



# Структура и функция биополимеров

УДК 577.113

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

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АКРИДИНОВОГО КРАСИТЕЛЯ С ДЕЗОКСИТЕТРАНУКЛЕОТИДАМИ РАЗЛИЧНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ОСНОВАНИЙ В ВОДНОМ РАСТВОРЕ

*Рассмотрено комплексообразование акридинового красителя профлавина с самокомплементарными дезокситетрарибонуклеозидтрифосфатами 5'-d(GpCpGpC), 5'-d(CpGpCpG), 5'-d(ApCpGpT), 5'-d(ApGpCpT) в водном растворе на основе данных одномерной и двумерной <sup>1</sup>H-ЯМР-спектроскопии. Двухмерная гомоядерная ПМР-спектроскопия (2M-COSY и 2M-NOESY) использована для полного отнесения сигналов протонов молекул в растворе и для качественного определения характера взаимодействия профлавина с тетрануклеотидами. Проанализированы концентрационные зависимости протонных химических сдвигов молекул. Рассмотрены различные схемы образования комплексов красителя с тетрануклеотидами и выявлены модели, адекватные экспериментальным данным для различных нуклеотидных последовательностей.*

**Введение.** Известно, что многие биологически активные ароматические вещества — антибиотики, канцерогены, мутагены оказывают свое действие главным образом путем связывания с ядерной ДНК. При этом ароматические лиганды нарушают матричный синтез и, как следствие, приводят к изменению метаболических процессов в клетке. Соответствующие теории взаимодействия, особенно интеркаляционная модель, внесли существенный вклад в понимание биологических свойств и характера связывания низкомолекулярных ароматических веществ с нуклеиновыми кислотами. Вместе с тем экспериментальные и теоретические исследования закономерностей комплексообразования, структурных особенностей комплексов ароматических лигандов с полимерными молекулами затруднены ввиду сложности строения макромолекул нуклеиновых кислот и большого разнообразия мест связывания в полимерной цепи. Более реальный путь — исследование взаимодействия ароматических молекул с самокомплементарными олигонуклеотидами, которые в первом приближении можно рассматривать как модельные системы нативных молекул нуклеиновых кислот. Известно, что ароматические лиганды проявляют специфичность взаимодействия с определенными последовательностями азотистых оснований в нуклеотидной цепи. Так, антибиотик актиномицин D преимущественно взаимодействует с GC-сайтом, в то время как бромистый этидий и акридиновый краситель профлавин встраиваются в участок дуплекса, имеющий пиримидин-пуриновую последовательность азотистых оснований [1—7]. Указанная избирательность наблюдается уже при связывании лигандов с самыми короткими фрагментами нуклеиновых кислот — динуклеотидными дуплексами. Исследования взаимодействия с более длинными самокомплементарными олигонуклеотидами расширяют возможности изучения процессов интеркаляции и делают более обоснованным перенос

© А. Н. ВЕСЕЛКОВ, Д. ДЭВИС, Л. Н. ДЫМАНТ, 1992

выявленных свойств на полимерные молекулы нуклеиновых кислот. Для решения вопросов о селективности связывания ароматических лигандов желательны проводить целенаправленные исследования, используя при этом специально синтезированные олигонуклеотиды, отличающиеся локализацией мест преимущественной посадки лиганда, нуклеотидными звеньями, фланкирующими выделенные сайты, а также числом таких сайтов в последовательности. Самыми короткими нуклеотидными последовательностями, пригодными для таких исследований, являются тетрануклеотиды, имеющие три потенциальных места интеркаляционного связывания.

Наиболее полную информацию о характере образующихся комплексов ароматических молекул с олигонуклеотидами дает рентгеноструктурный анализ [8]. Однако силы взаимодействия в кристалле, особенно при низкой гидратации, могут существенно отличаться от таковых, действующих при комплексообразовании в растворе. Следует также учитывать, что кристалл представляет собой статическую структуру, в то время как взаимодействие молекул в растворе имеет существенно динамический характер. Эффективным экспериментальным методом исследования молекулярных комплексов в растворе является ЯМР-спектроскопия. Развитие в последнее время методик двухмерного ЯМР (2М-ЯМР) открыло дополнительные возможности для изучения механизма взаимодействия лигандов с олигонуклеотидами в растворе. В настоящей работе рассмотрены результаты исследования комплексообразования типичного интеркалятора профлавины с самокомплементарными дезокситетрарибонуклеозидтрифосфатами 5'-d(CpGpCpG), 5'-d(GpCpGpC), 5'-d(ApCpGpT) и 5'-d(ApGpCpT) методом одно- и двухмерной ЯМР-<sup>1</sup>H-спектроскопии (500 МГц). Первый из тетрамеров содержит два CG-сайта, к которым профлавин проявляет специфичность взаимодействия в дуплексе, второй и третий — имеют в центре по одному такому сайту, фланкированному с 5'- и 3'-концов различными нуклеозидами. Последний тетрануклеотид не имеет ни одного сайта с пиримидин-пуриновой последовательностью оснований. Вместе с тем, как показали исследования с динуклеотидами [7, 9], существует некоторая вероятность связывания и с пурин-пиримидиновой последовательностью оснований в дуплексе, а при взаимодействии красителя с мономером такие участки нуклеотидной цепи имеют преимущество по сравнению с другими. Анализ закономерностей взаимодействия профлавины с указанными тетрануклеотидами в растворе, влияния последовательности оснований нуклеотидной цепи на характер комплексообразования и структурные особенности комплексов различного вида сделан на основании экспериментальных концентрационных зависимостей химических сдвигов необмениваемых протонов нуклеотидов и красителя. Для идентификации резонансов протонов в спектрах <sup>1</sup>H-ЯМР смешанных растворов, а также для качественного определения мест связывания красителя с тетрануклеотидами использованы данные гомоядерной корреляционной 2М-ЯМР спектроскопии (2М-COSY и 2М-NOESY).

**Материалы и методы.** Методика приготовления образцов и условия проведения эксперимента описаны в [10]. Дезокситетрануклеотиды с заданной последовательностью оснований синтезированы компанией «OSWEL DNA SERVICE» (Великобритания). Тетрануклеотиды и краситель профлавин («Sigma», США) трижды лиофилизировали из D<sub>2</sub>O с изотопной чистотой 99,95 % D («Sigma») и растворяли в дейтерированном 0,1 М фосфатном буфере (pD 6,6). Все протонные спектры ЯМР измерены на импульсном спектрометре «JEOL GSX 500» с резонансной частотой 500 МГц. Предварительно выполненное по данным 2М-COSY и 2М-NOESY полное отнесение сигналов протонов в спектрах тетрануклеотидов [10] позволило произвести отождествление спектров смешанных растворов. Спектры 2М-NOE растворов тетрануклеотидов с красителем использованы для выявления связей ядер молекулы через пространство.

**Результаты и обсуждение.** Интерпретация спектров 2M-NOESY-спектроскопии корреляции химических сдвигов с помощью гомоядерной кросс-релаксации в случае смешанных растворов позволяет в принципе получать сведения о конформации олигонуклеотидов в комплексе с красителем и о межъядерных контактах взаимодействующих молекул. Достоинством NOE является то, что он дает возможность непосредственно определять расстояние между протонами исходя из начальной скорости возрастания NOE. Отметим вместе с тем, что количественная

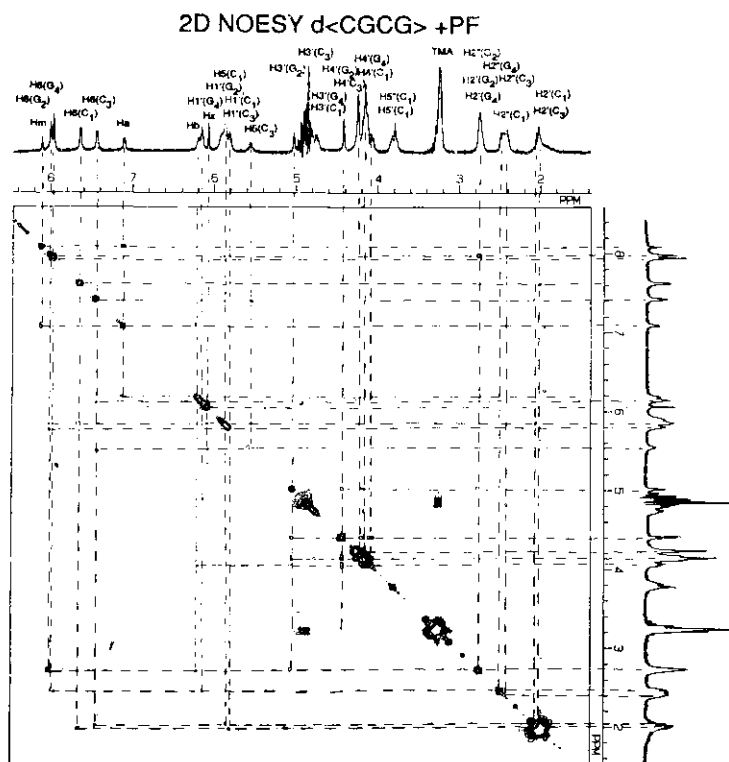


Рис. 1. Спектр 2M-NOE раствора профлавина с тетрауклеотидом 5'-d(CpGpCpG) при исходных концентрациях профлавина  $P_0 = 0.76 \cdot 10^{-3}$  моль/л и тетрауклеотида  $N_0 = 1.2 \cdot 10^{-3}$  моль дуплекса/л ( $T = 298$  K)

интерпретация 2M-NOESY, как показали исследования в [11], является достаточно корректной лишь при регистрации NOE-спектра с временами смешивания, не превышающими 100 мс. Только в этом случае можно считать эффективные времена корреляции межпротонных векторов одинаковыми для всех взаимодействующих ядер и проводить расчет межъядерных расстояний по соответствующим уравнениям для скорости кросс-релаксации двухспиновых систем. В реальных экспериментальных условиях не всегда можно достигнуть требуемых интенсивностей кросс-пиков между протонами интеркалирующего лиганда и нуклеотидов для надежного определения соответствующих расстояний и установления структуры комплексов. Однако даже в таких случаях спектры 2M-NOE позволяют получать важную информацию о возможных местах связывания лиганда с олигомером и делать выводы о конформационном состоянии молекул.

На рис. 1, 2 представлены 2M-NOE-спектры растворов профлавина с 5'-d(CpGpCpG) и 5'-d(GpCpGpC). Наряду с кросс-пиками, характеризующими внутримолекулярные взаимодействия ядер, в спектрах наблюдаются кросс-пики между отдельными протонами красителя и нуклеозидов (связи между различными протонами показаны пунктирными линиями). В случае раствора профлавина с 5'-d(CpGpCpG) можно указать кросс-пики приблизительно равной интенсивности между прото-

нами Н<sub>х</sub>-Н5(C1) и Н<sub>х</sub>-Н5(C3), а также Н<sub>в</sub>-Н2'(G2) и Н<sub>в</sub>-Н2(G4). Наличие таких межъядерных спин-спиновых взаимодействий позволяет предположить, что краситель встраивается в CG-сайты тетрамера с примерно равной вероятностью. В 2М-NOE-спектре раствора красителя с 5'-d(GpCpGpC) имеются кросс-пики между протонами профлавиона и внутренних нуклеозидов — Н<sub>в</sub>-Н2'(G3), Н<sub>в</sub>-Н8(G3) и Н<sub>х</sub>-Н5(C2), что свидетельствует о преимущественном встраивании лиганда в центральный CG-сайт тетрамера. Аналогичное заключение об интеркаляции

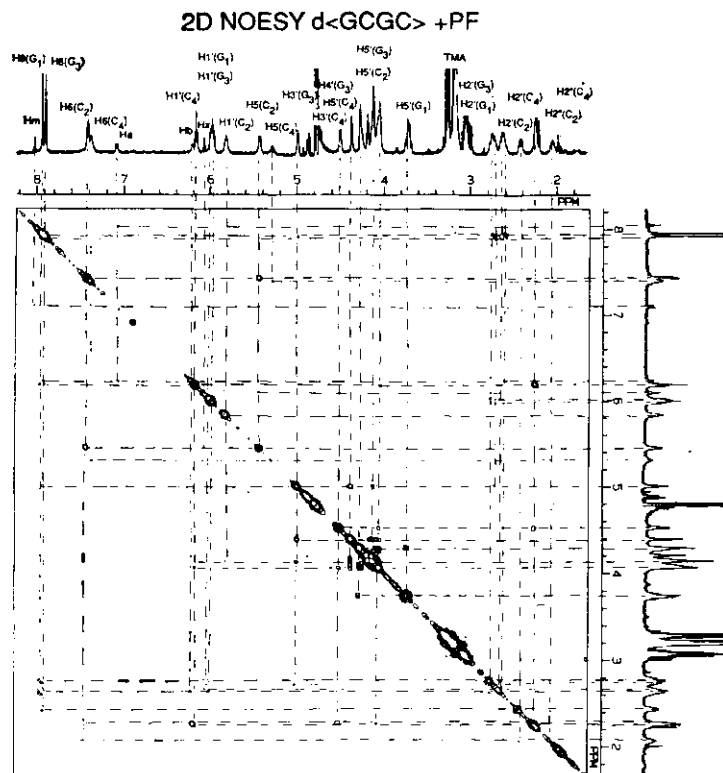


Рис. 2. Спектр 2М-NOE раствора профлавиона с тетрануклеотидом 5'-d(GpCpGpC) при исходных концентрациях профлавиона  $P_0 = 0,545 \cdot 10^{-3}$  моль/л и тетрануклеотида  $N_0 = 2,17 \cdot 10^{-3}$  моль дуплекса/л ( $T = 298$  К)

красителя в CG-сайт тетрануклеотида 5'-d(ApCpGpT) следует из наличия в спектре кросс-пиков Н<sub>в</sub>-Н5'(G3) и Н<sub>х</sub>-Н5(C2). Что касается тетрамера 5'-d(ApGpCpT), то здесь нет участка с пиримидин-пуриновой последовательностью оснований. Вместе с тем в спектрах смешанного раствора регистрируются взаимодействия, свидетельствующие о наиболее вероятном связывании красителя с GC-участком в центре последовательности.

Следует отметить, что интенсивности всех зарегистрированных кросс-пиков, обусловленных межмолекулярными взаимодействиями, довольно низкие в сравнении с таковыми, дающими сближенные в пространстве протоны внутри молекул. Это может быть обусловлено тем, что расстояния между протонами лиганда и тетрануклеотида в месте интеркаляции достаточно велики. При этом число межмолекулярных кросс-пиков во всех рассмотренных 2М-NOE-спектрах мало. Последнее, по-видимому, будет характерно не только для профлавиона, но и для других интеркалирующих красителей, плоские хромофоры которых не имеют массивных боковых групп и цепей. В результате задача определения геометрии комплекса таких лигандов с олигонуклеотидами не может быть в достаточной степени решена на основе только данных 2М-NOESY. В этих случаях необходимую дополнительную информацию

дает знание предельных значений химических сдвигов протонов молекул, находящихся в связанном состоянии, по которым можно определить структурные характеристики комплексов с использованием данных квантовомеханических расчетов экранирующего действия ароматических молекул [12]. Весьма существенно, что в растворе, особенно в случае коротких олигонуклеотидов, имеет место сложное динамическое равновесие взаимодействующих молекул, в том числе между мономерами, димерами тетрануклеотида и красителя, а также их комплексами различного вида. Это обстоятельство необходимо учитывать при интерпретации результатов одно- и двухмерной ЯМР-спектроскопии. Экспериментально наблюдаемые протонные химические сдвиги молекул являются результатом суммы вкладов мономерных и ассоциированных форм, доли которых зависят от исходных концентраций молекул в растворе. Изме-

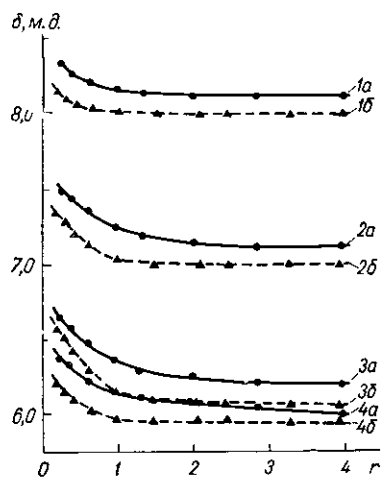


Рис. 3. Зависимости химических сдвигов протонов профлавина от отношения исходных концентраций тетрануклеотида в дуплексной форме и красителя ( $r = N_0/P_0$ ) при постоянной концентрации профлавина. Сплошные линии — смесь профлавина с 5'-d(GpCpGpC) при  $P_0 = 0,546 \cdot 10^{-3}$  моль/л, пунктирные — с 5'-d(CpGpCpG) при  $P_0 = 0,76 \cdot 10^{-3}$  моль/л (1 а, б — H<sub>м</sub>; 2 а, б — H<sub>λ</sub>; 3 а, б — H<sub>β</sub>; 4 а, б — H<sub>χ</sub>)

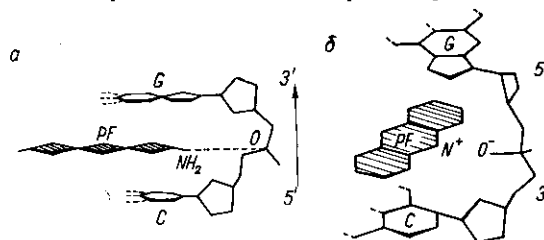
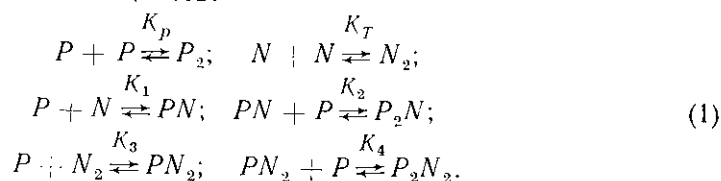


Рис. 4. Схематическое представление структур 1:1 комплексов профлавина с динуклеотидами в водном растворе: а — комплекс профлавина с CpG; б — GpC

нение концентрационных зависимостей химических сдвигов протонов дает возможность определить основные закономерности комплексообразования, в частности, виды формирующихся комплексов, равновесные константы реакций, предельные значения химических сдвигов ядер связанных молекул [7, 9, 13, 14]. На рис. 3 в качестве примера представлены зависимости химических сдвигов  $\delta$  протонов профлавина в растворах с тетрануклеотидами d(GpCpGpC) и d(CpGpCpG) от величины  $r = N_0/P_0$  — соотношения исходных концентраций дуплекса тетрануклеотида и красителя. Видно, что наибольшие изменения протонных химических сдвигов происходят при малых  $r$ , когда велико содержание красителя в растворе. В то же время при  $r > 1$ , когда в растворе тетрануклеотид находится в избытке и велика вероятность связывания профлавина, концентрационная зависимость для  $\delta$  менее выражена. Аналогичный ход кривых  $\delta = f(r)$  наблюдается и для растворов красителя с d(ApCpGpT) и d(ApGpCpT).

Для количественной оценки процессов комплексообразования профлавина с тетрануклеотидами были проанализированы различные схемы реакций в растворе. В случае взаимодействия красителя с изомерными последовательностями d(GpCpGpC) и d(CpGpCpG) наилучшее согласие с экспериментальными данными дает следующая схема образования молекулярных ассоциатов:



В предлагаемой схеме сделано допущение об определяющей роли двух-компонентных взаимодействий в растворе. Учитывая законы действующих масс для реакций (1) и закон сохранения массы, получаем следующую систему уравнений:

$$2(K_P + K_1K_2N + K_TK_3K_4N^2)P^2 + (1 + K_1N + K_TK_3N^2)P - P_0 = 0; \quad (2)$$

$$2(K_T + K_TK_3P + K_TK_3K_4P^2)N^2 + (1 + K_1P + K_1K_2P^2)N - N_0 = 0,$$

где  $P$ ,  $N$  — молярные концентрации мономеров профлавина и тетрауклеотидов. Химические сдвиги рассчитывали с использованием аддитивной модели:

$$\delta = P/P_0(\delta_M + 2K_PP\delta_d + K_1N\delta_1 + 2K_1K_2PN\delta_2 + K_TK_3N^2\delta_3 + 2K_TK_3K_4PN^2\delta_4). \quad (3)$$

Здесь  $\delta_M$ ,  $\delta_d$ ,  $\delta_1$ — $\delta_4$  — протонные химические сдвиги в молекуле красителя в мономере, димере и в составе комплексов 1 : 1 ( $PN$ ), 2 : 1 ( $P_2N$ ), 1 : 2 ( $PN_2$ ) и 2 : 2 ( $P_2N_2$ ) соответственно. Величины  $\delta_M$  и  $\delta_d$  известны — они были определены ранее [15] при исследовании самоассоциации профлавина исходя из концентрационных зависимостей протонных химических сдвигов красителя в тех же условиях растворителя (0,1 фосфатный буфер). Значение константы димеризации профлавина  $K_P$  составляет 300–350 л/моль при температуре  $T=293$ – $298$  К [16]. Величины констант  $K_T$  самоассоциации тетрауклеотидов  $d(\text{GpCpGpC})$  и  $d(\text{CpGpCpG})$  получены независимым образом на основе концентрационных исследований  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектров тетрамеров [10] и для условий настоящего эксперимента имеют значения  $K_T$   $1000 \pm 120$  и  $1300 \pm 160$  л/моль дуплекса соответственно. Тогда наблюдаемый химический сдвиг  $\delta$  является функцией неизвестных  $\delta_1$ — $\delta_4$ ,  $K_1$ — $K_4$ ,  $P$  и  $N$ . Концентрации красителя  $P$  и тетрауклеотида  $N$ , в свою очередь, зависят от  $K_1$ — $K_4$ ,  $P_0$ ,  $N_0$  и могут быть найдены из системы уравнений (2). Поиск восьми параметров  $\delta_1$ — $\delta_4$ ,  $K_1$ — $K_4$  модели (3) целесообразно проводить вариационным методом путем минимизации квадратичного функционала невязки [17, 18] с использованием экспериментальных концентрационных зависимостей химических сдвигов различных протонов красителя. Такая многопараметрическая задача потребовала решения в два этапа: первоначальное приближение находили методом случайного поиска безусловного минимума (модуль MIN31 математического обеспечения ЭВМ ЕС [19]), дальнейшую оптимизацию выполняли симплексным методом Нелдера — Мида [20].

В табл. 1 представлены полученные в результате расчетов значения равновесных констант комплексообразования  $K_i$  и индуцированных химических сдвигов в область сильного поля для протонов профлавина  $\Delta\delta_i = \delta_M - \delta_i$ , где  $i=1, 2, 3, 4$  для соответствующего типа комплекса. Величины  $\Delta\delta_i$  характеризуют экранирующее действие нуклеотидов на

Таблица 1

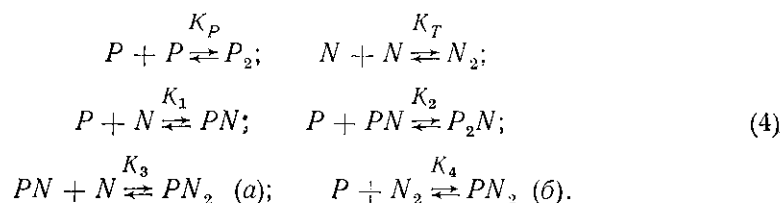
Расчетные значения параметров комплексообразования профлавина с дезокситетрануклеотидами 5'- $d(\text{GpCpGpC})$  и 5'- $d(\text{CpGpCpG})$

Параметр	5'- $d(\text{GpCpGpC})$				5'- $d(\text{CpGpCpG})$			
	H <sub>M</sub>	H <sub>A</sub>	H <sub>B</sub>	H <sub>X</sub>	H <sub>M</sub>	H <sub>A</sub>	H <sub>B</sub>	H <sub>X</sub>
$\Delta\delta_1$ , м. д.	1,02	0,89	1,01	0,95	1,03	1,01	1,28	0,91
$\Delta\delta_2$ , м. д.	0,95	0,94	1,06	0,90	1,30	1,12	1,21	1,20
$\Delta\delta_3$ , м. д.	0,49	0,73	0,91	0,88	0,75	0,98	0,96	0,93
$\Delta\delta_4$ , м. д.	0,55	0,75	1,10	0,62	0,59	0,84	0,98	0,66
$K_1$ , $10^3$ л/моль	—	$3800 \pm 600$	—	—	—	$6200 \pm 800$	—	—
$K_2$ , $10^3$ л/моль	—	$2500 \pm 400$	—	—	—	$3630 \pm 660$	—	—
$K_3$ , $10^3$ л/моль	—	$9400 \pm 1000$	—	—	—	$17600 \pm 1600$	—	—
$K_4$ , $10^3$ л/моль	—	$520 \pm 120$	—	—	—	$10900 \pm 900$	—	—

протоны красителя, находящегося в составе комплекса. Константы  $K_1$  и  $K_2$  образования 1:1 и 2:1 комплексов профлавина с одиночной нитью тетрауклеотида  $d(\text{GpCpGpC})$  примерно одинаковы, что обусловлено, по-видимому, наличием в этой последовательности двух GC-сайтов, по отношению к которым профлавин в случае связывания с мономером проявляет специфичность взаимодействия [9]. Тетрануклеотид  $d(\text{CpGpCpG})$  содержит один GC-сайт, который фланкирован с обеих сторон нуклеотидами, что повышает вероятность вертикального стэкинга между основаниями гуанина и цитозина в центре последовательности и тем самым способствует связыванию плоской молекулы красителя с тетрамером. Это приводит к тому, что константа  $K_1$  образования комплекса профлавина с  $d(\text{CpGpCpG})$  выше таковой для изомерной последовательности. Посадка второй молекулы красителя на мономер  $d(\text{CpGpCpG})$ , как видно из сравнения констант  $K_2$  и  $K_1$ , происходит с несколько меньшей вероятностью, чем первой. Если считать, что одна молекула преимущественно связывается с центральным GC-сайтом, то процесс присоединения другой молекулы в соседние сайты такой последовательности, естественно, будет иметь антикооперативный характер. Наличие специфичности к пиримидин-пуриновой последовательности оснований при связывании красителя с дуплексом подтверждается расчетными величинами констант  $K_3$  и  $K_4$ , имеющих существенно различные значения для рассматриваемых изомерных тетрауклеотидов. Константа образования 1:2 комплекса красителя с  $d(\text{CpGpCpG})$ , имеющим два CG-сайта, приблизительно вдвое превышает  $K_3$  для его изомера с одним таким сайтом. Можно полагать, что профлавин интеркалирует в каждый CG-участок этих двухспиральных последовательностей примерно с равной вероятностью. Последнее подтверждается характером кросс-пиков между протонами профлавина и азотистых оснований и соотношением их интенсивностей в 2M-НОЕ-спектрах. Из сравнения равновесных констант комплексообразования  $K_4$  и  $K_3$  видно, что связывание второй молекулы с дуплексом  $d(\text{GpCpGpC})$  имеет явно антикооперативный характер. Это дополнительно подтверждает то обстоятельство, что краситель преимущественно интеркалирует в CG-сайт, поэтому посадка второй молекулы в такой дуплекс маловероятна. В то же время при взаимодействии профлавина с  $d(\text{CpGpCpG})$ , в котором находятся два участка с пиримидин-пуриновой последовательностью оснований, константа реакции  $K_4$  велика и примерно в 20 раз превышает соответствующую константу для изомерного тетрауклеотида. Можно в связи с этим полагать, что образование 2:2 комплексов профлавина с дуплексами тетрауклеотидов отвечает модели «исключенного соседа», согласно которой встраивание красителя между соседними парами оснований двойной спирали исключается. Относительно большие величины индуцированных химических сдвигов  $\Delta\delta_i$  (см. табл. 1) свидетельствуют о значительном экранирующем влиянии нуклеозидов на все протоны профлавина, что предполагает встраивание хромофора красителя между плоскостями азотистых оснований тетрауклеотидов. Квантово-механический расчет экранирующего действия оснований нуклеиновых кислот, выполненный в [12], показывает, что наибольший индуцированный химический сдвиг для протонов молекулы, находящейся между гуанином и цитозином на расстоянии 0,34 нм от них, может достигать 1,7–1,8 м. д. Найденные значения  $\Delta\delta_i$  для всех протонов красителя в составе комплексов находятся в пределах 0,5–1,3 м. д., что свидетельствует о достаточно сильном перекрывании плоскостей взаимодействующих молекул. Обращает на себя внимание тот факт, что величины индуцированных химических сдвигов  $\Delta\delta_1$  и  $\Delta\delta_2$  для комплексов красителя с мономерами тетрауклеотидов несколько выше величин  $\Delta\delta_3$  и  $\Delta\delta_4$  для комплексов с двойной спиралью (см. табл. 1), несмотря на то, что экранирование протонов красителя осуществляется нуклеозидами только одной цепи. Расчет показывает, что необходимое экранирование всех протонов профлавина в этом случае может быть достигнуто лишь при расстояниях между хромофором лиганда и соседними основаниями

тетрануклеотида, меньших 0,34 нм. Это вполне вероятно вследствие большой конформационной свободы одноцепочечной последовательности нуклеотидов. Что касается комплексов красителя с двойной спиралью, то, как видно из сопоставления величин  $\Delta\delta_3$  и  $\Delta\delta_4$ , структуры 1:2 и 2:2 комплексов существенно не различаются для обоих исследованных тетрануклеотидов. Вместе с тем несколько большее экранирование протонов  $H_M$  и  $H_A$  в 1:2 комплексе профлавина с  $d(\text{CpGrCpG})$  в сравнении с  $d(\text{GrCpGrC})$  свидетельствует о более глубоком внедрении лиганда в CG-участок двойной спирали.

Соответствующий анализ концентрационных зависимостей протонных химических сдвигов красителя проведен и для смешанных растворов с тетрамерами  $d(\text{ArCpGrT})$  и  $d(\text{ArGrCpT})$ , где центральные CG- и GC-участки фланкированы аденином и тиминном. Однако для этих последовательностей расчеты с использованием схемы (1) не дали удовлетворительного согласия с экспериментом. Более адекватной оказалась схема, в которой предусмотрена возможность образования 1:2 комплекса  $PN_2$  профлавина с тетрануклеотидом двумя различными способами — непосредственным связыванием красителя с дуплексом и формированием этого комплекса путем взаимодействия мономера тетрануклеотида с 1:1 комплексом  $PN$ , где профлавин играет роль «скрепки»:



Необходимость учета «скрепочно» комплекса обусловлена тем, что равновесные константы самоассоциации тетрамеров, имеющих концевые А—Т-пары, существенно ниже, чем  $K_T$  для CG-содержащих тетрануклеотидов. Значения константы самоассоциации оказались примерно равными для  $d(\text{ArCpGrT})$  и  $d(\text{ArGrCpT})$  и составили  $160 \pm 30$  л/моль дуплекса при  $T = 293$  К [10]. Реакция образования 2:2 комплекса красителя с рассматриваемыми тетрамерами, включающими в себя один CG- или GC-сайт, имеет, как показали соответствующие расчеты, пренебрежимо малое значение в общем равновесии в растворе. Примениительно к схеме реакций (4) система уравнений, определяющая равновесные молярные концентрации мономеров  $P$  и  $N$  взаимодействующих молекул, имеет вид:

$$\begin{aligned}
 2(K_P + K_1K_2N)P^2 + (1 + K_1N + K_1K_3N^2 + K_TK_4N^2)P - P_0 &= 0; \\
 2(K_T + K_1K_3P + K_TK_4P)N^2 + (1 + K_1P + K_1K_2P^2)N - N_0 &= 0,
 \end{aligned}
 \tag{5}$$

а выражение для химического сдвига протонов профлавина записывается следующим образом:

$$\delta = P/P_0 (\delta_M + 2K_P P \delta_d + K_1 N \delta_1 + 2K_1 K_2 P N \delta_2 + K_1 K_3 N^2 \delta_3 + K_T K_4 N^2 \delta_4).
 \tag{6}$$

Значения параметров комплексообразования профлавина с  $d(\text{ArCpGrT})$  и  $d(\text{ArGrCpT})$ , полученных с использованием модели (6), представлены в табл. 2. Характерно, что для обоих тетрануклеотидов равновесные константы реакции  $K_2$  много меньше  $K_1$ , т. е. связывание второй молекулы профлавина с одиночной нитью имеет явно антикооперативный характер. Аналогично интеркаляция второй молекулы в дуплекс с образованием 2:2 комплекса, как показали дополнительные расчеты, также явно антикооперативна. По-видимому, краситель преимущественно встраивается в центральные сайты тетрамеров, поэтому присоединение еще одной молекулы профлавина как к одиночной нити тетрануклеотида, так и к дуплексу маловероятно. Отметим, что кон-



танты образования 1 : 1 комплекса профлавина с тетрануклеотидами намного выше констант для комплексов 1 : 1 этого красителя с динуклеотидами CpG и GpC, значения которых составляют  $K_1 = 140 \pm 30$  и  $750 \pm 150$  л/моль соответственно [7]. Столь существенное различие констант комплексообразования с мономерами динуклеотидов и тетрамеров, у которых центральные сайты имеют те же нуклеотидные последовательности, связано, по-видимому, с различным внутримолекулярным стэкингом между соседними основаниями в динуклеотиде и тетрануклеотиде. В последнем случае предполагаемое место связывания с красителем фланкировано нуклеозидами с 5'- и 3'-концов последовательности и в связи с этим имеется меньшая в сравнении с динуклеотидами вероятность «раскрытия» плоскостей азотистых оснований в центральном сайте тетрамера, так что обеспечиваются более благоприятные условия для посадки плоской молекулы красителя.

Константа  $K_3$ , характеризующая формирование 1 : 2 комплекса через «скрепку», оказалась для последовательности 5'-d (ApCpGpT) значительно больше, чем для второго тетрамера. Это обстоятельство может быть объяснено, если обратиться к результатам, полученным при исследовании комплексообразования профлавина с динуклеотидами CpG и GpC [9]. Показано, что при взаимодействии красителя с одиночной нитью динуклеотида структуры 1 : 1 комплексов с CpG и GpC существенно различаются (рис. 4). При этом в 1 : 1 комплексе профлавина с CpG краситель ориентирован по отношению к нити динуклеотида боковым бензольным кольцом хромофора. Подобное расположение плоской молекулы профлавина в CG-сайте тетрамера будет создавать благоприятные условия для посадки второй одноцепочечной молекулы тетрануклеотида на «скрепку» с образованием 1 : 2 комплекса и тогда можно ожидать, что значение константы  $K_3$  будет большим. В 1 : 1 комплексе профлавина с GpC краситель ориентирован по отношению к нуклеотидной цепи центральным бензольным кольцом хромофора, так что имеет место значительное перекрытие плоскостей молекулы красителя и азотистых оснований. Дополнительная стабилизация в такой структуре возможна за счет электростатического взаимодействия положительно заряженного азота профлавина с отрицательно заряженной фосфатной группой динуклеотида. В этом случае положение плоской молекулы профлавина в GC-сайте тетрамера не является оптимальным для посадки второй одноцепочечной молекулы тетрануклеотида на «скрепку» с образованием 1 : 2 комплекса, поскольку не обеспечивается достаточный стэкинг между хромофором красителя и основаниями присоединяющейся молекулы. Формирование такого комплекса, по-видимому, должно сопровождаться переориентацией молекулы красителя в месте интеркаляции и дополнительными энергетическими затратами. Что касается вероятностей встраивания молекулы профлавина непосредственно в дуплекс, то, как видно из сравнения значений  $K_4$ , они примерно одинаковые для обоих исследованных тетрануклеотидов.

Из приведенных в табл. 2 данных следует, что расчетные значения индуцированных химических сдвигов протонов профлавина  $\Delta\delta_3$  и  $\Delta\delta_4$  в 1 : 2 комплексе близки между собой для обоих тетрануклеотидов. Это свидетельствует о том, что геометрия 1 : 2 комплексов не зависит от того, каким путем шло его образование. Значения  $\Delta\delta_1$  и  $\Delta\delta_2$  довольно сильно различаются между собой, при этом индуцированные химические сдвиги для всех протонов профлавина значительно меньше в 2 : 1 комплексе в сравнении с 1 : 1 комплексом. Отметим, что расчетное значение  $\Delta\delta_2$  в 2 : 1 комплексе является средней величиной для протонов двух связанных с тетрануклеотидом молекул красителя. Если предположить, что одна молекула встроена в центральный сайт, то другая присоединяется, по всей вероятности, снаружи путем вертикального стэкинга к концевым нуклеотидам, поскольку экранирование ее протонов незначительно.

По найденным значениям констант реакций было рассчитано относительное содержание молекулярных комплексов в растворе в зави-

симости от  $r = N_0/P_0$  — соотношения исходных концентраций дуплекса тетрауклеотида и красителя (рис. 5, 6). Видно, что вклад в общее равновесие в растворе комплексов различного вида определяется не только значениями равновесных констант реакций, но существенно зависит от характера нуклеотидной последовательности и величины  $r$ . С ростом  $r$  наблюдается монотонное возрастание доли 1 : 2 комплексов  $PN_2$  для всех тетрауклеотидов. В случае тетрамеров  $d(\text{GrCrGrC})$  и  $d(\text{CrGrCrG})$  это связано с высокой вероятностью образования таких

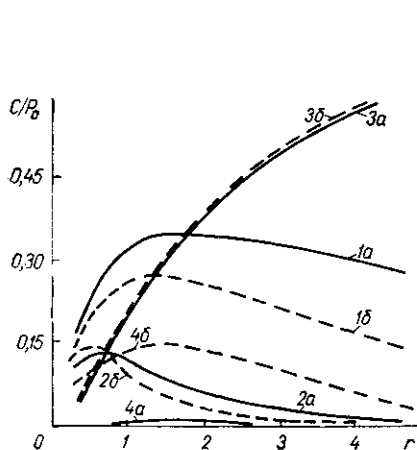


Рис. 5. Относительное содержание молекулярных комплексов в растворе в зависимости от  $r = N_0/P_0$ . Сплошные линии — смесь профлавина с  $5'$ - $d(\text{GrCrGrC})$ , пунктирные — с  $5'$ - $d(\text{CrGrCrG})$  (1a, б — 1 : 1 комплекс ( $PN$ ); 2a, б — 2 : 1 комплекс ( $P_2N$ ); 3a, б — 1 : 2 комплекс ( $PN_2$ ); 4a, б — 2 : 2 комплекс ( $P_2N_2$ ))

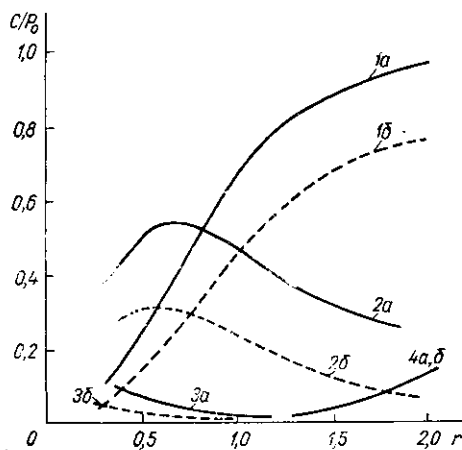


Рис. 6. Относительное содержание молекулярных комплексов в растворе в зависимости от  $r = N_0/P_0$ . Сплошные линии — смесь профлавина с  $5'$ - $d(\text{ArCrGrT})$ , пунктирные — с  $5'$ - $d(\text{ArGrCrT})$  (1a, б — 1 : 2 комплексы ( $PN_2$ ), формирующиеся через «скрепку»; 2a, б — 1 : 1 комплексы ( $PN$ ); 3a, б — 2 : 1 комплексы ( $P_2N$ ); 4a, б — димеры тетрауклеотидов ( $N_2$ ))

структур по мере увеличения концентрации дуплексов в растворе (см. рис. 5, кривые 3a, б). В то же время при взаимодействии профлавина с тетрауклеотидами  $d(\text{ArCrGrT})$  и  $d(\text{ArGrCrT})$  формирование 1 : 2 комплексов при достаточно больших  $r$  идет, в основном, через «скрепку» (см. рис. 6, кривые 1a, б), что обусловлено значительной концентрацией мономеров тетрауклеотидов и 1 : 1 комплексов в растворе. Вклад 2 : 2 комплекса (см. рис. 5, кривая 4a) оказывается существенным лишь в растворах красителя с тетрамером  $d(\text{CrGrCrG})$ , имеющим, в отличие от других последовательностей, два CG-сайта. Уменьшение доли этого комплекса при больших  $r$  связано с низкой концентрацией свободного красителя в растворе. Примечательно, что относительное содержание 2 : 1 комплексов с  $d(\text{ArCrGrT})$  и  $d(\text{ArGrCrT})$  мало и становится пренебрежимым уже при  $r \approx 1$ . Это свидетельствует о наличии только одного вероятного места посадки красителя в таких последовательностях. В то же время для других тетрамеров, имеющих два потенциальных места связывания, доля 2 : 1 комплексов значительно выше (см. рис. 5, кривые 2a, б). Характерно, что некоторые кривые на рис. 5 и 6 не являются монотонными и имеют максимум при значениях  $r$ , отвечающих, как правило, стехиометрическим соотношениям концентраций тетрауклеотидов и красителя.

Проведенный анализ равновесия в растворе позволяет сделать заключение о том, что вклад каждого вида комплекса в экспериментально наблюдаемый химический сдвиг протонов определяется значениями равновесных констант реакций, величинами исходных концентраций взаимодействующих молекул и существенно зависит от последовательности азотистых оснований в нуклеотидной цепи. В связи с этим чисто качественная трактовка наблюдаемых данных ЯМР без соответствующего количественного анализа, как это обычно делается в подавля-

ющем большинстве опубликованных работ (см., например, [21—23]), не позволяет, на наш взгляд, достаточно корректно определить равновесное содержание различных ассоциатов в растворе и предельные сдвиги протонов связанного лиганда и может привести к значительным ошибкам при рассмотрении структурных особенностей образующихся комплексов. В настоящей работе структуры комплексов профлавина с тетрауклеотидами определены на основании найденных значений индуцированных химических сдвигов протонов красителя и 2M-NOE-

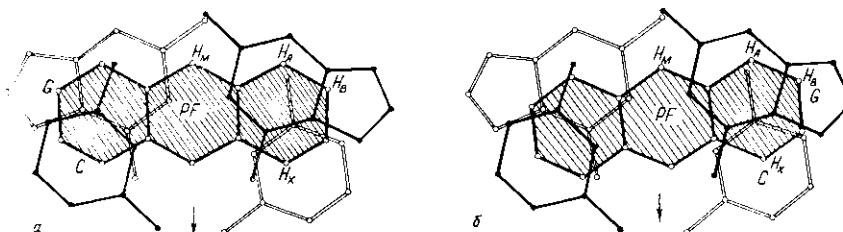


Рис. 7. Расчетные структуры 1:2 комплексов профлавина с тетрауклеотидами: а — с d(CpGpCpG); б — с d(ApGpCpT). Вид сверху в направлении, перпендикулярном плоскостям оснований и хромофора красителя. Атомы верхней пары оснований, связь между атомами интеркалированного красителя окрашены черным. Стрелка указывает направление к широкой канавке спирали

спектров. На рис. 7 представлены наиболее вероятные структуры 1:2 комплексов профлавина с d(CpGpCpG) и d(ApGpCpT), рассчитанные с использованием кривых экранирования Гейссисер — Претте и Пуллмана [12] для расстояний между азотистыми основаниями 0,68 нм. Профлавин в этих структурах интеркалирован в CG-сайт последовательности d(CpGpCpG) и GC-сайт тетрауклеотида d(ApGpCpT) из большого желоба спирального участка со стороны атомов N(7) и N(4) пар оснований. Хромофор красителя параллелен плоскостям оснований и располагается на равных расстояниях (0,34 нм) от них. Интеркаляция красителя в указанные участки тетрамеров подтверждается наличием кросс-пиков между протонами профлавина и соответствующих нуклеозидов в 2M-NOE-спектрах. При расчетах молекулярных структур рассматривали различные взаимные расположения пар оснований в месте интеркаляции для спирали в В-форме [24]. Характерно, что структуры всех 1:2 комплексов, образующиеся при интеркаляции профлавина в CG-участки рассмотренных тетрауклеотидов, существенно не отличаются друг от друга. Несколько иная геометрия получается при встраивании лиганда в GC-сайт тетрауклеотида d(ApGpCpT), хотя различия в структурах не столь значительны и общая ориентация хромофора относительно пар оснований сохраняется (см. рис. 7). Подобная близость структур 1:2 комплексов наблюдается и при связывании профлавина с изомерными CG- и GC-дуплексами [7, 9]. Следовательно, можно сделать вывод о том, что в случае 1:2 комплексов взаимное расположение молекулы красителя и плоскостей азотистых оснований практиче-

Таблица 2

Расчетные значения параметров комплексообразования профлавина с дезокситетрануклеотидами 5'-d(ApCpGpT) и 5'-d(ApGpCpT)

Параметр	5'-d(ApCpGpT)				5'-d(ApGpCpT)			
	H <sub>M</sub>	H <sub>A</sub>	H <sub>B</sub>	H <sub>X</sub>	H <sub>M</sub>	H <sub>A</sub>	H <sub>B</sub>	H <sub>X</sub>
Δδ <sub>1</sub> , м. д.	1,03	0,80	0,72	1,01	1,00	0,89	0,86	1,18
Δδ <sub>2</sub> , м. д.	0,53	0,60	0,45	0,95	0,82	0,68	0,79	0,70
Δδ <sub>3</sub> , м. д.	0,83	0,87	0,87	0,93	0,81	0,89	0,87	0,79
Δδ <sub>4</sub> , м. д.	0,79	0,81	0,91	0,96	0,76	0,75	1,04	0,84
K <sub>1</sub> , 10 <sup>3</sup> л/моль	—	22000±1800	—	—	—	24300±1500	—	—
K <sub>2</sub> , 10 <sup>3</sup> л/моль	—	1520±380	—	—	—	470±150	—	—
K <sub>3</sub> , 10 <sup>3</sup> л/моль	—	15700±2300	—	—	—	3400±450	—	—
K <sub>4</sub> , 10 <sup>3</sup> л/моль	—	4880±1220	—	—	—	7000±1200	—	—

ски не зависит от последовательности оснований в CG-сайтах тетрамеров и от того, какие нуклеозиды фланкируют участок связывания с лигандом. Вместе с тем, как было показано выше, характер нуклеотидной последовательности существенно влияет на величины равновесных констант комплексообразования и, значит, на вероятность образования таких структур в растворе. Можно предположить, что избирательность связывания профлавина с пиримидин-пуриновой последовательностью оснований вызвана, главным образом, различными конформационными перестройками тетрануклеотидов при интеркаляции красителя. Исследования интеркалированных комплексов красителя с динуклеотидами в кристаллах [25] свидетельствуют, что структура сахарофосфатного остова в ассоциатах зависит от нуклеотидной последовательности.

Важной проблемой является установление общих принципов избирательного взаимодействия биологически активных ароматических веществ с нуклеиновыми кислотами. Анализ структур кристаллических комплексов ароматических молекул с олигонуклеотидами позволил выделить наиболее существенные физико-химические факторы, определяющие избирательное взаимодействие лигандов [26]. К ним относятся конформационные состояния различных последовательностей нуклеотидов, чувствительные как к плоскому хромофору лиганда, так и к его боковым цепям; стерические различия между большим и малым желобками дуплексов, которые могут играть существенную роль, если интеркалирующий агент имеет массивные привески; наличие у лигандов атомных групп, обладающих потенциальной способностью образовывать водородные связи с донорами и акцепторами H-связей в основаниях нуклеиновых кислот; существование заряда либо на самом хромофоре, либо на боковых цепях лиганда. Можно ожидать, что указанные факторы будут определять специфичность и при связывании ароматических молекул с олигонуклеотидами в растворе.

**Резюме.** На основі даних одно- і двовірної  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектроскопії (500 МГц) розглянуто комплексоутворення акридинового забарвника профлавіну із самокомплементарними дезокситетрарибонуклеозидтрифосфатами 5'-d(GpCpGpC), 5'-d(CpGpCpG), 5'-d(ApCpGpT), 5'-d(ApGpCpT) у водному розчині. Двовірніа гомоядерна  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектроскопії (2D-COSY і 2D-NOESY) використана для повного віднесення сигналів протонів молекул у розчинах та для якісного аналізу характеру взаємодії профлавіну з тетрануклеотидами. Розглянуто експериментальні концентраційні залежності протонних хімічних зсувів молекул та різні схеми комплексоутворення забарвника з тетрануклеотидами, що враховують рівновагу асоціатів у розчині. Вивчено відносний зміст комплексів у розчині і виявлено особливості динамічної рівноваги в залежності від послідовності основ в нуклеотидному ланцюгу. Виходячи з одержаних даних зроблено висновок про переважну інтеркаляцію профлавіну в CG-сайти тетрануклеотидів у дуплексній формі. Порівняльний аналіз найбільш вірогідних структур 1:2 комплексів забарвника з тетрануклеотидами виконано на основі розрахункових значень індукованого хімічного зсуву та 2M-NOE-спектру.

**Summary.** Complex formation between acridine dye proflavine and self-complementary deoxytetranucleoside triphosphates 5'-d(GpCpGpC), 5'-d(CpGpCpG), 5'-d(ApCpGpT), 5'-d(ApGpCpT) in aqueous solution has been considered using data of one-dimensional and two-dimensional  $^1\text{H}$ -NMR spectroscopy (500 MHz). Two-dimensional homonuclear  $^1\text{H}$ -NMR spectroscopy (2D-COSY and 2D-NOESY) was used for complete assignments of proton signals of molecules in solutions and for qualitative analysis of the nature of interaction of proflavine with tetranucleotides. Concentration dependences of proton chemical shifts of the molecules have been analyzed. Different schemes of complex formation between dye molecules and tetranucleotides have been examined taking into account various molecular associates in solutions. Analysis of relative content of different types of complexes has been made and special features of dynamic equilibrium have been revealed as a function of base sequence of tetranucleotides. Based on the obtained results a conclusion has been made about preferential intercalation of proflavine to CG-site of tetranucleotides in duplex form. A comparative analysis of the most favourable structures of 1:2 complexes of dye with tetranucleotides has been made.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Krugh T. R., Reinhardt C. G.* Evidence for sequence preferences in the intercalative binding of ethidium bromide to dinucleotide monophosphates // *J. Mol. Biol.*— 1975.— **97**, N 1.— P. 133—162.
2. *Patel D. J., Canuel L. L.*, Sequence specificity of mutagen-nucleic acid complexes in solution // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*— 1977.— **74**, N 7.— P. 2624—2628.
3. *Kastrup R. V., Young M. A., Krugh T. R.* Ethidium bromide complexes with self-complementary deoxytetranucleotides. Demonstration and discussion of sequence preferences in the intercalative binding of ethidium bromide // *Biochemistry.*— 1978.— **17**, N 23.— P. 4855—4864.
4.  $^1\text{H}$  and  $^{31}\text{P}$  NMR investigation of actinomycin D binding selectivity with oligodeoxyribonucleotides containing multiply adjacent d(CG) sites / E. V. Scott, R. L. Jones, D. L. Banville et al. // *Ibid.*— 1988.— **27**, N 3.— P. 915—923.
5. *Reassessment of structural characteristics of the d(CGCG)<sub>2</sub>: actinomycin D complex from complete  $^1\text{H}$  and  $^{31}\text{P}$  NMR* / M. Delapierre, C. V. Heijenoort, J. Igolen et al. // *J. Biomol. Struct. and Dyn.*— 1987.— **7**, N 3.— P. 557—589.
6. *Chem. F.-M.* Binding specificities of actinomycin D to self-complementary tetranucleotide sequences — XGCU // *Biochemistry.*— 1988.— **27**, N 19.— P. 6393—6397.
7. *Веселков А. Н., Дымант Л. Н., Барановский С. Ф.* Исследование взаимодействия профлавина с изомерными динуклеозидмонофосфатами CpG и GpC методом протонного магнитного резонанса // *Молекуляр. биология.*— 1986.— **20**, № 5.— С. 1244—1250.
8. *Neidle S., Berman H.* X-ray crystallographic studies of nucleic acids and nucleic acid-drug complexes // *Progr. Biophys. and Mol. Biol.*— 1983.— **41**.— P. 43—66.
9. *Veselkov A. N., Karawajew L. S., Djimant L. N.* Proton magnetic resonance study of complex formation between proflavine and ribonucleotide monophosphates in aqueous solution // *Stud. biophys.*— 1987.— **120**, N 1.— P. 87—107.
10. *1М- и 2М- $^1\text{H}$ -ЯМР исследование самоассоциации дезокситетрарибонуклеозидтрифосфатов различной последовательности оснований в водном растворе* / А. Н. Веселков, Д. Дэвис, Л. Н. Дымант и др. // *Биополимеры и клетка.*— 1991.— **7**, № 5.— С. 15—22.
11. *NMR distance measurements in DNA duplexes: sugars and bases have the same correlation times* / B. R. Reid, K. Banks, P. Flynn, W. Nerdal // *Biochemistry.*— 1989.— **28**, N 26.— P. 10001—10007.
12. *Giessner-Prettre C., Pullman B.* Quantum mechanical calculations of NMR chemical shifts in nucleic acids // *Quart. Rev. Biophys.*— 1987.— **20**, N 1.— P. 113—172.
13. *Mitchell P. R., Sigel H.* A proton nuclear-magnetic-resonance study of self-stacking in purine and pyrimidine nucleosides and nucleotides // *Eur. J. Biochem.*— 1978.— **88**, N 1.— P. 149—154.
14. *Reinhardt C. G., Krugh T. R.* A comparative study of ethidium bromide complexes with dinucleotides and DNA: direct evidence for intercalation and nucleic acid sequence preferences // *Biochemistry.*— 1978.— **17**, N 23.— P. 4845—4854.
15. *Веселков А. Н., Дымант Л. Н., Древаль С. С.* Исследования самоассоциации молекулы профлавина и акридинового оранжевого в водном растворе методом ЯМР  $^1\text{H}$  // *Теорет. и эксперим. химия.*— 1987.— № 3.— С. 373—376.
16. *Веселков А. Н., Дымант Л. Н., Барановский С. Ф.* Термодинамические параметры самоассоциации молекул профлавина в водном растворе // *Хим. физика.*— 1989.— **8**, № 9.— С. 1282—1285.
17. *Веселков А. Н., Дымант Л. Н., Куликов Э. Л.* Применение вариационных методов обработки экспериментальных данных при исследовании агрегации молекул акридиновых красителей методом ЯМР высокого разрешения // *Там же.*— 1984.— **3**, № 8.— С. 1101—1108.
18. *Куликов Э. Л., Веселков А. Н., Дымант Л. Н.* Применение ассоциативного вариационного принципа для обработки данных физического эксперимента // *Укр. физ. журн.*— 1984.— **29**, № 10.— С. 1477—1484.
19. *Математическое обеспечение ЕС ЭВМ. Безусловная минимизация функций.*— Минск, 1981.— Вып. 17.— С. 10.
20. *Минимизация в инженерных расчетах на ЭВМ* / С. Ю. Гуснин, Г. А. Омелянов, Г. В. Резников, В. С. Сироткин.— М.: Машиностроение, 1981.— 120 с.
21.  *$^1\text{H}$ -NMR studies of a monointercalating drug into a d(CpGpApTpCpG)<sub>2</sub> minihelix* / M. Delapierre, A. Delbarre, B. L. Destaintot, J. Igolen // *Biopolymers.*— 1987.— **26**, N 5.— P. 981—1000.
22. *Delapierre M., Hujinh D. T., Roques B. P.*  $^1\text{H}$ -NMR studies of a monointercalating drug into a d(CpGpApTpCpG)<sub>2</sub> minihelix // *Ibid.*— 1989.— **28**, N 11.— P. 2097—2113.
23. *Delapierre M., Hujinh D. T., Roques B. P.* Bisintercalation of ditercalinium into a d(CpGpApTpCpG)<sub>2</sub> minihelix: a  $^1\text{H}$ - and  $^{31}\text{P}$ -NMR study // *Ibid.*— P. 2115—2142.
24. *Berman H. M., Neidle S., Stodola R. K.* Drug-nucleic acid interactions: conformational flexibility at the intercalation site // *PNAS USA.*— 1978.— **75**, N 2.— P. 828.
25. *X-ray crystallographic analysis of a ternary intercalation complex between proflavine and the dinucleoside monophosphates CpA and UpG* / A. Aggarwal, S. A. Islam, R. Kuroda, S. Neidle // *Biopolymers.*— 1984.— **23**, N 5.— P. 1025—1041.
26. *Neidle S., Pearl L. H., Skelly J. V.* Structural aspects of drug-DNA complexes: molecular modelling of intercalative interactions // *Biochem. J.*— 1987.— **243**, P. 1.

Севастоп. приборостроит. ин-т  
Бёркбек колледж Лондон. ун-та

Получено 09.04.91