотное кольцо, которое располагается при связывании антибиотика с ДНК в ее малой бороздке [19, 20]. Это определяет достаточно большой “параметр исключения” ($n = 3,3 \div 3,5$ пар оснований) в модели исключенного соседа [21], который был получен при исследовании взаимодействия дауномицина с ДНК методом спектрофотометрии [8, 22—24]. Можно предположить, что фактически параметр исключения имеет целочисленные значения (3 или 4) в зависимости от последовательности оснований в цепи ДНК [8]. Согласно данным рентгеноструктурного анализа [19, 20] аминокислотный остаток, расположенный в малой бороздке ДНК, частично блокирует третью пару оснований. Кроме того, конформационные изменения в двойной спирали, связанные с интеркаляцией дауномицина, могут препятствовать встраиванию антибиотика в соседние с участком интеркаляции сайты последовательности ДНК [20]. Из табл. 1 видно, что значения равновесной константы K_4 , характеризующей вероятность образования в растворе комплекса 2:2 дауномицина с дезокситетрануклеотидом, довольно низкие, т.е. связывание второй молекулы антибиотика с дуплексом тетрамера имеет явно антикооперативный характер. Этот факт с учетом данных 2M-NOESY и результатов по комплексообразованию ароматических красителей профлавина и бромистого этидия с дезокситетрануклеотидами в идентичных экспериментальных условиях [10, 11] однозначно свидетельствует о том, что местами преимущественной посадки антибиотика дауномицина являются как минимум триплетные нуклеотидные последовательности. Полученный результат находится в согласии с экспериментальными исследованиями сиквенс-специфичности связывания дауномицина с ДНК в водном растворе [9]. По-видимому, селективность связывания дауномицина, главным образом, определяется наличием GC-пар оснований в триплете, образованием водородных связей между дауномицином и соседними основаниями гуанина и цитозина в интеркалированном комплексе [19, 20].

Значение равновесной константы K_3 образования 2:1-комплексов дауномицина с одноцепочечным дезокситетрануклеотидом существенно ниже, чем 1:1-комплексов (см. табл. 1), т.е. связывание второй молекулы антибиотика с тетрамером в мономерной форме имеет явно антикооперативный характер. Это, очевидно,

Рис. 3. Зависимости относительного содержания мономеров и димеров дауномицина и комплексов антибиотика с 5'-d(CGCG) в водном растворе от $r = N_2/D_0$ при $T = 303$ К и $D_0 = 0,861 \cdot 10^{-3}$ М:
1 — D, 2 — D₂, 3 — DN₂, 4 — DN, 5 — D₂N₂, 6 — D₂N

определяется наличием у хромофора антибиотика массивного положительно заряженного аминокислотного остатка, создающего определенные стерические препятствия при посадке второй молекулы дауномицина на короткую тетрауклеотидную последовательность.

По значениям констант равновесия (см. табл. 1) было рассчитано относительное содержание молекулярных комплексов f в зависимости от $r = N_2/D_0$ (отношения концентраций дезокситетрануклеотида в дуплексе к исходной концентрации дауномицина). На рис. 3, где приведены эти зависимости, видно, что вклад в общее равновесие различного типа комплексов определяется не только значениями равновесных констант реакций, но также и величиной r . Относительное содержание комплексов 1:1 и 2:1 дауномицина с одной нитью тетрауклеотида оказывается довольно значительным при малых r ($r < 0,5$), в то время как доля комплекса 1:2 становится преобладающей при $r > 0,8$. Как отмечалось и ранее [10, 11], максимумы концентрационных кривых комплексов 1:1, 2:1 и 2:2 соответствуют значениям r , близким к стехиометрическим соотношениям исходных концентраций лиганда и тетрауклеотида для соответствующих типов комплексов. Анализ динамического равновесия образования комплексов молекул в растворе важен для определения вклада каждого типа комплекса в экспериментально наблюдаемый химический сдвиг и для надежного определения термодинамических параметров образования различных комплексов [11].

Термодинамические параметры реакций взаимодействия дауномицина с 5'-d(CGCG) определены, как и ранее [11, 25, 26], на основе экспериментальных температурных зависимостей химических сдвигов протонов дауномицина в растворе с тетрауклеотидом 5'-d(CGCG) (рис. 4) и аддитивной модели для наблюдаемого протонного химического сдвига антибиотика при различных температурах. Величины энтальпии (ΔH) и энтропии (ΔS) рассчитывались с использованием параметрических регрессионных уравнений для анализа зависимостей мольных долей от температуры и формализма Вант-Гоффа [11, 25, 26]. Полученные значения энтальпии и энтропии реакций дауномицина с дезокситетрануклеотидом

5'-d(CGCG) в растворе приведены в табл. 1. Видно, что ΔH реакций комплексообразования дауномицина с тетрауклеотидом имеют достаточно большие отрицательные значения. Как известно, экзотермические реакции характерны для процессов агрегации, включающих в себя стэкинг-

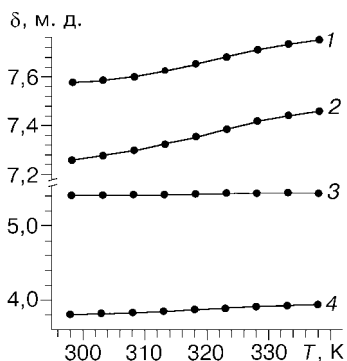
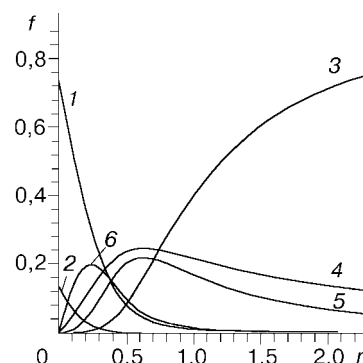


Рис. 4. Экспериментальные температурные зависимости химических сдвигов необмениваемых протонов дауномицина в водном растворе с 5'-d(CGCG) при $D_0 = 0,861 \cdot 10^{-3}$ М, $N_0 = 0,590 \cdot 10^{-3}$ М:
1 — H₂, 2 — H₃, 3 — H₁', 4 — OCH₃

взаимодействие ароматических систем с делокализованными π -электронами [8, 27, 28]. Установлено, что дисперсионное взаимодействие характеризуется как отрицательной энтальпией, так и отрицательной энтропией [29]. Вместе с тем согласно данным рентгеноструктурного анализа комплексов дауномицин—дезоксигуанукопептидов [19, 20] между антибиотиком и соседними основаниями в интеркалированном комплексе могут образовываться от трех до пяти водородных связей (Н-связей) [27]. По имеющимся в литературе данным энтальпия образования Н-связи в водной среде принимает значения от -8 до -13 кДж/моль [30]. При возникновении Н-связи следует ожидать также и отрицательного изменения энтропии [31]. Следовательно, можно считать, что основной вклад в отрицательные значения термодинамических параметров комплексообразования дауномицина с дезокситетранукопептидами вносят межмолекулярные взаимодействия — Н-связи и силы Ван-дер-Ваальса.

Положительный энтропийный вклад прежде всего определяется гидрофобными взаимодействиями, связанными с переносом молекулы антибиотика в место интеркаляции. В случае коротких олигонукопептидов, когда в растворе имеется сложное равновесие молекулярных ассоциатов, влияние тех или иных сил при формировании комплексов с одно- и двухцепочечными последовательностями может быть существенно различным. Значительный вклад от гидрофобных взаимодействий наблюдается в случае реакции образования комплексов 1:2 дауномицина с двухспиральными дезокситетранукопептидами, т.е. изменение энтропии при формировании таких комплексов заметно меньше по абсолютной величине, чем ΔS для других комплексов антибиотика с тетрамером (см. табл. 1). Можно предположить, что при связывании дауномицина с дуплексом дезокситетранукопептида его аминокислотное кольцо, располагаясь в малой бороздке двойной спирали, вытесняет имеющиеся там молекулы воды [32] и тем самым дает дополнительный положительный вклад в ΔS . Отметим при этом, что в комплексах 1:2 дауномицина с дезокситетранукопептидом достаточно весомый вклад в отрицательное значение ΔS может дать возрастание жесткости двухспиральной структуры при встраивании молекулы антибиотика [24]. Энтропия в этом случае уменьшается вследствие ограничения числа возможных конформационных состояний [31]. Связывание дауномицина сопровождается высвобождением противоионов [8], что практически не сказывается на величине энтальпии, но дает дополнительный положительный вклад в энтропию [33].

Из табл. 1 видно, что термодинамические параметры ΔH и ΔS образования комплекса 1:1 дауномицина с одноцепочечной тетраукопептидной последовательностью существенно выше по абсолютной величине, чем ΔH и ΔS связывания антибиотика с дуплексом тетрамера. Это, по-видимому, связано со значительно большими конформационными изменениями в одноцепочечной последовательности [34] и существенно меньшей ролью гидрофобных взаимодействий, дающих положительный вклад в ΔH и ΔS при комплексообразовании ароматических лигандов с однониточным олигонукопептидом по сравнению с двухспиральным [26]. Следует отметить, что качественно аналогичная картина для 1:1- и 1:2-комплексов имела место и при связывании ароматических молекул красителей профлавиона [25] и бромистого этидия [11] с дезокситетранукопептидом 5'-d(CGCG).

Значения энтальпии и энтропии образования комплекса 2:1 дауномицина с одноцепочечным дезокситетранукопептидом меньше по абсолютной величине, чем ΔH и ΔS для комплекса 1:1 (см. табл. 1). Можно предположить, что наблюдаемые различия определяются в основном стерическими факторами: местами преиму-

щественной посадки дауномицина являются триплетные нуклеотидные последовательности, при этом аминокислотный остаток частично блокирует третье азотистое основание в цепи тетрамера и тем самым ограничивает число возможных контактов второй молекулы антибиотика с нуклеотидной последовательностью. В случае же комплекса 2:2, когда две молекулы дауномицина взаимодействуют с дуплексом тетрамера, некоторое увеличение абсолютных значений ΔH и ΔS по сравнению с комплексом 1:2 возможно связано с тем, что вторая молекула дауномицина также по стерическим причинам присоединяется снаружи двойной спирали за счет стэкинг-взаимодействия между хромофором антибиотика и терминальной парой оснований тетрануклеотидного дуплекса. Следует отметить, что значения энтальпии и энтропии образования комплексов дауномицин—дезоксиолигонуклеотид, полученные в настоящей работе, хорошо согласуются с величинами ΔH и ΔS , определенными методом микрокалориметрии при исследовании связывания антибиотика с полимерной молекулой ДНК [27] и синтетическими полинуклеотидами с чередующимися типами (pur-pur, pur-pur) оснований в цепи [35].

СТРУКТУРЫ КОМПЛЕКСОВ

Индукцированные химические сдвиги протонов дауномицина $\Delta\delta_i = \delta_m - \delta_i$, где $i = 1, 2, 3, 4$, соответствуют типу комплекса (табл. 2) существенно меньше, чем рассчитанные величины $\Delta\delta_i$ для аналогичных комплексов исследованного тетрануклеотида с красителями профлавином и бромистым этидием [10, 11]. Относительно низкое экранирование необмениваемых протонов дауномицина в комплексах

с однопочечным и двухспиральным дезокситетрануклеотидом предполагает, что взаимная ориентация хромофора антибиотика и плоскостей пар оснований существенно отлична от наблюдаемой для ароматических молекул красителей профлавина и бромистого этидия. В частности, можно сделать заключение о том, что хромофор антибиотика ориентирован не параллельно, а перпендикулярно плоскостям пар оснований в спирали, как это имеет место в кристаллической структуре интеркалированного комплекса [19, 20]; необмениваемые протоны в *A* и *D* кольцах хромофора (см. рис. 1) располагаются при этом достаточно далеко от плоскостей пар оснований в интеркалированном комплексе и их экранирование невелико.

Анализ структуры 1:2-комплексов дауномицина с дезокситетрануклеотидным дуплексом проводили, как и раньше [10, 11], на основании рассчитанных значений индуцированных химических сдвигов протонов (см. табл. 2) и данных 2М-ЯМР спектроскопии. Использовали модифицированную модель эквивалентных магнитных диполей [11, 36], полученную в результате аппроксимации квантовомеханических кривых экранирования для азотистых оснований нуклеиновых кислот [37]. При расчете пространственной структуры комплекса дауномицина с де-

Т а б л и ц а 2

Расчетные значения индуцированных химических сдвигов (параметров экранирования) протонов ($\Delta\delta_i$, м.д.) дауномицина в составе различных комплексов с дезокситетрануклеотидом 5'-d(CpGpCpGp) в водном растворе ($T = 303$ К, рD 7,1)

Протон	Комплекс 1:1	1:2	2:1	2:2	—
	$\Delta\delta_1$	$\Delta\delta_2$	$\Delta\delta_3$	$\Delta\delta_4$	δ_m
H1	0,51	0,37	0,33	0,66	7,83
H2	0,35	0,16	0,52	0,61	7,78
H3	0,30	0,27	0,36	0,24	7,55
H1'	-0,01	-0,01	0,37	0,28	5,53
CH ₃	0,19	0,11	0,28	0,22	4,02
H8e	0,29	0,48	0,25	0,22	2,26
H10e	0,49	0,42	0,54	0,42	3,06

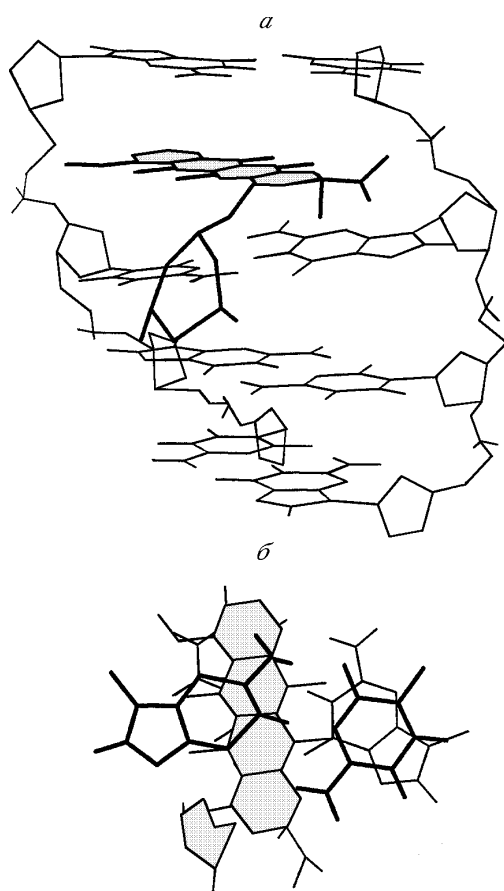


Рис. 5. Расчетная пространственная структура 1:2-комплекса дауномицина с 5'- $d(CGCG)$:

a — вид на комплекс сбоку (хромофор антибиотика заштрихован); b — вид на $d(CGCG)$ -участок со встроенным антибиотиком сверху, показывающий взаимное расположение азотистых оснований и хромофора дауномицина в 1:2-комплексе

зокситетрануклеотидом $d(CGCG)$ применяли алгоритм преобразования координат атомов и программу, реализующую этот алгоритм, разработанную в ИТЭБ РАН [38]. Последовательность преобразований координат в двойной спирали отвечала изменению параметров ω (пропеллер), α (излом пары), τ (наклон пары), ρ (крен), D_x (сдвиг), D_y (скольжение), Ω (закручивание), D_z (поднятие) [39]. В настоящей работе рассчитывали экранировку необмениваемых протонов хромофора дауномицина парами CG и GC в интеркалированном комплексе 1:2 при вариации конформационных параметров спирали. Вычислительная процедура нахождения конформационных параметров интеркалированного комплекса достаточно под-

робно описана в [11]. На рис. 5 представлена в различных проекциях рассчитанная наиболее вероятная структура комплекса 1:2 дауномицина с $d(C1pG2pC3pG4)$, отвечающая интеркаляции хромофора антибиотика в $d(C1-G2)$ -участок тетрамера. Пространственное изображение структуры получено с помощью программы "MATHEMATICA 2.2" (Wolfram Res. Inc.). Длины связей и валентные углы в структуре молекулы дауномицина взяты по данным рентгеноструктурного анализа [40].

Интеркалированный комплекс характеризуется следующими параметрами спирали: $D_z = 0,67$ нм, $\Omega = 34^\circ$, $\omega = -6,0^\circ$, $\tau = -6,0^\circ$, $D_x = 0,19$ нм, $D_y = 0,8$ нм, $\rho = 3,5^\circ$, $\alpha = 2,0^\circ$. Хромофор антибиотика располагается перпендикулярно оси спирали на равных расстояниях (0,335 нм) от плоскостей верхней и нижней пар оснований в $d(C1-G2)$ -участке и повернут на угол $\sim 125^\circ$ по отношению к плоскости нижней пары оснований, в результате чего обеспечивается относительно слабое экранирование необмениваемых протонов в кольцах A и D хромофора. Оценки с использованием суммарных констант спин-спинового взаимодействия для $H1'$, $H2'$ и $H2''$ протонов дезоксирибозы [41] позволяют заключить, что дезоксирибозные остатки исследованного тетрамера в комплексе с дауномицином преимущественно находятся в $C2'$ -эндо-конформациях, соответствующих В-форме ДНК.

Результаты рентгеноструктурных исследований подобных комплексов в кристалле [19, 20] свидетельствуют о том, что конформации кольца A хромофора

и аминоксахара дауномицина при связывании с дезоксиолигонуклеотидами претерпевают существенные изменения по сравнению со свободной молекулой антибиотика, чтобы обеспечить энергетически и стерически наиболее выгодную укладку аминоксахарного кольца в малой бороздке правой спирали ДНК. Этот вывод подтверждается исследованиями, проведенными в растворе [24], согласно которым взаимная ориентация плоскостей хромофора и аминоксахарного остатка в молекуле дауномицина, связанной с ДНК, существенно отличается от наблюдаемой в кристалле для свободного антибиотика [40]. В расчетной наиболее вероятной структуре 1:2-комплекса, представленной на рис. 5, аминоксахарный остаток располагается в малой бороздке двойной спирали и фактически блокирует третью пару оснований, что, по-видимому, является основной причиной низкой вероятности связывания второй молекулы антибиотика с коротким дезокситетрануклеотидным дуплексом. Важно отметить, что раскручивание спирали в месте интеркаляции практически отсутствует и составляет лишь 2° ($\Omega = 34^\circ$). Полученный результат хорошо согласуется с рентгеноструктурными данными [19, 20]. Вместе с тем в работе [20] обнаружено раскручивание соседних с участком интеркаляции пар оснований на 8° , т.е. при комплексобразовании с интеркалятором, в состав которого входят структурно-сложные заместители, располагающиеся в бороздках ДНК, наблюдаются конформационные эффекты более дальнего порядка, свидетельствующие об определенной структурной гибкости двойной спирали ДНК. Наблюдаемый угол раскручивания 11° на одну молекулу дауномицина при комплексобразовании с суперспиральной ДНК в растворе, очевидно, отражает суммарный конформационный эффект интеркаляционного связывания антибиотика [42].

Выражаем благодарность Объединенному исследовательскому центру Лондонского университета за предоставленную возможность в Беркбек колледже использовать для измерений ЯМР спектрометр 500 МГц.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Arcamone F., Penco S. Antracyclines and antracenedione — based anticancer agents / Ed. J.W. Lown. — N. Y.: Elsevier, 1988. — P. 1 — 43.
2. Boulad F., Kernan N.A. // Cancer Invest. — 1993. — **11**. — P. 534 — 553.
3. Neidle S., Abraham Z. // CRC Crit. Rev. Biochem. — 1984. — **17**. — P. 73 — 121.
4. Neidle S., Sanderson M.R. // Molecular aspects of anti-cancer drug action / Eds. S. Neidle, M.J. Waring. — Weinlan: Verlag Chemie, 1983. — P. 35 — 57.
5. Chaires J.B. // Biopolymers. — 1983. — **22**. — P. 4204 — 4211.
6. Newlin D.D., Miller K.J., Pilch D.F. // Ibid. — 1984. — **23**. — P. 139 — 158.
7. Chen K.-X., Gresh N., Pullman B. // J. Biomol. Struct. Dyn. — 1985. — **3**. — P. 445 — 466.
8. Chaires J.B., Dattagupta N., Crothers D.M. // Biochemistry. — 1982. — **21**. — P. 3933 — 3940.
9. Chaires J.B., Fox K.R., Herrera J.E. et al. // Ibid. — 1987. — **27**. — P. 8227 — 8236.
10. Davies D.B., Djimant L.N., Veselkov A.N. // Nucleot. Nucleos. — 1994. — **13**. — P. 637 — 655.
11. Davies D.B., Veselkov A.N. // J. Chem. Soc. Faraday Trans. — 1996. — **92**. — P. 3545 — 3557.
12. Huang Y.M., Phillips D.R. // Biophys. Chem. — 1977. — **6**. — P. 363 — 368.
13. Chaires J.B. // Biochemistry. — 1982. — **21**. — P. 3927 — 3932.
14. Веселков А.Н., Дымант Л.Н., Болотин П.А. и др. // Журн. структур. химии. — 1996. — **37**. — С. 1243 — 1255.
15. Hore P. // J. Magn. Reson. — 1983. — **55**. — P. 283 — 300.
16. Итон Р.Дж., Веселков Д.А., Дэвис Д.Б. и др. // Хим. физика. — 1999. — **18**, № 3.
17. Веселков А.Н., Дэвис Д.Б., Дымант Л.Н. и др. // Биополимеры и клетка. — 1991. — **7**. — С. 15 — 22.
18. Freier S.M., Alberg D.P., Turner D.H. // Biopolymers. — 1983. — **22**. — P. 1107 — 1131.

19. Quigley G.J., Wang A.H.-J., Ughetto G. *et al.* // Proc. Natl. Acad. Sci: USA. – 1980. – 77. – P. 7204 – 7208.
20. Wang A.H.-J., Ughetto G., Quigley G.J., Rich A. // Biochemistry. – 1987. – 26. – P. 1152 – 1163.
21. Mc Ghee J.D., von Hippel P.H. // J. Mol. Biol. – 1974. – 86. – P. 463 – 489.
22. Plumbridge T.W., Brown J.R. // Biochim. Biophys. Acta. – 1977. – 479. – P. 441 – 449.
23. Gabbay E.J., Grier D., Fingerle R.E. *et al.* // Biochemistry. – 1976. – 15. – P. 2062 – 2070.
24. Веселков А.Н., Морошукина Е.Б., Соболева О.И., Фрисман Э.В. // Молекуляр. биология. – 1984. – 18. – С. 481 – 487.
25. Davies D.B., Djimant L.N., Veselkov A.N. // Nucleot. Nucleos. – 1994. – 13. – P. 657 – 671.
26. Davies D.B., Djimant L.N., Baranovsky S.F., Veselkov A.N. // Biopolymers. – 1997. – 42. – P. 285 – 295.
27. Chaires J.B. // Ibid. – 1985. – 24. – P. 403 – 419.
28. Delbarre A., Roques B.P., Le Pecq J.B. *et al.* // Biophys. Chem. – 1976. – 4. – P. 275 – 279.
29. Ross P.D., Subramanian S. // Biochemistry. – 1981. – 20. – P. 3096 – 3102.
30. Marky L., Blumenfeld K.S., Breslauer K.J. // Nucleic Acids Res. – 1983. – 11. – P. 2857 – 2870.
31. Sturtevant J.M. // Proc. Natl. Acad. Sci: USA. – 1977. – 74. – P. 2236 – 2240.
32. Dickerson R.E., Drew H.R., Conner B.H. *et al.* // Science. – 1982. – 216. – P. 475 – 485.
33. Record M.T.Jr., Anderson C.F., Lohman T.M. // Quart. Rev. Biophys. – 1978. – 11. – P. 103 – 178.
34. Davies D.B., Baranovsky S.F., Veselkov A.N. // J. Chem. Soc. Faraday Trans. – 1997. – 93. – P. 1559 – 1572.
35. Remeta D.P., Mudd C.P., Berger R.L., Breslauer K.J. // Biochemistry. – 1991. – 30. – P. 9799 – 9809.
36. Веселков А.Н., Дымант Л.Н., Болотин П.А. *и др.* // Молекуляр. биология. – 1995. – 29. – С. 326 – 338.
37. Giessner-Prettre C., Pullman B. // Quart. Rev. Biophys. – 1987. – 20. – P. 113 – 172.
38. Poltev V.I., Teplukhin A.V. // Int. J. Quant. Chem. – 1989. – 35. – P. 91 – 102.
39. Dickerson R.E. // J. Biomol. Struct. Dyn. – 1989. – 6. – P. 627 – 634.
40. Neidle S., Taylor G. // Biochim. Biophys. Acta. – 1977. – 478. – P. 450 – 459.
41. Searle M.S. // Progr. NMR Spectr. – 1993. – 25. – P. 403 – 480.
42. Blackburn G.M., Gait J.M. Nucleic acids in chemistry and biology. – Oxford–N. Y.–Tokyo: Oxford Univ. Press, 1990. – P. 297 – 336.

Севастопольский государственный
технический университет
Беркбек колледж,
Лондонский университет
E-mail:veselkov@sevgtu.sevastopol.ua

Статья поступила
10 февраля 1998 г.