

Особенности процесса самоассоциации дезоксигексануклеотида 5'-d(GpCpApTpGpC) и его комплексообразования с антрациклиновым антибиотиком дауномицином в водном растворе

А. Н. Веселков, Р. Дж. Итон¹, В. И. Пахомов, О. В. Рогова,
В. С. Волынкин, А. В. Семанин, Л. Н. Дымант, Д. Б. Дэвис¹

Севастопольский национальный технический университет Министерства образования и науки Украины
Студгородок, Севастополь, 99053, Украина
E. mail: veselkov@sevgtu.sebastopol.ua

¹ Беркбек колледж Лондонского университета
Малет-стрит, Лондон WC1E 7HX, Великобритания

Методами одномерной и двухмерной корреляционной ¹H-ЯМР спектроскопии (2M-TOCSY и 2M-NOESY) исследована самоассоциация самокомплементарного дезоксигексануклеотида 5'-d(GpCpApTpGpC) и его комплексообразование с противоопухолевым антибиотиком дауномицином в водном растворе. Измерены концентрационные и температурные зависимости химических сдвигов необмениваемых протонов дезоксигексануклеотида и дауномицина, по которым рассчитаны равновесные константы и термодинамические параметры (ΔH и ΔS) реакций образования дуплекса d(GCATGC) и комплексов гексамера с антибиотиком. На основе анализа изменений протонных химических сдвигов гексамера в области низких концентраций и при сравнительно невысоких температурах сделано предположение о формировании последовательностью d(GCATGC) компактной структуры (например, подобной шпильке) в водном растворе. Построены пространственные структуры шпильки и интеркаляционного комплекса дауномицина с дуплексом гексамера d(GCATGC) методами молекулярной механики с использованием программы X-PLOR. Проведен сравнительный анализ параметров образования комплексов антибиотика дауномицина с дезоксигексануклеотидами различной последовательности оснований в цепи.

Введение. Дауномицин (DAU) — представитель антрациклиновой группы антибиотиков — обладает выраженным противоопухолевым действием и широко применяется в клинической практике для химиотерапии онкологических заболеваний [1—3]. Для повышения терапевтической эффективности дауномицина синтезировано и испытано довольно большое количество его химических аналогов, но, к сожалению, лишь немногие из структурно модифицированных соединений имеют сопоставимое с DAU лечебное действие, меньший побочный эф-

фект или существенно отличаются по спектру мидико-биологической активности [2, 4—6].

Детальный молекулярный механизм фармакологического действия антрациклиновых антибиотиков на организм окончательно не выяснен. DAU способен нековалентно связываться с ДНК, РНК, хроматином и клеточной мембраной, в связи с чем предполагается, что его действие связано с разнообразными процессами в организме, включая ингибирование синтеза ДНК, образование свободных радикалов и липидную пероксидацию, связывание с молекулой ДНК и ее алкилирование, химическое (ковалентное) соединение антибиотика с ДНК (с образованием сшивок), непосредственное влияние на функционирование клеточных мембран [7—9].

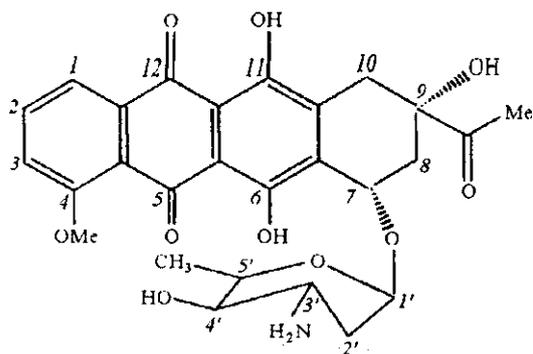


Рис. 1. Структурная формула молекулы дауномицина с указанием положений необменивающихся протонов антибиотика

Считается, что такое многообразие функционирования дауномицина во многом является результатом ингибирования действия топоизомеразы II за счет образования тройных комплексов DAU—ДНК-топоизомеразы II, приводящих к разрывам в полимерной молекуле нуклеиновой кислоты [10, 11]. Образование тройного комплекса, в свою очередь, обусловлено интеркаляционным связыванием ароматической молекулы дауномицина с двойной спиралью ДНК [10—12].

Молекулярную структуру дауномицина (рис. 1) можно условно подразделить на два характерных структурных элемента: плоский агликонный (тетрагидротетраценхинонный) хромофор, интеркалирующий при комплексообразовании с ДНК между соседними парами оснований, и положительно заряженное аминосахарное кольцо, располагающееся в малой бороздке двойной спирали нуклеиновой кислоты [13—16]. Система сопряженных колец хромофора DAU отличается конформационной стабильностью, в то время как аминосахарное кольцо конформационно более подвижно [13—16], при этом общая конфигурация молекулы определяет специфику интеркаляции антибиотика в правую двойную спираль *B*-формы.

Для сравнения: энантиомер дауномицина WP900 специфичен к левозакрученной спирали *Z*-ДНК, следовательно, антрациклины с различной хиральностью при комплексообразовании инициируют переход в ту или иную конформацию дуплексной формы ДНК [17]. Преимущественное связывание DAU с правой спиралью, как полагают, вызвано стерическим соответствием между аминосахарным остатком антибиотика и малой бороздкой правой спирали *B*-формы, что обеспечивает возможность установления энергетически выгодных межатомных контактов при образовании комплекса [15, 17, 18].

Экспериментальные данные о селективности связывания дауномицина с нативной ДНК и синтетическими полинуклеотидами указывают на то, что эффективная константа связывания антибиотика возрастает с увеличением содержания G·C-пар оснований ([19] и ссылки в ней). Теоретические исследования [20, 21] указывают на то, что DAU проявляет специфику к триплетным нуклеотидным последовательностям дуплексной ДНК, причем наиболее предпочтительными являются две смежные G·C-пары оснований, фланкированные на 3'-конце A·T-парой (т. е. 5'-GCA и 5'-CGT участки). Экспериментальные исследования (футпринтинг) также указывают на преимущественную интеркаляцию дауномицина в нуклеотидные триплеты 5'-GC(A/T) и 5'-CG(A/T) [22]. Вместе с тем компьютерное моделирование пространственных структур интеркаляционных комплексов близкого аналога дауномицина — доксорубина (адриамицина) с некоторыми фрагментами дуплексной ДНК свидетельствует о прямом взаимодействии аминосахарного кольца лиганда с четвертой парой оснований, а именно — образование довольно сильной водородной связи между N3'-аминогруппой антибиотика и расположенным в малой бороздке ДНК карбонильным кислородом цитозина или тимина [4]. Поскольку сиквенс-специфичность (специфичность к последовательности) DAU не столь явно выражена по сравнению с другими типичными интеркаляторами ДНК (ароматические красители, актиномицин D и др.) и в значительной степени определяется взаимодействиями аминосахарного кольца антибиотика в малой бороздке [23], то участие четвертой пары оснований ДНК может оказаться существенным при анализе селективности связывания антибиотика.

Изучение селективности связывания антибиотика с полимерной молекулой ДНК затруднительно из-за сложности структуры, конформационной изменчивости макромолекулы и наличия большого разнообразия мест связывания ароматического лиганда в полимерной цепи. При этом экспериментально установлено, что селективность, которую проявляют лиганды, наблюдается уже в коротких нуклеотидных последовательностях, включающих соответствующий сайт [24—27].

Как показали результаты исследований комплексообразования DAU с самокомплементарными дезокситетрануклеотидами [24, 25] и дезоксигексануклеотидами [28, 29], антибиотик преимущественно интеркалирует в концевые участки исследо-

ванных олигонуклеотидов независимо от последовательности оснований в цепи. Это, по-видимому, обусловлено большей доступностью упомянутых сайтов для интеркаляционного встраивания довольно объемного хромофора дауномицина, поскольку концевые участки имеют большую конформационную свободу в сравнении с сайтами связывания антибиотика в средней части олигонуклеотидного дуплекса. Кристаллографические исследования структур комплексов дауномицина с дезоксигексануклеотидами различной последовательности оснований в цепи [15, 16] подтверждают этот вывод.

Исследования комплексообразования DAU с двухспиральными дезокситетрануклеотидами показали [24, 25], что сиквенс-специфичность взаимодействия антибиотика практически не проявляется при замене А·Т- и G·C-пар в триплетном участке связывания. Это, по-видимому, в значительной степени обусловлено отклонениями структур дуплексов дезокситетрануклеотидов от канонической двойной спирали в растворе при комнатной температуре. Кроме того, в комплексах дауномицина с изученными тетрануклеотидными последовательностями 5'-d(ApCpGpT), 5'-d(ApGpCpT), 5'-d(TpGpCpA), 5'-d(GpCpGpC) и 5'-d(CpGpCpG) [24, 25] при условии, что хромофор DAU интеркалирует в концевой участок дезокситетрануклеотида, аминокислотное кольцо антибиотика располагается в малой бороздке дуплекса в области, содержащей G·C-пары, что менее предпочтительно для связывания DAU с дуплексом, чем при наличии А·Т-пары азотистых оснований [21, 22].

Для изученных нами самокомплементарных дезоксигексануклеотидов 5'-d(CpGpTpApCpG), 5'-d(CpGpCpGpCpG) и 5'-d(TpApCpGpTpA) [28, 29] нарушения в структуре дуплекса проявляются в меньшей степени и, следовательно, специфичность к последовательности, структурные и термодинамические параметры комплексообразования оказываются более близкими к параметрам взаимодействия DAU с полимерной ДНК в водном растворе. Анализ результатов показал, что хромофор дауномицина встраивается со стороны малой бороздки в концевые области гексамеров (d(CpG)- и d(TpA)-сайты соответственно), при этом триплетные участки преимущественного связывания лиганда можно расположить в следующем порядке: 5'-d(CGТ) > 5'-d(CGC) > 5'-d(TAC) [28, 29].

Следует отметить, что стабильность и конформационные особенности олигонуклеотидных дуплексов существенно зависят от их длины, нуклео-

тидного состава и последовательности оснований в цепи [28—33]. Экспериментальные данные [28—33] свидетельствуют о том, что даже небольшие изменения в последовательности оснований в цепи приводят к заметным различиям в значениях энтальпии (ΔH) и энтропии (ΔS) реакций образования олигонуклеотидных дуплексов. В частности, для дезокситетрануклеотидов величина ΔH образования дуплекса оказывается несколько ниже соответствующего расчетного значения энтальпии образования «идеальной» двойной спирали фрагментов ДНК [30, 32, 34], в то время как для дуплексов дезоксигексануклеотидов [28, 29] и дезоксиоктануклеотида [31], у которых относительное влияние концевых нуклеотидных пар существенно меньше, чем в случае тетрамеров, значения ΔH хорошо согласуются с теоретическими оценками по модели «ближайшего соседа» [32].

Сопоставление значений термодинамических параметров образования дуплексов различной длины и нуклеотидной последовательности, полученных в одинаковых экспериментальных условиях, позволяет сделать некоторые выводы о возможных кооперативных эффектах и особенностях конформационных изменений в цепи при формировании дуплекса. В свою очередь, сравнительный анализ структурных и термодинамических параметров комплексообразования антибиотика дауномицина с различными дезоксиолигонуклеотидами важен для выяснения природы селективности связывания антибиотика с определенными нуклеотидными последовательностями.

В настоящей работе методами одномерной и двумерной корреляционной ЯМР спектроскопии (500 МГц) изучена самоассоциация самокомплементарного дезоксигексануклеотида d(GpCpApTpGpC), имеющего инвертированную нуклеотидную последовательность по отношению к исследованному ранее изомерному гексамеру d(CpGpTpApCpG) [28], и его комплексообразование с антибиотиком дауномицином в водно-солевом растворе.

Материалы и методы. Дезоксигексарибонуклеозидпентафосфат 5'-d(GpCpApTpGpC), синтезированный компанией «Oswel DNA Service» (Великобритания), и дауномицин («Fluka», ФРГ) использовали без дополнительной очистки. Антибиотик и дезоксигексануклеотид лиофилизировали из 99,95 %-го D₂O и растворяли в дейтерированном 0,1 М фосфатном буфере, рD 7,1, содержащем 10⁻⁴ М ЭДТА. Концентрацию DAU определяли спектрофотометрически, используя коэффициент молярной

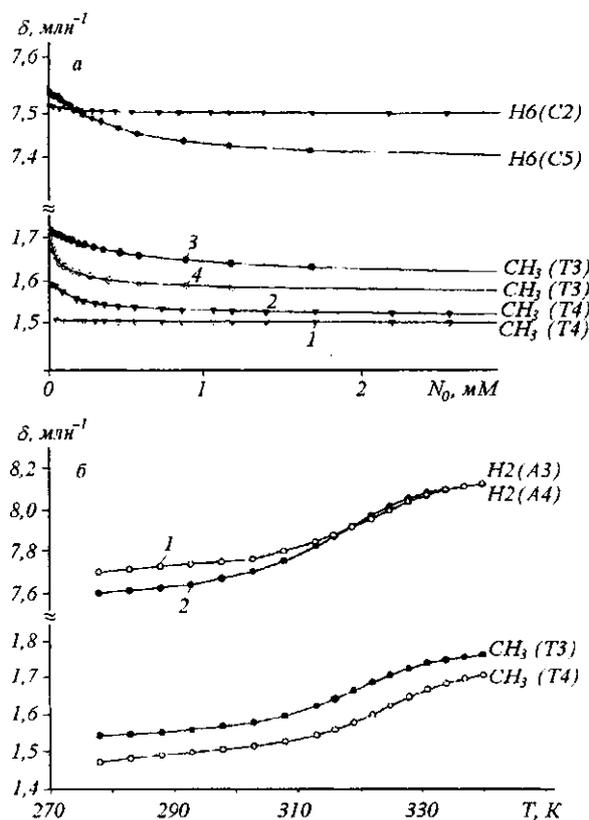


Рис. 2. Зависимости протонных химических сдвигов изомерных дезоксигексануклеотидов в 0,1 М фосфатном буфере: а — от концентрации гексамера d(GCATGC) при температуре 298 К (1) и 308 К (2), а также гексамера d(CGТАСG) [28] при температуре 303 К (3) и 313 К (4); б — от температуры раствора: для d(GCATGC) при N₀ = 3,07 мМ (1) и для гексамера d(CGТАСG) при N₀ = 2,95 мМ [28] (2)

экстинкции 11500 М⁻¹·см⁻¹ (λ = 477 нм) [35, 36].

Гомоядерные 1М- и 2М-¹H-ЯМР (2М-ТОСУ и 2М-НОЕСУ) и гетероядерные ¹H-³¹P (НМВС) ЯМР спектры измерены на спектрометре «Bruker DRX» (500 МГц). Протонные химические сдвиги (δ) определяли относительно внутреннего стандарта — ТМА и затем пересчитывали относительно ДСС, т. е. δ_{ДСС} = δ_{ТМА} + 3,178 млн⁻¹. Резонансные сигналы ³¹P в ЯМР спектрах 2М-НМВС (202 МГц) измеряли относительно сигнала ядер фосфора буфера. Методика приготовления образцов и проведения одно- и двумерных ЯМР экспериментов достаточно подробно описана ранее [26, 27, 37, 38].

Концентрационные зависимости протонных химических сдвигов измеряли при двух температурах: исследование самоассоциации гексамера d(GCATGC) проводили при T₁ = 298 и T₂ = 308 К и при изменении концентрации гексамера N₀ в

пределах от 0,02 до 3,07 мМ, а комплексообразование дезоксигексануклеотида с дауномицином изучали при 308 и 318 К, при этом концентрацию дауномицина D₀ поддерживали постоянной и равной 0,49 мМ, а величину N₀ изменяли в пределах 0,015—0,95 мМ. Температурные зависимости протонных химических сдвигов взаимодействующих молекул измеряли в диапазоне температур от 278 до 340 К при постоянных составах растворов: исследование самоассоциации — при N₀ = 3,07 мМ, комплексообразования — при N₀ = 0,19 мМ, D₀ = 0,49 мМ. Температуру образцов регулировали (с точностью ΔT = ±0,5 К) с помощью терморегулятора ВТТ-3000.

Результаты и обсуждение. Самоассоциация гексамера 5'-d(GpCpApTpGpC). Процедура отождествления ЯМР сигналов протонов олигонуклеотида, по данным двумерных корреляционных спектров 2М-ТОСУ и 2М-НОЕСУ, соответствовала известной методике [39]. Полученные значения химических сдвигов для всех необменивающихся протонов исследуемого дезоксигексануклеотида d(GCATGC) находятся в хорошем согласии с отождествлением протонных сигналов гексамера, выполненным ранее в близких экспериментальных условиях [40, 41].

На рис. 2, а, в качестве примера представлены концентрационные зависимости химических сдвигов двух необменивающихся протонов цитозина и тимина дезоксигексануклеотида d(GCATGC), измеренные при температурах 298 и 308 К. Там же для сравнения приведены кривые титрования для аналогичных протонов оснований изомерного дезоксигексануклеотида d(CGТАСG) при различных температурах (303 и 313 К) [28]. Из данных рис. 2, а, видно, что все указанные зависимости имеют монотонный характер — с увеличением концентрации (N₀) гексамера в растворе для рассматриваемых протонов отмечается химический сдвиг в область сильного поля. Обращают на себя внимание незначительные изменения химических сдвигов протонов d(GCATGC) в исследованном диапазоне концентраций (0,02 ÷ 3,1 мМ) по сравнению с кривыми титрования для изученного ранее гексамера d(CGТАСG) в аналогичном растворителе [28]. При этом наблюдаются качественно различные изменения, касающиеся температуры кривых титрования изомерных последовательностей: при повышении температуры раствора для протонов CH₃(T4) гексамера d(GCATGC) отмечена более выраженная зависимость химического сдвига от

концентрации $\delta(N)$, а для аналогичных протонов $\text{CH}_3(\text{T3})$ изомерного дезоксигексануклеотида d(C-GTACG) имеет место обратная картина — этот эффект проявляется при понижении температуры (рис. 2, а).

В то же время температурные зависимости протонных химических сдвигов дезоксигексануклеотида d(GCATGC), как видно из рис. 2, б, имеют S-образную форму, типичную для плавления дуплекса, и хорошо коррелируют с аналогичными зависимостями химических сдвигов протонов исследованного ранее гексамера d(CGTAACG) [28]. Экстраполяция концентрационных зависимостей гексамера d(GCATGC) к нулевой концентрации дает существенно более низкие значения химических сдвигов по сравнению со значениями химических сдвигов зависимостей $\delta(T)$ при максимальной температуре измерений, когда практически весь гексамер находится в одноцепочечном состоянии. Это не согласуется с моделью двух состояний (мономер—дуплекс), поскольку в таком случае концентрационные и температурные кривые должны приближаться к значению протонных химических сдвигов мономера дезоксигексануклеотида в растворе, что имело место для всех исследованных ранее самокомплементарных дезоксигексануклеотидов, в частности, d(CGTAACG), d(CGCGCG) и d(TACGTA) [28, 29].

Можно предположить, что причиной подобного различия в ходе концентрационных зависимостей гексамеров при низких температурах является формирование одноцепочечным дезоксигексануклеотидом d(GCATGC) в растворе компактной структуры (например, подобной шпильке), в которой магнитное экранирование протонов близко к наблюдаемому в дуплексе гексамера. Такое предположение обусловлено повышенной конформационной гибкостью гексамера на участке d(ApT). В частности, при рентгеноструктурном анализе образцов дезоксигептануклеотида d(GCATGCT) обнаружено, что на этом участке возможен довольно сильный изгиб сахаро-фосфатного остова и образование петли с двумя внутримолекулярными водородными связями G1(N2)-C6(O2) и G5(N2)-C2(O2) в «стебле» шпильчатой структуры, которая с другой такой же петлей формирует квадруплекс с каноническим G·C и неканоническим A·A спариванием оснований [42].

Для определения равновесной константы K_D и термодинамических параметров (ΔH_D^0 и ΔS_D^0) реакции образования дуплекса гексамера d(GCA-

TGC) в растворе использованы температурные зависимости протонных химических сдвигов (рис. 2, б). Для описания экспериментальных кривых в качестве основной использована модель двух состояний [28, 29, 31] в предположении, что вклад компактной структуры гексамера играет существенную роль лишь в области малых концентраций и при сравнительно низких температурах. Согласно такой модели, результирующий химический сдвиг протона гексамера $\delta_N(N_0, T)$ при исходной концентрации гексамера N_0 и температуре T может быть представлен в виде:

$$\delta_N(N_0, T) = \delta_m(T)f_m(N_0, T) + \delta_d f_d(N_0, T), \quad (1)$$

где $\delta_m(T)$, δ_d и $f_m(N_0, T)$, $f_d(N_0, T)$ — протонные химические сдвиги и равновесные мольные доли (в расчете на цепь) гексамера в мономерной и дуплексной формах соответственно. В выражении (1) учтено, что значение $\delta_m(T)$ монотонно изменяется с увеличением температуры за счет конформационных перестроек мономера, в то же время для конформационно более стабильных дуплексных структур полагалось, что δ_d от температуры практически не зависит [43, 44]. В расчетной модели использовали закон действующих масс и уравнение материального баланса [44]. Искомые параметры δ_m , δ_d , входящие в уравнения (1), и K_D определяли вариационным методом из условия минимума квадратичной функции невязки экспериментальных и расчетных значений протонных химических сдвигов гексамера при различных температурах [28, 29, 31].

Аппроксимацию температурной зависимости мольной доли дуплекса гексамера в растворе проводили с применением регрессионного уравнения, используемого для описания кооперативных переходов типа «спираль—клубок», согласно методике, изложенной в работе [31]. Использовали формализм Вант-Гоффа для определения приращения энтальпии ΔH_D^0 и энтропии ΔS_D^0 при формировании дуплекса в предположении, что их величины постоянны в исследуемом температурном диапазоне (278—340 К) [28, 31].

Значения K_D , ΔH_D^0 и ΔS_D^0 (при 298 К) и величина температуры плавления дуплекса T_m , рассчитанные по температурным зависимостям химических сдвигов протонов гексамера d(GCATGC), представлены в табл. 1. Там же для сравнения приведены результаты расчета этих параметров для исследованного гексамера d(GCATGC) по модели «ближайшего соседа» [32].

Таблица 1

Параметры самоассоциации дезоксигексануклеотида 5'-d(GpCpApTpGpC) в 0,1 М Na-фосфатном буфере, рD 7,1, N₀ = 3,07 мМ при T = 298 К

Условия	K _D , 10 ³ л/моль	T _m , К	-ΔG _D ⁰ , кДж/моль	-ΔH _D ⁰ , кДж/моль	-ΔS _D ⁰ , Дж/(моль·К)
Эксперимент	126±51	323±2	29,1±0,9	173±8	486±21
Теория	—	—	27,7	182	518

*Значения параметров рассчитаны по модели «ближайшего соседа» [32].

Анализ результатов (табл. 1) показывает, что значение равновесной константы K_D реакции образования дуплекса d(GCATGC) несколько превышает константу самоассоциации гексамера d(CG-TACG), существенно выше величины K_D для d(T-ACGTA), но значительно меньше величины равновесной константы самоассоциации гексамера d(CGCGCG), определенных ранее методом ЯМР спектроскопии в идентичном растворителе [28, 29]. Это, очевидно, связано с различным составом и последовательностью нуклеотидов в указанных олигомерах. Полученные величины термодинамических параметров реакций образования дуплекса d(GCATGC) находятся в хорошем согласии (в расчете на одну пару оснований) с соответствующими значениями ΔH_D⁰ и ΔS_D⁰, рассчитанными по модели «ближайшего соседа» [32].

Следует отметить, что значения равновесной константы и температуры плавления для исследуемого дезоксигексануклеотида оказались несколько выше, чем для гексамера d(CG-TACG) с инвертированной последовательностью нуклеотидов в цепи [28].

Чтобы согласовать результаты температурных и концентрационных зависимостей протонных химических сдвигов молекул гексамера d(GCATGC) (см. рис. 2), в аддитивной модели (1) для анализа кривых концентрационного титрования (рис. 2, а) дополнительно был учтен вклад компактной (шпилькоподобной) формы мономера, магнитное экранирование протонов в которой может существенно отличаться от такового в «развернутой» мономерной последовательности [38]:

$$\delta_N(N_0) = \delta_m f_m(N_0) + \delta_d f_d(N_0) + \delta_H f_H(N_0),$$

$$f_m(N_0) + f_d(N_0) + f_H(N_0) = 1, \quad (2)$$

где δ_H и f_H(N₀) — протонный химический сдвиг и мольная доля дезоксигексануклеотида в компактной (шпилькоподобной) одноцепочечной структуре соответственно [38, 45]. Тогда зависимость хими-

ческого сдвига от концентрации N₀ олигонуклеотида в растворе можно представить в виде [38]:

$$\delta_N(N_0) = \delta_d + 2(\delta_0 - \delta_d)/(1 + \sqrt{1 + 8zN_0}), \quad (3)$$

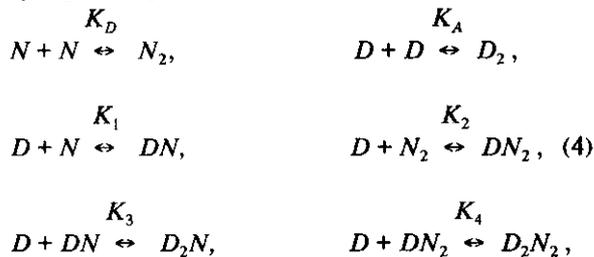
где δ₀ = (δ_m + δ_HK_H)/(1 + K_H) и z = K_D/(1 + K_H)², а K_H — равновесная константа образования компактной формы мономера.

При минимизации функционала невязки экспериментальных и расчетных значений химических сдвигов δ(N₀) исходные значения равновесной константы образования дуплекса K_D и значения протонных химических сдвигов в мономерной и дуплексной формах гексамера d(GCATGC) брали из результатов анализа температурных зависимостей химических сдвигов. Основанием для этого послужил тот факт, что компактная форма присутствует в растворе лишь при малых концентрациях и невысоких температурах, тогда как температура плавления гексамерного дуплекса довольно высока (T_m = 323 К) и температурную зависимость протонных химических сдвигов измеряли при максимальной концентрации гексамера в растворе (N_{0 max} = 3,07 мМ). В результате расчета по модели (3) получены значения равновесной константы образования «шпильки» гексамера при двух температурах K_H (298) ≈ 3, K_H (308) ≈ 0,8, что качественно согласуется с величиной равновесной константы образования шпильчатой структуры дезоксигептануклеотида d(GCGAAGC) в водном растворе [38].

Комплексообразование дауномицина с дезоксигексануклеотидом 5'-d(GpCpApTpGpC). Гомоядерная 2M-¹H ЯМР спектроскопия (2M-TOCSY и 2M-NOESY) и гетероядерная ¹H-³¹P ЯМР спектроскопия (2M-HMBC) использованы соответственно, для полного отнесения резонансов необменивающихся протонов и сигналов фосфора, а также для качественного определения мест преимущественного связывания антибиотика с гексамером. Анализ спектров 2M-NOE смешанных растворов дауномицина и гексамера показал, что дезоксигексануклеотид при

комплексообразовании с DAU находится в конформации, близкой к *B*-форме ДНК, как это имело место и в случае связывания антибиотика с исследованными ранее гексамерами d(CGTAACG), d(CGCGCG) [28] и d(TACGTA) [29]. В отличие от комплексообразования DAU с другими дезоксигексануклеотидами [28, 29], в 2M-NOE спектре смешанного раствора антибиотика с гексамером d(GCATGC) не выявлено достаточно надежных межмолекулярных кросс-пиков между протонами лиганда и нуклеотида. Вместе с тем на основании теоретических и экспериментальных работ других авторов [15, 16, 21], а также проведенных нами исследований комплексообразования DAU с тетрамерами [24, 25] и гексамерами ДНК [28, 29] сделано предположение о том, что DAU преимущественно интеркалирует в концевой d(GpC)-сайт гексануклеотидного дуплекса d(GpCpApTpGpC).

Для расчета параметров комплексообразования DAU с дезоксигексануклеотидом использовали модель молекулярного равновесия в растворе, предложенную ранее [28, 29]:



где D и N — мономеры DAU и гексамера, K_A и K_D — равновесные константы димеризации антибиотика и гексануклеотида, $K_1 \div K_4$ — равновесные константы образования 1:1 (DN), 1:2 (DN_2), 2:1 (D_2N) и 2:2 (D_2N_2) комплексов соответственно. С учетом условий эксперимента константы димеризации DAU приняты равными 234 и 153 л/моль при 308 и 318 К соответственно [46]. Согласно схеме реакций (4), наблюдаемый химический сдвиг протонов антибиотика δ_{DAU} может быть представлен в виде [28, 29]:

$$\begin{aligned}
 \delta_{DAU} = D/D_0(\delta_M + 2\delta_A K_A D + \delta_1 K_1 N_1 + \delta_2 K_2 K_D N^2 + \\
 + 2\delta_3 K_3 K_1 N D + 2\delta_4 K_4 K_2 K_D N^2 D), \quad (5)
 \end{aligned}$$

где δ_M и δ_A — протонные химические сдвиги антибиотика в мономерной и ассоциированной (димерной) формах, $\delta_1 \div \delta_4$ — предельные значения химических сдвигов протонов дауномицина в составе комплексов DN , DN_2 , D_2N и D_2N_2 соответственно; D_0 — исходная концентрация лиганда. Для расчета

равновесных констант комплексообразования DAU с дезоксигексануклеотидом и предельных значений химических сдвигов в составе комплексов $\delta_1 \div \delta_4$ были измерены зависимости протонных химических сдвигов лиганда от концентрации олигонуклеотида N_0 и температуры T смешанного раствора (рис. 3). Минимизацию функционала квадратичной невязки между экспериментальными и теоретическими значениями химических сдвигов протонов DAU проводили по восьми варьируемым параметрам $K_1 \div K_4$ и $\delta_1 \div \delta_4$, вычислительная процедура нахождения которых достаточно подробно описана в работах [26, 27].

Результаты расчета значений равновесных констант K_i (где $i = 1, 2, \dots, 4$) образования различных типов комплексов DAU с гексамером d(GCATGC) и значений δ_i представлены в табл. 2. Использование аддитивной модели для аппроксимации экспериментальных зависимостей $\delta_{DAU}(N_0)$ и $\delta_{DAU}(T)$ предполагает достаточно быстрый обмен при комплексообразовании исследуемых молекул. Результаты анализа проведенных ЯМР экспериментов указывают на отсутствие существенного уширения резонансных сигналов протонов во всем исследованном диапазоне концентраций и температур, что подтверждает данное предположение.

Анализ расчетных значений равновесных констант $K_1 \div K_4$ образования 1:1, 1:2, 2:1 и 2:2 комплексов DAU с дезоксигексануклеотидами (табл. 2) показывает их качественное соответствие значениям констант при комплексообразовании DAU с гексамерами d(CGTAACG), d(CGCGCG) [28], d(TACGTA) [29] и согласуется с тем, что наблюдалось при связывании DAU с дезокситетрануклеотидами [24, 25]. Так, вероятность образования 1:2 комплекса DAU с дуплексом гексамера (K_2) гораздо больше, чем вероятность образования любых других комплексов антибиотик—гексануклеотид в водном растворе. Процесс встраивания второй молекулы DAU в гексамерный дуплекс в растворе имеет выраженный антикооперативный характер ($K_4 \ll K_2$), несмотря на наличие в гексамерной последовательности d(GCATGC) двух триплетных участков — потенциальных мест связывания DAU с олигонуклеотидом. Последнее, возможно, связано с особенностями комплексообразования молекулы DAU, содержащей массивное, положительно заряженное аминсахарное кольцо, создающее определенные стерические препятствия для присоединения к дуплексу гексамера d(GCATGC) второй молекулы антибиотика.

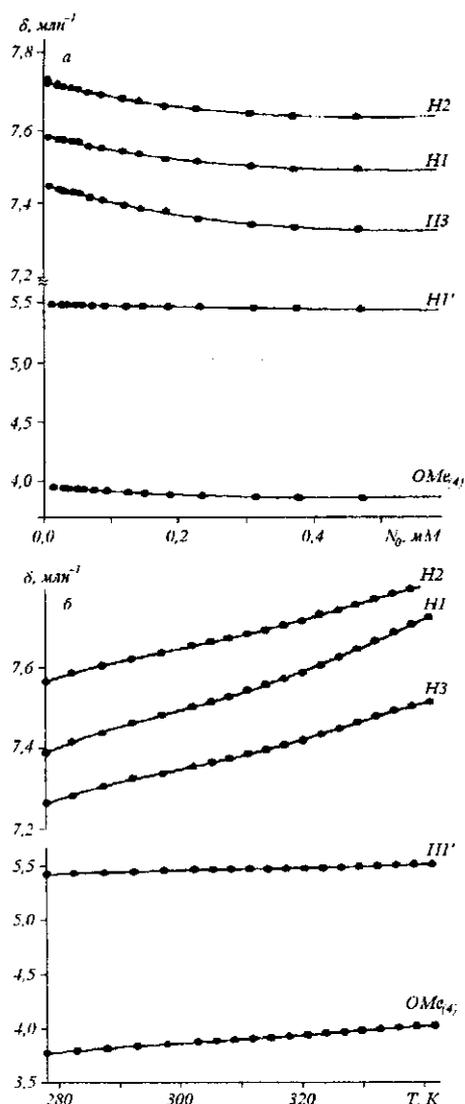


Рис. 3. Экспериментальные зависимости химических сдвигов необменивающихся протонов дауномицина в смешанном растворе с $d(GCATGC)$: а — от концентрации гексамера при $D_0 = 0,49$ мМ и $T = 308$ К; б — от температуры при $N_0 = 0,19$ мМ и $D_0 = 0,53$ мМ

Таблица 2

Расчетные значения параметров (δ_i , млн^{-1} и K_i , 10^3 л/моль) комплексообразования дауномицина с дезоксигексануклеотидом $d(GCATGC)$ при $T = 298$ К в 0,1 М фосфатном буфере, рD 7,1

Протон	δ_1	δ_2	δ_3	δ_4	δ_M	K_1	K_2	K_3	K_4
H2	7,82	7,6	7,47	7,28	7,83	—	—	—	—
H1	7,76	7,48	6,92	6,76	7,78	—	—	—	—
H3	7,21	7,36	7,15	6,33	7,55	139 ± 30	13000 ± 3000	55 ± 15	16 ± 15
H1'	4,52	5,47	5,04	5,34	5,52	—	—	—	—
OMe ₍₄₎	3,97	3,79	3,65	3,86	4,02	—	—	—	—

Следует отметить, что величина равновесной константы K_2 образования 1:2 комплекса DAU с $d(GCATGC)$ заметно больше соответствующих констант для комплексов антибиотика с гексамерами других нуклеотидных последовательностей, исследованных ранее [28, 29]. Этот результат однозначно свидетельствует о существовании специфического для последовательности связывания DAU с триплетными нуклеотидными последовательностями, при этом сродство антибиотика к триплетам убывает в ряду: $5'$ -d(GCA) > $5'$ -d(CGT) > $5'$ -d(CGC) > $5'$ -d(TAC). Таким образом, энергетически более выгодна интеркаляция антибиотика между G·C-парами оснований и при расположении аминокислотного кольца в малой бороздке двойной спирали, в области соседней А·Т-пары азотистых оснований, что согласуется с данными теоретических исследований [20, 21].

По найденным значениям равновесных констант комплексообразования рассчитано относительное содержание молекулярных комплексов в растворе в зависимости от r — отношения исходных концентраций дуплекса гексамера и антибиотика ($r = N_0/D_0$). В качестве примера на рис. 4 приведены результаты такого расчета для $T = 308$ К. Представленные зависимости качественно сходны с полученными при комплексообразовании DAU с тетрамерами [24, 25] и гексамерами других последовательностей оснований в цепи при тех же экспериментальных условиях [28, 29]. Анализ зависимостей на рис. 4 показывает, что относительное содержание 1:2 и 2:2 комплексов DAU с двухспиральным гексануклеотидом становится существенным уже при величинах $r \geq 0,5$ вследствие довольно большой величины равновесной константы K_2 связывания DAU с гексамерным дуплексом. В свою очередь, для смешанных растворов DAU и гексануклеотида $d(GCATGC)$ характерно несколько большее относительное содержание 1:2 и 2:2 комплексов, чем для растворов DAU с другими

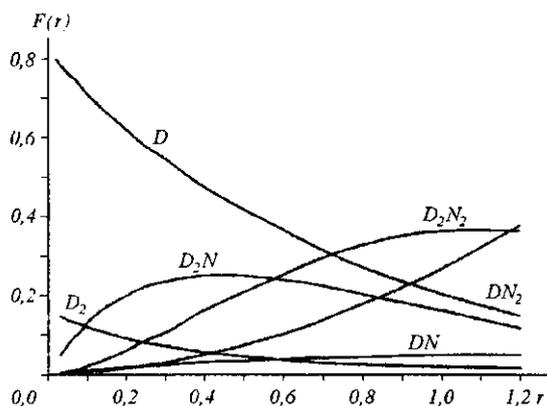


Рис. 4. Относительное содержание антибиотика и его комплексов с дезоксигексануклеотидом d(GCATGC) $F(r)$ в зависимости от отношения исходных концентраций дауномицина и гексамера r ($r = N_0/D_0$) при $T = 308$ К, $D_0 = 0,49$ мМ, в 0,1 М фосфатном буфере, рD 7,1

исследованными гексамерами, что, очевидно, обусловлено как более высокими значениями константы комплексообразования K_2 , так и сравнительно большой стабильностью дуплекса d(GCATGC) в водном растворе.

Компактная структура гексамера d(GCATGC) в растворе. Расчет пространственной компактной шпильчатой структуры гексамера d(GCATGC) выполнен методами молекулярной механики с использованием программы X-PLOR (версия 3.851) [47]. При минимизации потенциальной энергии молекулярного комплекса использовали параметрическую систему, дающую возможность дифференцированно определять межзатомные взаимодействия для каждого из азотистых оснований в нуклеиновых кислотах [48].

В стартовых конфигурациях молекулы дезоксигексануклеотида локальные конформационные параметры динуклеотидного стебля полагали близкими к наблюдаемым в B-форме ДНК, а конформацию петли шпильчатой структуры варьировали в достаточно широких пределах. Одна из возможных компактных одноцепочечных структур дезоксигексануклеотида d(GCATGC) в растворе представлена на рис. 5, а. Рассчитанная пространственная структура шпильки характеризуется сравнительно малым значением общей потенциальной энергии молекулярной системы и оптимальными энергетическими соотношениями между различными ее составляющими.

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о существовании в растворе сложного равновесия различных конформационных со-

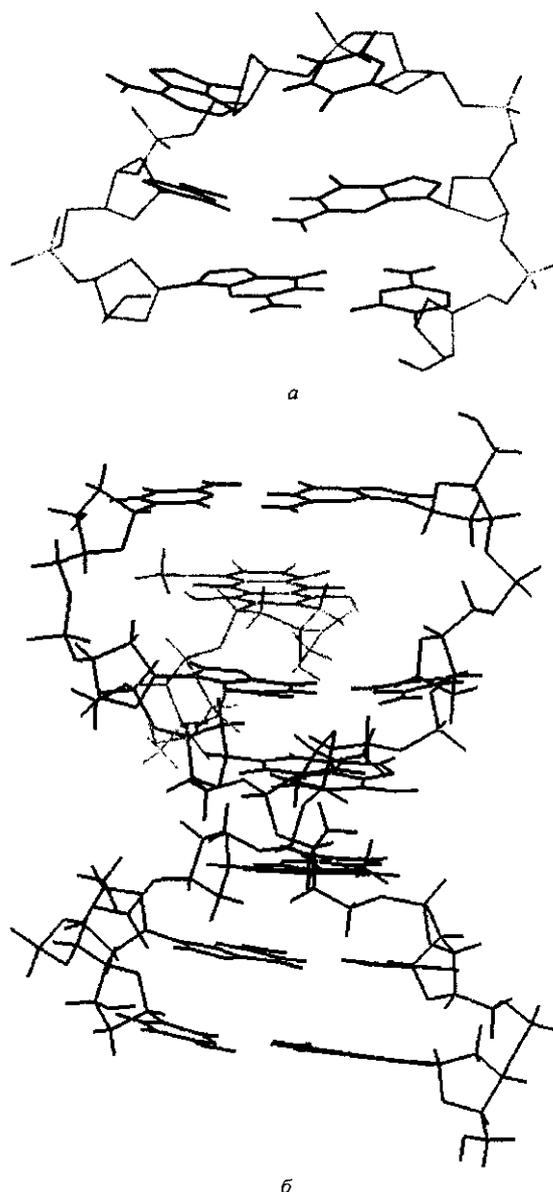


Рис. 5. Рассчитанные методами молекулярного моделирования пространственные структуры: а — компактная шпильчатая структура дезоксигексануклеотида d(GCATGC); б — комплекс дауномицина с дуплексом гексамера d(GCATGC) (вид сбоку, со стороны малой бороздки)

стояний дезоксигексануклеотида d(GCATGC), обусловленных его нуклеотидным составом и последовательностью оснований в цепи. Можно предположить, что наличие концевых оснований, образующих G·C-пары, в сочетании с центральными основаниями, образующими A·T-пары, в самокомплементарных дезоксиолигонуклеотидных последовательностях создает условия для формирования неканонических компактных структур (шпилькооб-

Таблица 3
Термодинамические параметры комплексообразования дауномицина с дезоксигексануклеотидом d(GCATGC) в 0,1 М фосфатном буфере, рD 7,1, при T = 298 К

Реакция	$-\Delta G_i^0$, кДж/моль	$-\Delta H_i^0$, кДж/моль	$-\Delta S_i^0$, Дж/(моль·К)
K_1 $D + N \leftrightarrow DN$	29,3±0,6	125±5	320±14
K_2 $D + N_2 \leftrightarrow DN_2$	40,6±0,5	124±4	280±12
K_3 $D + DN \leftrightarrow D_2N$	27,0±0,6	85±7	193±17
K_4 $D + DN_2 \leftrightarrow D_2N_2$	23,7±1,8	80±9	187±23

разных) даже в довольно коротких одноцепочечных фрагментах ДНК.

Структура комплекса дауномицин—5'-d(Gp-CpArTrGrC)₂. Расчет пространственной структуры интеркаляционного комплекса DAU—d(GCATGC)₂ выполнен методами молекулярной механики на основе полного атомного представления с использованием программ X-PLOR, NAMD [49] и силового поля CHARMM 27 [50]. Водное окружение моделировали молекулами воды в виде модели TIP3P [51], размещенными в прямоугольном боксе размером 2,9 × 3,2 × 3,3 нм³ (959 молекул). Нейтрализацию избыточных электрических зарядов в системе гексамер—DAU обеспечивали ионами Na⁺, размещенными в стартовых конфигурациях вблизи атомов фосфора на расстоянии 0,45—0,6 нм вдоль биссектрис углов O-P-O, а также ионом Cl⁻, координированным в области положительного заряда аминсахарного кольца DAU. Каждая олигнуклеотидная цепь оканчивалась с 5'- и 3'-концов OH-группой. Топология молекулы антибиотика и параметризация валентных взаимодействий DAU получена с помощью программы X-PLO2D [52] с использованием кристаллографических структур из PDB банка данных [53] (PDB ID коды 110d, 1d11, 1d12, 1da0) и результатов работы [13].

Конформационные состояния комплекса DAU с дуплексом гексамера d(GCATGC) определяли с помощью программы NAMD симуляцией молекулярной динамики с максимальным временем эволюции системы до 2 нс и временным шагом 2 фс, периодическими граничными условиями, алгоритмом PME учета дальних электростатических взаимодействий, процедурой SHAKE, ограничивающей деформацию валентных связей всех водородов с тяжелыми атомами, приведением системы к заданной температуре по алгоритму Брендсена [54] или

«отжигом» при температуре 600—300 К. Использовали также методики интерактивной молекулярной динамики с управлением симуляции в NAMD непосредственно из программы VMD [55]. Стартовую конфигурацию молекулярного комплекса для молекулярной динамики задавали средствами X-PLOR с последующей минимизацией потенциальной энергии молекулярной системы для исключения недопустимых ван-дер-ваальсовых контактов между атомами в системе.

При определении структур комплексов DAU—d(GCATGC)₂ дополнительно учитывали расчетные значения предельных химических сдвигов δ_i протонов антибиотика в составе 1:2 комплекса (табл. 3). Применяли модифицированную модель эквивалентных магнитных диполей [26, 27], основанную на аппроксимации квантово-механических кривых экранирования для азотистых оснований нуклеиновых кислот [56].

Использовали также разработанные в ИТЭБ РАН [57] алгоритм преобразования координат атомов в молекулярном комплексе и программу, реализующую этот алгоритм, в котором последовательность преобразований координат в двойной спирали отвечала изменению параметров ω (пропеллер), κ (излом пары), τ (наклон пары), β (крен), D_x (сдвиг), D_y (скольжение), D_z (поднятие), Ω (закручивание) [58].

Вычислительная процедура определения конформационных параметров интеркаляционных комплексов нуклеиновых кислот детально описана ранее [26, 27].

Наиболее вероятная пространственная структура фрагментов 1:2 комплекса DAU с дуплексом дезоксигексануклеотида d(GCATGC), соответствующая интеркаляции антибиотика в d(GpC) сайт гексамера, представлена на рис. 5. Интеркаляцион-

ный комплекс DAU—d(GCATGC)₂ характеризуется следующими параметрами: $D_z = 0,64$ нм, $\Omega = 29,5^\circ$, $\omega = -4,5^\circ$, $D_x = -0,18$ нм, $D_y = -0,05$ нм, $\tau = 0,6^\circ$, $\rho = -6,0^\circ$, $\kappa = 7,0^\circ$. Расчеты показали, что хромофор антибиотика ориентирован под углом $\Psi \approx 120^\circ$ к продольной оси нижней пары оснований интеркаляционного комплекса в двойной спирали гексамерного дуплекса.

Это хорошо согласуется с данными рентгеноструктурного анализа комплексов DAU с олигонуклеотидами [15, 16, 18], а также с результатами проведенных ранее расчетов пространственных структур комплексов дауномицина с двуспиральными самокомплементарными дезоксигексануклеотидами d(CGTAACG), d(CGCGCG) [28] и d(TACGTA)₂ [29] в растворе, в которых лиганд также интеркалирует в концевые участки дуплексов. В свою очередь, наблюдаемые различия в структурных конформационных параметрах интеркаляционных комплексов DAU с дезоксигексануклеотидами, по-видимому, обусловлены особенностями расположения аминсахарного кольца DAU в малой бороздке олигонуклеотидных дуплексов с различной последовательностью оснований в цепи [59]. Следует отметить, что несколько отличающийся угол поворота хромофора антибиотика по отношению к продольной оси пары оснований в 1:2 комплексах DAU с тетрамерами ($\Psi \approx 90^\circ$) [24, 25] по сравнению с интеркаляционными комплексами антибиотика с гексамерами [28, 29] может быть связан с различной стабильностью двухспиральных структур тетрамеров и гексамеров.

Термодинамические параметры комплексообразования DAU с гексамером 5'-d(GCATGC). Расчет термодинамических параметров реакций образования различного типа комплексов дауномицина с гексамером сделан по экспериментальным температурным зависимостям химических сдвигов протонов антибиотика ($\delta_{DAU}(T)$) с учетом аддитивного вклада в наблюдаемый химический сдвиг всех ассоциированных форм в растворе [25, 27]. При этом измеренный химический сдвиг $\delta_{DAU}(T)$ протонов лиганда при заданной температуре T может быть представлен в виде:

$$\delta_{DAU}(T) = \delta_M F_M(T) + \delta_D F_D(T) + \sum_{i=1}^4 \delta_i F_i(T), \quad (6)$$

где $F_M(T)$, $F_D(T)$, $F_1(T) \div F_4(T)$ — равновесные мольные доли антибиотика при температуре T в мономерной и димерной формах, а также в составе различного типа комплексов с гексануклеотидом соответственно. В уравнении (6) предполагается,

что величины δ_M , δ_D и $\delta_1 \div \delta_4$ не зависят от температуры в исследованном температурном диапазоне. Допустимость такого приближения была показана ранее [25, 27]. В уравнении (6) влияние температуры на наблюдаемые значения $\delta_{DAU}(T)$ учитывается через изменения величин $F_M(T)$, $F_D(T)$ и $F_1(T) \div F_4(T)$, которые являются функциями температуры и однозначно связаны с равновесными константами образования комплексов K_i . Определение температурных зависимостей констант равновесия позволяет найти термодинамические параметры комплексообразования — энтальпию ΔH_i^0 и энтропию ΔS_i^0 для различных типов комплексов. Величины ΔH_i^0 и ΔS_i^0 определены с использованием параметрических регрессионных уравнений, описывающих температурные зависимости мольных долей различных комплексов [25, 27]. Средние значения свободной энергии Гиббса, энтальпии и энтропии, найденные для реакций комплексообразования DAU с дезоксигексануклеотидом, представлены в табл. 3.

Термодинамические параметры (табл. 3) свидетельствуют о том, что все реакции комплексообразования DAU с гексамером являются экзотермическими. Соотношения величин ΔG_i^0 , ΔH_i^0 и ΔS_i^0 образования 1:1, 1:2, 2:1 и 2:2 комплексов DAU с дезоксигексануклеотидом d(GCATGC) качественно подобны соответствующим значениям, полученным для исследованных ранее гексамеров d(CGCGCG), d(CGTAACG) [28] и d(TACGTA) [29]. Из табл. 3 видно, что абсолютные величины энтальпии и энтропии образования 1:2 комплекса DAU с 5'-d(GCATGC) больше значений ΔH_i^0 и ΔS_i^0 для исследованных ранее гексамеров [28, 29]. На основании вышеизложенного можно сделать вывод о том, что дисперсионные и гидрофобные взаимодействия играют основную роль при связывании антибиотика с гексамером d(GCATGC) в водном растворе.

Учитывая, что наиболее вероятным участком связывания дауномицина с дуплексом d(GCATGC) является d(GpC) сайт, а у исследованных ранее [28, 29] гексамеров — d(CpG) и d(TpA) сайты, наблюдаемые различия в термодинамических параметрах могут быть связаны как со структурными различиями малых бороздок двухспиральных гексануклеотидов, так и с энергетикой взаимодействия хромофора лиганда с парами оснований в месте интеркаляции (в частности, возможностью образования межмолекулярных Н-связей). Так, аминсахарное кольцо DAU больше соответствует по своим параметрам малой бороздке двойной спирали в

области АТ-пары в дуплексах гексамерных последовательностей d(GCATGC) и d(CGТАСG), чем в дуплексах d(ТАСGТА) и d(CGCGCG) [28, 29]. Теоретический анализ показывает [21], что имеет место стерическое отталкивание между аминсахарным кольцом DAU и аминок группой G4 в положении 2 в малой бороздке дуплексов d(CGCGCG) и d(ТАСGТА). По-видимому, данные обстоятельства являются важным фактором в преимущественном связывании DAU с гексамерами d(GCATGC) и d(CGТАСG) по сравнению с последовательностями d(CGCGCG) и d(ТАСGТА) в водном растворе. Вместе с тем методом рентгеноструктурного анализа недавно обнаружено [60], что моновалентные катионы металлов, расположенные в сайте интеркаляции, могут также играть существенную роль при специфическом для последовательности связывании антрациклиновых антибиотиков с последовательностями ДНК. В заключение можно сделать вывод о том, что DAU проявляет определенную сайт-специфичность к следующим триплетным последовательностям: d(GCA) > d(CGТ) > d(CGС) > d(ТАС). Этот результат согласуется с экспериментальными и теоретическими исследованиями других авторов [20—22].

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

A. N. Veselkov, R. J. Eaton, V. I. Pahomov, O. V. Rogova, V. S. Volynkin, A. V. Semanin, L. N. Djimant, D. B. Davies

Distinctive features of the self-association of deoxyhexanucleotide 5'-d(GpCpApTpGpC) and its complexation with anthracycline antibiotic daunomycin in aqueous solution

Summary

The self-association of self-complementary deoxyhexanucleotide 5'-d(GpCpApTpGpC) and its complexation with antitumor antibiotic daunomycin have been investigated in aqueous solution using 1D- and 2D-¹H NMR correlation spectroscopy (2D-TOCSY and 2D-NOESY). Measurements of the concentration and temperature dependences of chemical shifts of nonexchangeable protons of deoxyhexanucleotide and daunomycin have been used to calculate the equilibrium constants and thermodynamical parameters (ΔH and ΔS) of d(GCATGC) duplex formation and complexation of the hexamer with the antibiotic. Based on the analysis of the proton chemical shifts of the hexamer at small concentrations and at relatively low temperatures, it has been assumed that the hexamer d(GCATGC) forms a compact structure (e.g. similar to a hairpin) in aqueous solution. The spatial structures of the hairpin and the intercalated complex of daunomycin with the duplex of the hexamer d(GCATGC) have been determined by molecular mechanics methods using X-PLOR software. Comparative analysis of the pa-

rameters of complex formation between antibiotic daunomycin and deoxyhexanucleotides of different base sequence has been made.

O. N. Veselkov, P. Дж. Итон, В. I. Пахомов, О. В. Рогова, В. С. Волинкин, О. В. Семанин, Л. Н. Димант, Д. Б. Девис

Особливості процесу самоасоціації дезоксигексануклеотиду 5'-d(GpCpApTpGpC) і його комплексоутворення з антрациклиновим антибіотиком дауноміцином у водному розчині

Резюме

Методами одно- і двовимірної кореляційної ¹H-ЯМР спектроскопії (2D-TOCSY і 2D-NOESY) досліджено самоасоціацію самокомплементарного дезоксигексануклеотиду 5'-d(GpCpApTpGpC) і його комплексоутворення з протипухлинним антибіотиком дауноміцином у водному розчині. Визначено концентраційні і температурні залежності хімічних зсувів необмінних протонів дезоксигексануклеотиду і дауноміцину, за якими розраховано рівноважні константи і термодинамічні параметри (ΔH і ΔS) реакцій утворення дуплексу d(GCATGC) і комплексів гексамеру з антибіотиком. На основі аналізу змін протонних хімічних зсувів гексамеру в області низьких концентрацій і при порівняно невисоких температурах зроблено припущення про формування послідовністю d(GCATGC) компактної структури (наприклад, подібній до шпильки) у водному розчині. Побудовано просторові структури шпильки та інтеркаляційного комплексу дауноміцину з дуплексом гексамеру d(GCATGC) методами молекулярної механіки з використанням програми X-PLOR. Проведено порівняльний аналіз параметрів утворення комплексів антибіотика дауноміцину з дезоксигексануклеотидами різної послідовності основ у ланцюзі.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Arcamone F., Penco S. Anthracyclines and anthracenedione-based anticancer agents / Ed. J. W. Lown.—New York: Elsevier, 1988.—125 p.
2. Martin B., Vaquero A., Priebe W., Portugal J. Bisanthracycline WP631 inhibits basal and Sp1-activated transcription initiation *in vitro* // Nucl. Acids Res.—1999.—27, N 17.—P. 3402—3409.
3. Monneret C. Recent developments in the field of antitumor anthracyclines // Eur. J. Med. Chem.—2001.—36, N 6.—P. 483—493.
4. Kellogg G. E., Scarsdale J. N., Fornari Jr. F. A. Identification and hydrophobic characterization of structural features affecting sequence specificity for doxorubicin intercalation into DNA double stranded polynucleotides // Nucl. Acids Res.—1998.—26, N 20.—P. 4721—4732.
5. Garbesi A., Bonazzi S., Zanella S., Capobianco M. L., Giannini G., Arcamone F. Synthesis and binding properties of conjugates between oligonucleotides and daunorubicin derivatives // Nucl. Acids Res.—1997.—25, N 11.—P. 2121—2128.
6. Arcamone F., Gassinelli G. Biosynthetic anthracyclines // Curr. Med. Chem.—1998.—5, N 5.—P. 391—419.
7. Gewirtz D. A. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin // Biochem. Pharmacol.—1999.—57, N 7.—P. 727—741.
8. Rabhani A., Iskandar M., Ausio J. Daunomycin-induced unfolding and aggregation of chromatin // J. Biol. Chem.—1999.—274, N 26.—P. 18401—18406.
9. Kiyomiya K.-I., Satoh J., Horie H., Kurebe M., Nakagawa H., Matsuo S. Correlation between nuclear action of anthracycline

- anticancer agents and their binding affinity to proteasome // *Int. J. Oncol.*—2002.—21, N 5.—P. 1081—1085.
10. *Froelich-Ammon S. J., Osheroff N.* Topoisomerase poisons: harnessing the dark side of enzyme mechanism // *J. Biol. Chem.*—1995.—270, N 37.—P. 21429—21432.
 11. *Guano F., Pourquier Ph., Tinelli S., Animati F., Manzini S., Zumino F., Kohlhagen G., Pommier Y., Carpanico G.* Topoisomerase poisoning activity of novel disaccharide anthracyclines // *Mol. Pharmacol.*—1999.—56, N 1.—P. 77—84.
 12. *Pigram W. J., Fuller W., Hamilton I. O.* Stereochemistry of intercalation: interaction of daunomycin with DNA // *Nat. New Biol.*—1972.—235, N 53.—P. 17—19.
 13. *Neidle S., Taylor G.* Nucleic acid binding drugs. Part IV. The crystal structure of the anti-cancer agent daunomycin // *Biochim. et Biophys. Acta.*—1977.—479, N 4.—P. 450—459.
 14. *Barthwal R., Mujeeb A., Srivastava N., Sharma U.* A proton nuclear magnetic resonance investigation of the conformation of daunomycin // *Chem.-Biol. Interact.*—1996.—100, N 2.—P. 125—139.
 15. *Wang A. H.-J., Ughetto G., Quigley G. J., Rich A.* The interactions between an anthracycline antibiotic and DNA: molecular structure of daunomycin complexed to d(CpGpTpApCpG) at 1.2 Å resolution // *Biochemistry.*—1987.—26, N 4.—P. 1152—1163.
 16. *Nunn C. M., VanMeervelt L., Zhang S., Moore M. H., Kennard O.* DNA drug interactions — the crystal structures of d(TGTACA) and d(TGATCA) complexed with daunomycin // *J. Mol. Biol.*—1991.—222, N 2.—P. 167—177.
 17. *Qu X., Trent J. O., Fokt I., Priebe W., Chaires J. B.* Allosteric, chiral-selective drug binding to DNA // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—2000.—97, N 22.—P. 12032—12037.
 18. *Moore M. H., Hunter W. N., d'Estaintot B. L., Kennard O.* DNA-drug interactions. The crystal structure of d(CGATCG) complexed with daunomycin // *J. Mol. Biol.*—1989.—206, N 4.—P. 693—705.
 19. *Ren J., Chaires J. B.* Sequence and structural selectivity of nucleic acid binding ligands // *Biochemistry.*—1999.—38, N 49.—P. 16067—16075.
 20. *Chen K.-X., Gresh N., Pullman B.* A theoretical investigation of the sequence selective binding of daunomycin to double-stranded polynucleotides // *J. Biomol. Struct. and Dyn.*—1985.—3, N 3.—P. 445—466.
 21. *Pullman B.* Molecular mechanisms of specificity in DNA-antitumor drug interactions // *Adv. Drug Res.*—1989.—18.—P. 1—113.
 22. *Chaires J., Herrera E., Waring M. J.* Preferential binding of daunomycin to 5'ATCG and 5'ATGC sequences revealed by footprinting titration experiments // *Biochemistry.*—1990.—29, N 26.—P. 6145—6153.
 23. *Neidle S., Sanderson M.* The interaction of daunomycin and adriamycin with nucleic acids // *Mol. Aspects of Anti-Cancer Drug Action / Eds S. Neidle, M. J. Waring.*—London: Macmillan, 1983.—P. 35—57.
 24. *Веселков А. Н., Итон Р. Дж., Барановский С. Ф., Осетров С. Г., Пахомов В. И., Болотин П. А., Дымант Л. Н., Дэвис Д. Б.* Анализ взаимодействия антибиотика дауномицина с дезокситетрануклеотидом 5'-d(TpGpCpA) в водном растворе методом ЯМР-спектроскопии // *Биополимеры и клетка.*—1999.—15, № 2.—С. 154—162.
 25. *Davies D. B., Eaton R. J., Baranovsky S. F., Veselkov A. N.* NMR investigation of the complexation of daunomycin with deoxytetranucleotides of different base sequence in aqueous solution // *J. Biomol. Struct. and Dyn.*—2000.—17, N 5.—P. 887—901.
 26. *Davies D., Karawajew L., Veselkov A. N.* ¹H NMR structural analysis of ethidium bromide complexation with self-complementary deoxytetranucleotides 5'-d(ApCpGpT), 5'-d(ApGpCpT) and 5'-d(TpGpCpA) in aqueous solution // *Biopolymers.*—1996.—38.—P. 745—757.
 27. *Davies D. B., Veselkov A. N.* Structural and thermodynamical analysis of molecular complexation by ¹H NMR spectroscopy: intercalation of ethidium bromide with the isomeric deoxytetranucleotides 5'-d(GpCpGpC) and 5'-d(CpGpCpG) in aqueous solution // *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*—1996.—92, N 19.—P. 3545—3557.
 28. *Веселков А. Н., Итон Р. Дж., Пахомов В. И., Дымант Л. Н., Дэвис Д. Б.* Структурный и термодинамический анализ связывания антибиотика дауномицина с дезоксигексануклеотидами различной последовательности оснований в цепи методом ЯМР-спектроскопии // *Журн. структур. химии.*—2001.—42, № 2.—С. 236—250.
 29. *Веселков А. Н., Итон Р. Дж., Пахомов В. И., Семанин А. В., Барановский С. Ф., Дымант Л. Н., Дэвис Д. Б.* Анализ комплексообразования дауномицина с дезоксигексануклеотидом 5'-d(TpApCpGpTpA) в водном растворе по данным ЯМР-спектроскопии // *Молекуляр. биология.*—2001.—35, № 5.—С. 868—878.
 30. *Веселков А. Н., Дэвис Д., Дымант Л. Н., Паркес Х., Шипп Д.* 1M- и 2M-¹H-ЯМР-исследование самоассоциации дезокситетрарибонуклеозидтрифосфатов различной последовательности оснований в водном растворе // *Биополимеры и клетка.*—1991.—7, № 5.—С. 15—22.
 31. *Веселков А. Н., Осетров С. Г., Пахомов В. И., Веселкова Н. В., Дэвис Д. Б.* Самоассоциация молекул дезоксиолигонуклеотида d(GpApCpApTpGpTpC) в водном растворе: термодинамический анализ образования дуплекса октамера по данным ¹H-ЯМР // *Биополимеры и клетка.*—1998.—14, № 3.—С. 184—190.
 32. *SantaLucia J., Jr.* A unified view of polymer, dumbbell and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1998.—95, N 4.—P. 1460—1465.
 33. *Chou S.-H., Chin K.-H., Wang A. H.-J.* Unusual DNA duplex and hairpin motifs // *Nucl. Acids Res.*—2003.—31, N 10.—P. 2461—2474.
 34. *Lane A. N., Jenkins T. C.* Thermodynamics of nucleic acids and their interactions with ligands // *Quart. Revs Biophys.*—2000.—33, N 3.—P. 255—306.
 35. *Huang Y. M., Phillips D. R.* Thermodynamics of the interaction of daunomycin with DNA // *Biophys. Chem.*—1977.—6.—P. 363—368.
 36. *Chaires J. B., Dattagupta N., Crothers D. M.* Self-association of daunomycin // *Biochemistry.*—1982.—21, N 17.—P. 3927—3932.
 37. *Веселков А. Н., Дымант Л. Н., Болотин П. А., Барановский С. Ф., Паркес Х., Дэвис Д.* Исследование взаимодействия бромистого этидия с дезокситетрарибонуклеозидтрифосфатом 5'-d(GCGC) методом ¹H-ЯМР-спектроскопии // *Молекуляр. биология.*—1995.—29, № 2.—С. 326—338.
 38. *Davies D. B., Pahomov V. I., Veselkov A. N.* NMR determination of the conformational and drug binding properties of the DNA heptamer d(GpCpGpApApGpC) in aqueous solution // *Nucl. Acids Res.*—1997.—25, N 22.—P. 4523—4531.
 39. *Wijmenga S. S., Mooten M. W., Hilbers C. W.* NMR of macromolecules. A practical approach.—London: Oxford Univ. press, 1993.—217 p.
 40. *Nilges M., Clore G. M., Gronenborn A. M.* Refinement of the

- solution structure of the DNA hexamer 5'-d(GCATGC)₂: combined use of nuclear magnetic resonance and restrained molecular dynamics // *Biochemistry*.—1987.—26, N 12.—P. 3718—3733.
41. Searle M. S., Hall J. G., Denny W. A., Wakelin L. P. NMR studies of the interaction of the antibiotic nogalamycin with the hexadeoxyribonucleotide duplex d(5'-GCATGC)₂ // *Biochemistry*.—1988.—27, N 12.—P. 4340—4349.
 42. Thorpe J. H., Teixeira S. C. M., Gale B. C., Cardin C. J. Crystal structure of the complementary quadruplex formed by d(GCATGCT) at atomic resolution // *Nucl. Acids Res.*—2003.—31, N 3.—P. 844—849.
 43. Petersheim M., Turner D. H. Base-stacking and base-pairing contributions to helix stability thermodynamics of double-helix formation with CGCG, CCGGP, CCGGAP, ACCGGP, CCGGUP and ACCGGUP // *Biochemistry*.—1983.—22, N 2.—P. 256—263.
 44. Веселков А. Н., Дымант Л. Н., Козинцев В. В., Лисютин В. А., Паркес Х., Дэвис Д. Исследование самоассоциаций молекул дезокситетрарибонуклеозидтрифосфатов d(TrGr-CpA) в водном растворе методом ¹H ЯМР спектроскопии // *Биофизика*.—1995.—40, № 2.—С. 283—292.
 45. Roy S., Weinstein S., Borah B., Nicol J., Appella E., Sussman J. L., Miller M., Shindo H., Cohen J. S. Mechanism of oligonucleotide loop formation in solution // *Biochemistry*.—1986.—25, N 23.—P. 7417—7423.
 46. Итон Р. Дж., Веселков Д. А., Барановский С. Ф., Осетров С. Г., Дымант Л. Н., Дэвис Д. Б., Веселков А. Н. Исследование самоассоциации молекул антрациклиновых антибиотиков в водном растворе методом ¹H-ЯМР спектроскопии // *Хим. физика*.—2000.—19, № 2.—С. 98—104.
 47. Brunger A. T. X-PLOR, a system for X-ray crystallography and NMR.—Yale: Univ. press, 1992.—382 p.
 48. Parkinson G., Vojtechovsky J., Clowney L., Brunger A. T., Berman H. M. New parameters for the refinement of nucleic acid containing structures // *Acta Cryst.*—1996.—D52, pt 1.—P. 57—64.
 49. Kale L., Skeel R., Bhandarkar M., Brunner R., Gursoy A., Krawetz N., Phillipps J., Shulten K. NAMD 2: greater scalability for parallel molecular dynamics // *J. Comp. Phys.*—1999.—154, N 1.—P. 283—312.
 50. MacKerell Jr., A. D., Banavali N. All-atom empirical force field for nucleic acids: application to molecular dynamics simulations of DNA and RNA in solution // *J. Comp. Chem.*—2000.—21.—P. 105—120.
 51. Jorgensen W., Chandrasekhar J., Madura J., Impey R., Klein M. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water // *J. Chem. Phys.*—1983.—79, N 9.—P. 926—935.
 52. Kleywegt G. J. Dictionaries for heteros // *News from Uppsala Software Factory*.—5.—, 1998.—4 p.
 53. Berman H. M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T. N., Weissig H., Shindyalov I. N., Bourne P. E. The protein data bank // *Nucl. Acids Res.*—2000.—28, N 1.—P. 235—242.
 54. Berendsen H. J. C., Posta J. P. M., van Gunsteren W. F., DiNola S., Haak J. R. Molecular dynamics with coupling to an external bath // *J. Chem. Phys.*—1984.—81, N 8.—P. 3684—3690.
 55. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. VMD — visual molecular dynamics // *J. Mol. Graph.*—1996.—14, N 1.—P. 33—38.
 56. Giessner-Prettre C., Pullman B. Quantum mechanical calculations of NMR chemical shifts in nucleic acids // *Quart. Revs Biophys.*—1987.—20, N 3—4.—P. 113—172.
 57. Poltev V. I., Teplukhin A. V. Conformational implication of some nucleotide sequences // *Int. J. Quant. Chem.*—1989.—35.—P. 91—102.
 58. Dickerson R. E. Definition and nomenclature of nucleic acid structure parameters // *J. Biomol. Struct. and Dyn.*—1989.—6, N 4.—P. 627—634.
 59. Schuerman G. S., Van Meervelt L. Conformational flexibility of the DNA backbone // *J. Amer. Chem. Soc.*—2000.—122, N 2.—P. 232—240.
 60. Howerton S. B., Nagpal A., Williams L. D. Surprising role of electrostatic interactions in DNA-ligand complexes // *Biopolymers*.—2003.—69, N 1.—P. 87—99.

УДК 577.113

Надійшла до редакції 10.11.03