



УДК 577.322:577.112.6.088

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНСТАНТЫ ДИМЕРИЗАЦИИ ДАНСИЛГИДРАЗИДА ТРИВАЛИНА В ВОДНОМ РАСТВОРЕ

© 1999 г. С. А. Стрельцов<sup>#</sup>, Ю. Д. НечипуренкоИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН,  
117984, Москва, ул. Вавилова, 32

Поступила в редакцию 01.12.98 г. Принята к печати 29.03.99 г.

Исследована димеризация тривалина – пептида, моделирующего ДНК-узнающие последовательно-регуляторных белков. Осмометрическое измерение средневзвешенной молекулярной массы флуоресцентного производного тривалина – дансилгидразида (DHTV) при концентрации  $\approx 1$  мМ показало, что ее значение находилось между средневзвешенными молекулярными массами пептида в мономерной и димерной формах. Получены зависимости оптического поглощения, кругового дихроизма и интенсивности флуоресценции водных растворов DHTV от его концентрации, которые дали возможность оценить константу димеризации DHTV –  $900 \pm 500 \text{ M}^{-1}$ . Эта характеристика позволяет определить энергию взаимодействия молекул DHTV с ДНК.

*Ключевые слова:* осмометрия; круговой дихроизм; поглощение; флуоресценция; агрегатные формы биоактивных пептидов; тривалин.

### ВВЕДЕНИЕ

Проблема специфического взаимодействия белков с нуклеиновыми кислотами продолжает быть одной из самых актуальных в современной биологии. В начале 70-х годов были предложены модели ДНК-белкового узнавания, в которых белок специфически связывается с ДНК своим  $\beta$ -структурным фрагментом [1–3] и такие белки позднее были обнаружены [4–9]. Для проверки гипотетических моделей был синтезирован ряд пептидов, способных образовывать в растворе  $\beta$ -ассоциаты [10–14]. В их числе был дансилгидразид тривалина (DHTV) в виде трифторуксунной соли. Ранее мы исследовали его взаимодействие с нуклеиновыми кислотами [10, 11, 15–18]. Было показано, что он образует димеры и что именно димеры DHTV связываются преимущественно с G·C-парами оснований ДНК [11], вызывают компактизацию как двуцепочечных, так и однонитевых нуклеиновых кислот [15, 16] и инициируют конкатемеризацию тринуклеотидов [17] и молекул тРНК [18] (т.е. образование регулярной структуры, в которой олиго- или полинуклеотиды расположены один за другим по типу “голова к хвосту”, но не связаны между собой ковалентно). При наличии в растворе конденсирующих агентов может последовать олигомеризация тринуклеотидов [19]. Эти свойства DHTV делают его полезным модельным соединением при исследовании белок-нуклеинового узнавания, генетичес-

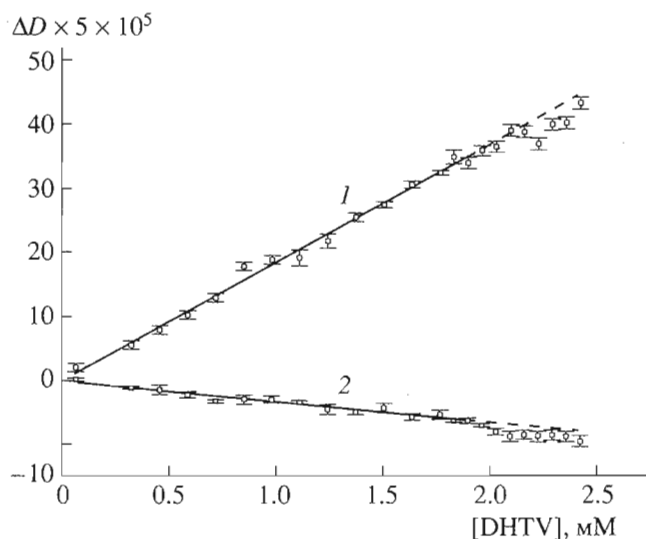
кой рекомбинации и образования полинуклеотидов в процессе предбиологической эволюции.

Для определения энергии взаимодействия димеров DHTV с ДНК необходимо знать константу димеризации пептида в используемых условиях [10, 11, 15–18]. В данной работе мы оценили ее величину.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для того, чтобы выяснить, какие агрегатные формы DHTV присутствуют в растворе при концентрации пептида  $\approx 1$  мМ (28°C, 20% по объему MeOH, 1 мМ какодилатный буфер, pH 7.0) мы получили зависимость давления насыщенного пара над раствором пептида от его концентрации. Этот метод позволяет определить молекулярную массу молекул (средневзвешенную молекулярную массу, если в растворе присутствуют несколько разных типов молекул) [20]. Наши эксперименты дали значение средневзвешенной молекулярной массы для DHTV, равное  $390 \pm 30$  Да, тогда как средневзвешенные молекулярные массы мономеров, димеров, тримеров и тетрамеров составляют 338, 451, 507 и 541 Да, соответственно. Таким образом, можно предположить, что при концентрации DHTV  $\approx 1$  мМ основными фракциями в растворе являются мономеры и димеры пептида. Тогда справедливо уравнение:  $(563x + 113x + 1126(1-x) + 2(1-x)113)/(2x + 3(1-x)) = 390$ , где  $x$  – доля мономеров DHTV в растворе, 563 Да – молекулярная масса катиона мономера DHTV, 1126 Да – молекулярная масса дикатиона димера DHTV, 113 Да –

<sup>#</sup> Автор для переписки (e-mail: strelcov@imb.imb.ac.ru; тел.: (8095) 135-12-55).



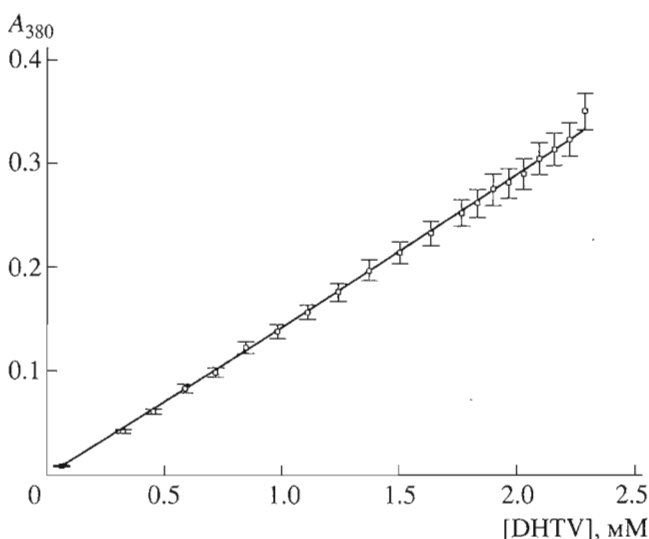
**Рис. 1.** Зависимость значений кругового дихроизма, где  $(\Delta D)$  – разность поглощений право- и левополяризованного по кругу света, измеренных при 275 нм (1) и 320 нм (2), от концентрации DHTV в растворе. Квадрат – экспериментальные значения, сплошная линия – теоретическая кривая, пунктир – продолжение теоретической кривой в область больших значений концентраций DHTV.

молекулярная масса аниона трифторуксусной кислоты. Концентрация мономеров и димеров DHTV в таком растворе составляет 0.64 и 0.18 мМ, соответственно. Тогда, согласно закону действующих масс,  $K_d = 500 \text{ M}^{-1}$ .

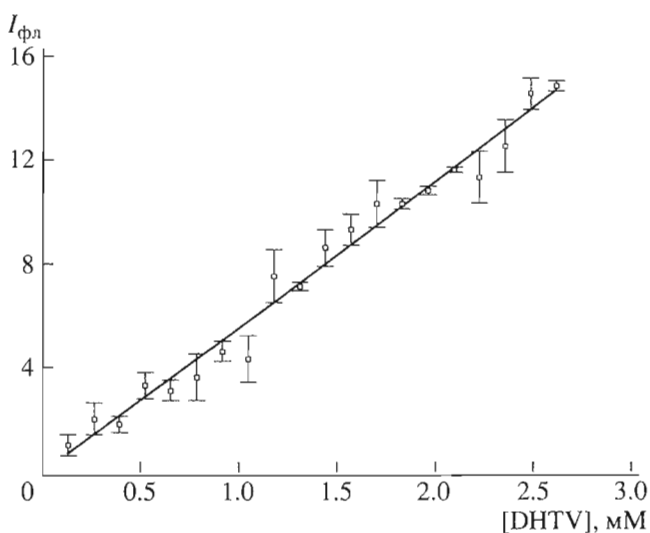
Чтобы точнее определить величину  $K_d$ , мы при характеристических для образования димера длин волн [21] получили зависимости: 1) величина

ны кругового дихроизма (при 350, 320 и 275 нм), 2) величины оптического поглощения (при 380, 360, 320 и 270 нм), 3) интенсивности флуоресценции (при  $\lambda_{\text{ex}}$  400, 425 и 430 нм и  $\lambda_{\text{em}}$  580 нм) от концентрации растворов DHTV. Некоторые из полученных зависимостей представлены на рис. 1–3.

Оптические измерения мы проводили в 1 мМ какодilatном буфере pH 7.0, 25% по объему MeOH, 17°C, поскольку в этих условиях исследовалось взаимодействие DHTV с нуклеиновыми кислотами оптическими методами [10, 11, 15–18]. Разница температур между осмометрическими (см. выше) и оптическими измерениями связана с тем, что осмометрические измерения должны проводиться при температуре выше комнатной. Такова особенность осмометра. Но поскольку  $K_d \approx \exp(-\Delta E/RT)$ , где  $\Delta E$  – энергия образования димера DHTV, то такое изменение температуры (на 11°C) приведет к изменению константы димеризации менее, чем на 25%. Было показано, что кривые связывания димеров DHTV с ДНК, полученные в присутствии 10–25 об. % MeOH, практически совпадают, тогда как кривые связывания DHTV с ДНК для других растворителей (трифторэтанол, гексафторизопропанол, диметилсульфоксид) в зависимости от концентрации сильно смещены друг относительно друга [21, 22]. Это говорит о том, что в применяемом диапазоне концентраций MeOH, концентрация димеров DHTV в растворе, по-видимому, практически не меняется. Следовательно и константа образования димеров DHTV слабо зависит от концентрации MeOH (в указанном диапазоне). Поэтому мы полагаем, что вывод о присутствии в растворе DHTV, в основном, в мономерной и димерной форме, сделанный



**Рис. 2.** Зависимость оптического поглощения от концентрации DHTV в растворе. Обозначения как на рис. 1.



**Рис. 3.** Зависимость интенсивности флуоресценции ( $I_{\text{фл}}$ ), измеренной при  $\lambda_{\text{ex}}$  430 нм,  $\lambda_{\text{em}}$  580 нм, от концентрации DHTV в растворе. Обозначения как на рис. 1.

Значения константы димеризации DHTV, измеренные с помощью разных оптических методов (приводятся данные независимых экспериментов)

Показатель	Длина волны, нм	$K_d$ , $M^{-1}$
Круговой дихроизм	275	1667
	275	1431
	275	1270
	320	529
	320	439
	320	354
Оптическое поглощение	350	436
	270	1006
	320	912
	360	409
	380	1064
	380	874
Интенсивность флуоресценции (регистрация при 580 нм)	380	974
	400	813
	425	547
	430	228
	430	1769

Полученные нами экспериментальные зависимости, соответствующие уравнению (4), были проанализированы с помощью стандартной программы MATLAB. Полученные значения константы димеризации приводятся в таблице. Усреднение по всем экспериментам дало значение  $K_d$ , равное  $900 \pm 500 M^{-1}$ . Мы отмечаем, что наибольший разброс значений  $K_d$  давали данные флуоресцентных измерений. Минимизация отклонения экспериментальных точек от теоретической кривой для всех полученных зависимостей оказалась возможна при концентрации пептида менее 2.5 мМ. При больших концентрациях DHTV экспериментальные точки систематически отклонялись от теоретических кривых 1 и 2, которые в этой области концентраций даны пунктирной линией (см., например, рис. 1). Проанализировав полученные значения константы димеризации, мы обнаружили, что средние значения  $K_d$  оказались равными  $1500 \pm 200$  и  $400 \pm 90 M^{-1}$ , если отдельно усреднять значения констант димеризации, полученные при измерении кругового дихроизма при 275 и 320 нм, соответственно. С одной стороны, эти значения  $K_d$  укладываются в два стандартных отклонения от определенной нами средней величины  $K_d = 900 \pm 500 M^{-1}$ . С другой стороны, между собой они достоверно различаются.

на основании осмометрических измерений, применим и к условиям оптических методов анализа.

Когда в растворе присутствуют в основном мономеры и димеры DHTV и их оптические характеристики различаются, то из экспериментальных данных можно определить константу димеризации пептида. При этом справедливы следующие уравнения (закон действующих масс (1), уравнение материального баланса (2), зависимость оптического поглощения от концентрации фракций пептида (3), соответственно):

$$K_d = C_d / (C_m)^2, \quad (1)$$

$$2C_d + C_m - C_\Sigma = 2K_d(C_m)^2 + C_m - C_\Sigma = 0, \quad (2)$$

$$A = 2\epsilon_d C_d + \epsilon_m C_m = \epsilon_d(C_\Sigma - C_m) + \epsilon_m C_m, \quad (3)$$

где  $C_m$ ,  $C_d$  и  $C_\Sigma$  – концентрации мономеров, димеров и суммарная концентрация пептида в растворе, соответственно;  $A$  – величина оптического поглощения раствора;  $\epsilon_m$  – величина молярного коэффициента поглощения мономера, а  $\epsilon_d$  равна половине величины молярного коэффициента поглощения димера DHTV. Аналогичные уравнения могут быть написаны и для зависимостей величин кругового дихроизма и интенсивности флуоресценции от концентрации пептида в растворе.

Из уравнений (1)–(3) можно получить:

$$A = (\epsilon_m / 4K_d) \left( (-1 + (1 + 8K_d C_\Sigma)^{1/2}) + (\epsilon_d / \epsilon_m) (4C_\Sigma K_d + 1 - (1 + 8K_d C_\Sigma)^{1/2}) \right), \quad (4)$$

Анализ экспериментальных зависимостей был проведен выше в предположении существования в растворе одного типа димеров пептида. Но молекулы DHTV, как и другие короткие пептиды [23, 24], могут образовать в растворе несколько типов димеров, как с параллельной, так и с антипараллельной ориентацией пептидных нитей, а также с разным числом межмолекулярных водородных связей. На рис. 4 схематически представлены две из возможных структур димеров DHTV с антипараллельной ориентацией мономеров. В случае первой из них (а) мы считаем возможным участие в образовании межмолекулярной водородной связи концевой  $\alpha$ -аминогруппы пептида, протонированной в данных условиях. Отметим, что протонированная концевая группа антибиотика дистамицина А может образовать водородную связь с основанием (по данным рентгеноструктурного анализа) [25]. Для структуры (б) возможно образование только двух водородных связей.

Предположим, что в растворе имеется  $n$  типов  $\beta$ -димеров пептида с константами димеризации –  $K_{d1}$ ,  $K_{d2}$ , ...,  $K_{dn}$ , соответственно. Согласно закону действующих масс имеем для концентраций разных димерных форм –  $C_{d1}$ ,  $C_{d2}$ , ...,  $C_{dn}$  – следующие уравнения:

$$C_{d1} = K_{d1} C_m^2, \quad C_{d2} = K_{d2} C_m^2, \quad \dots, \quad C_{dn} = K_{dn} C_m^2; \quad (5)$$

для уравнения материального баланса:

$$2(K_{d1} + K_{d2} + \dots + K_{dn}) C_m^2 + C_m - C_\Sigma = 0; \quad (6)$$

для оптического поглощения:

$$A = 2(\epsilon_{d1}C_{d1} + \epsilon_{d2}C_{d2} + \dots + \epsilon_{dn}C_{dn}) + \epsilon_m C_m, \quad (7)$$

где  $\epsilon_{dn}$  – половина молярного коэффициента поглощения  $n$ -ой формы димера DHTV. Далее, комбинируя уравнения (5), (6) и (7), легко показать, что:

$$A = ((K_{d1}\epsilon_{d1} + \dots + K_{dn}\epsilon_{dn})/(K_{d1} + \dots + K_{dn})) \times (C_\Sigma - C_m) + \epsilon_m C_m. \quad (8)$$

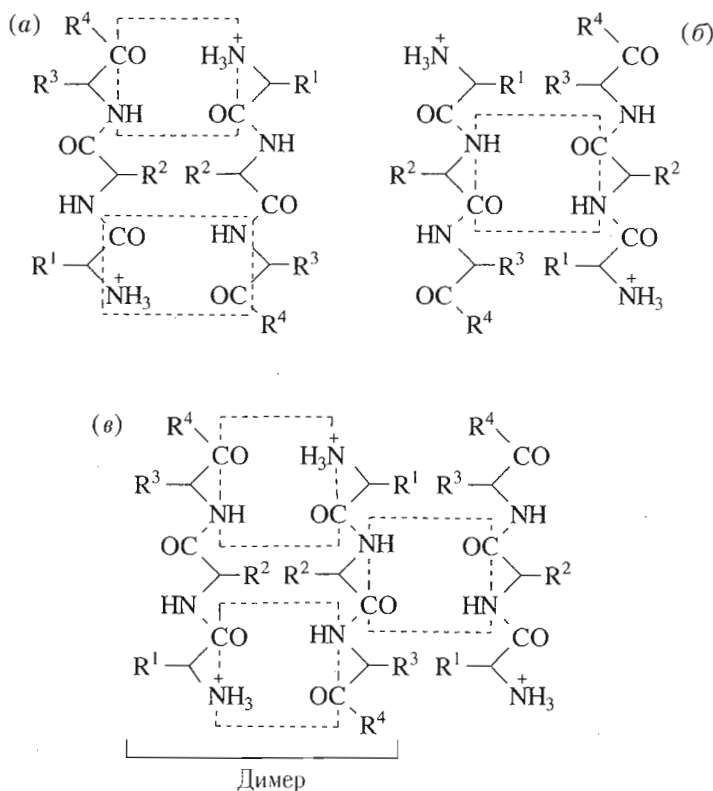
Сравнивая уравнения (6) и (8) с уравнениями (2) и (3), мы приходим к заключению, что при образовании  $n$  типов димеров величина  $K_d$  заменяется суммой констант димеризации –  $(K_{d1} + K_{d2} + \dots + K_{dn})$ , а  $\epsilon_d$  – половиной средневзвешенного молярного коэффициента поглощения –  $(K_{d1}\epsilon_{d1} + K_{d2}\epsilon_{d2} + \dots + K_{dn}\epsilon_{dn})/(K_{d1} + K_{d2} + \dots + K_{dn})$ . Если константа образования одного из димеров много больше, чем других, то в результате эксперимента будет оценена именно она.

Таким образом, присутствие в растворе нескольких типов димеров пептида не препятствует анализу экспериментальных зависимостей в предположении, что в растворе присутствуют только

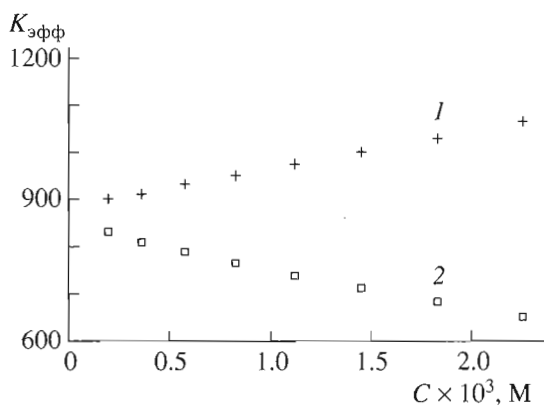
мономер и димеры DHTV (мономер-димерное приближение). Наличие разных типов димеров также не объясняет, почему экспериментальные зависимости не могут быть минимизированы в мономер-димерном приближении при  $C_\Sigma \geq 2.5$  мМ.

Однако процесс агрегации DHTV может не ограничиваться образованием димеров, а продолжаться далее до образования тримеров DHTV (см., например, рис. 4в). Заметим, что для других пептидов сосуществование в растворе мономерной, димерной, тримерной и тетрамерной фракций доказано экспериментально [23].

Ниже мы покажем, что присутствие небольших количеств тримеров DHTV в растворе может объяснить разброс величины  $K_d$ , определяемой при измерении КД при 275 и 320 нм. Для этого мы теоретически рассчитали зависимость оптического поглощения от концентрации пептида, которая наблюдалась бы, если бы в растворе находились мономер, димеры и тримеры DHTV. Мы принимали значение константы образования димеров равным  $900 \text{ M}^{-1}$  (значение получено нами выше), а константы образования тримеров (из мономера и димера) –  $60 \text{ M}^{-1}$  (поскольку наиболее стабильный димер стабилизируется четырьмя водородными связями, а при присоединении к нему



**Рис. 4.** Возможные структуры агрегатов DHTV: (а) и (б) – димеры с разным числом межмолекулярных водородных связей; (в) – тример. R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> – CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, R<sup>4</sup> – остаток дансилгидразина. Пунктирными прямоугольниками показаны области образования пар межмолекулярных водородных связей с участием С=О- и NH-групп DHTV. Подчеркнута структура наиболее стабильного димера в составе тримера DHTV.



**Рис. 5.** Модельная зависимость эффективной константы димеризации ( $K_{эфф}$ ) от концентрации DHTV в растворе. Зависимость 1 соответствует случаю, когда величина  $\epsilon_t$  тримера DHTV равна  $1500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (меньше, чем у димера), а зависимость 2 – случаю, когда  $\epsilon_t = 3000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (больше, чем у димера).

следующего мономера могут образоваться только две водородные связи, см. рис. 4). Тогда, при анализируемых нами концентрациях DHTV, концентрация тримеров будут много меньше концентраций димеров и мономеров. Поскольку константы образования агрегатных форм пептида не зависят от величины молярного коэффициента поглощения, мы использовали следующие произвольные значения:  $\epsilon_m = 1000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ;  $\epsilon_d = 2000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (результаты минимизации показали, что  $\epsilon_d$  никогда не отличалась от  $\epsilon_m$  более чем в два раза). Были рассчитаны две зависимости. Случаю 1 соответствует зависимость, когда  $\epsilon_t = 1500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (меньше, чем у димера), а случаю 2 соответствует зависимость, когда  $\epsilon_t = 3000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (больше, чем у димера).  $\epsilon_d$  и  $\epsilon_t$  брались равными одной второй и одной трети молярного коэффициента поглощения димера и тримера DHTV, соответственно (димер DHTV содержит два, а тример – три дансильных радикала). Потом мы проанализировали эти зависимости с помощью программы MATLAB в мономер-димерном приближении и получили значения эффективных констант димеризации DHTV ( $K_{эфф}$ ) (рис. 5). Обе зависимости по мере уменьшения суммарной концентрации пептида сходятся к величине  $K_d = 900 \text{ M}^{-1}$ . Это подтверждает правомерность нашего предположения о применимости, до некоторой концентрации DHTV (2.5 мМ), мономер-димерного приближения при определении константы димеризации тривалина. Зависимость 1 приближается к  $K_d$  “сверху”, зависимость 2 – “снизу” (рис. 5) (со стороны больших или меньших значений, соответственно).

Таким образом, присутствие некоторого количества тримеров DHTV в растворе позволяет объяснить разброс в значении константы диме-

ризации, измеренной при разных длинах волн (таблица). Тот факт, что при концентрации  $\text{DHTV} \geq 2.5 \text{ мМ}$  нельзя описать экспериментальные кривые в мономер-димерном приближении (см. выше) также связано, по-видимому, с присутствием в растворе более высоких агрегатных форм DHTV. Близость значений  $K_d$ , полученных с помощью осмометрических и оптических измерений ( $500$  и  $900 \text{ M}^{-1}$ ), подтверждает правомерность нашего предположения о том, что небольшие изменения в условиях эксперимента в данном случае слабо сказываются на величине константы димеризации

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

DHTV был синтезирован как описано в работе [15]. Использовали какодилат натрия (Sigma, США), свежеперегнанный MeOH, сахарозу – квалификации “х. ч.”. Раствор DHTV требуемой концентрации готовился независимо для каждого измерения, путем добавления в MeOH сначала аликвот 10 мМ раствора пептида в MeOH, а после перемешивания – 1 мМ какодилатного буфера, pH 7.0, так чтобы концентрация MeOH всегда составляла 25% по объему (для осмометрии 20%). Приготовленные растворы DHTV выдерживали 2–3 сут при  $17^\circ\text{C}$  и затем проводили спектральные измерения.

**Осмометрия** проводилась на приборе Vapor Pressure Osmometer 302 B (Hewlett-Parkard, США) при  $28^\circ\text{C}$ . Для приготовления растворов DHTV, а также в качестве контроля [21] использовался 1 мМ какодилатный буфер, pH 7.0, содержащий 20% по объему MeOH [21]. Выбор температуры –  $28^\circ\text{C}$  связан с тем, что осмометр должен быть термостатирован при температуре выше комнатной.

Мы использовали серию из четырех растворов DHTV разной концентрации – от 0.7 до 2 мМ. Измеряли разность напряжений  $V_i$  между термисторами с нанесенными на них аликвотами раствора пептида и контрольным буфером. Разность напряжений отражала разность температур. Температура же термистора связана с давлением насыщенного пара над аликвотой исследуемого раствора, т.е. с мольной долей растворителя в исследуемом растворе. Далее строили зависимость величины  $(V_i/C_i)$  от концентрации растворенного вещества  $C_i$ . Экстраполировали ее к  $C$ , равной 0, и находили  $(V/C)_0$ . То же делали для растворов NaCl и сахарозы, которую использовали в качестве стандарта. Ее молекулярная масса равна 342.3 Да и близка к молекулярной массе мономера DHTV. Как следует из теории метода [20], отношение средневзвешенных молекулярных масс DHTV и NaCl к молекулярной массе сахарозы, обратно пропорционально отношению их  $(V/C)_0$ . NaCl и трифторацетат DHTV в водных растворах диссоциируют практически на 100%. Измеренная

молекулярная масса молекулы есть среднее от масс составляющих ее ионов. Значение этой величины для NaCl, определенное из эксперимента, оказалось  $31 \pm 3$  Да, что в пределах ошибки совпадает с вычисленной величиной 29.2 Да.

**Спектральные измерения.** Оптическое поглощение растворов DHTV и его концентрация определялись на спектрофотометре Cary-118C (Varian, США). Использовали значение молярного коэффициента поглощения DHTV в MeOH  $\epsilon_{330} = 3800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [10]. Круговой дихроизм измеряли на дихрографе Jobin-Yvon Mark III (Roussel-Jouan, Франция). Использовалась кварцевая кювета с длиной оптического пути 0.102 см. При всех этих измерениях оптическое поглощение растворов DHTV не превышало 1 ОЕ. Интенсивность флуоресценции измерялась на спектрофлуориметре MPF-2A (Hitachi, Япония). Была применена приставка для регистрации флуоресценции с поверхности кюветы. Мы использовали (см. выше):  $\lambda_{\text{ex}}$  400, 425 и 430 нм,  $\lambda_{\text{em}}$  580 нм [21], ширина щели на возбуждении – 10 нм, на регистрации – 30 нм. Оптическое поглощение раствора DHTV при длине волны возбуждения флуоресценции не превышала 0.03 ОЕ. Проводилась коррекция изменения усиления в процессе эксперимента по флуоресцентному стандарту.

**Математическая обработка.** Выше было показано (уравнение (4)), что в мономер-димерном приближении для любой концентрации пептида  $C$ , его оптическое поглощение  $A$  вычисляется с помощью следующего соотношения:

$$A = (\epsilon_m/4K_d)((-1 + (1 + 8K_dC)^{1/2}) + (\epsilon_d/\epsilon_m)(4CK_d + 1 - (1 + 8K_dC)^{1/2})),$$

где  $K_d$  – константа димеризации пептида,  $\epsilon_m$  – величина молярного коэффициента поглощения мономера, а  $\epsilon_d$  – половина величины молярного коэффициента поглощения димера пептида. В этом уравнении нам неизвестны  $\epsilon_m$ ,  $\epsilon_d$  и  $K_d$ . Они вычислялись с помощью программы MATLAB. Отдельно варьировалась величина  $\Delta A_0$ , соответствующая ошибке в измерении  $A_0$  – оптического поглощения раствора в отсутствие пептида (которая вычиталась из всех  $A$ ). Вычисления проводили для разных пар стартовых значений: ( $K_d$ ;  $(\epsilon_d/\epsilon_m)$ ).

### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы признательны проф., док. физ.-мат. наук Ю.А. Шаронову и док. физ.-мат. наук Ю.П. Лысову за предоставление программ по математической обработке результатов измерений, В.В. Петухову за большую техническую помощь (ИМБ РАН).

Работа была выполнена при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследова-

ний (№ 97-04-49047) и гранта “Ведущие научные школы” Российского фонда фундаментальных исследований (№ 96-15-98093).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Carter Ch.W., Kraut J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1974. V. 71. P. 75–90.
2. Kim S.-H., Sussman J.L., Church G.M. // Structure and Conformation of Nucleic Acids and Protein-Nucleic Acids Interactions / Eds Sundaralingam M., Rao T.S. Baltimore: University Park Press, 1975. P. 571–575.
3. Гурский Г.В., Туманян В.Г., Заседателев А.С., Жузе А.Л., Гроховский С.Л., Гомтих Б.П. // Молекуляр. биология. 1975. Т. 5. С. 635–651.
4. Allain F.H.-T., Howe P.W., Neuhaus D., Varani G. // EMBO J. 1997. V. 16. P. 5764–5774.
5. Valegard K., Murray J.B., Stonehouse N.J., van der Worm S., Stockley P.G., Lillias L. // J. Mol. Biol. 1997. V. 270. P. 724–738.
6. Raumann B.E., Rould M.A., Pabo C.O., Sauer R.T. // Nature. 1994. V. 367. P. 754–757.
7. Kim X., Geiger J.H., Hahn S., Singler P.B. // Nature. 1993. V. 365. P. 512–520.
8. Clark K.L., Halay E.D., Lai E., Burley S.K. // Nature. 1993. V. 364. P. 412–420.
9. White S.W., Appelt K., Wilson K.S., Tanaka L. // Proteins. 1989. V. 5. P. 281–288.
10. Стрельцов С.А., Хорлин А.А., Суrowая А.Н., Гурский Г.В., Заседателев А.С., Жузе А.Л., Гомтих Б.П. // Биофизика. 1980. Т. 25. С. 929–940.
11. Gursky G.V., Zasedatelev A.S., Zhuze A.L., Khorlin A.A., Grokhovsky S.L., Streltsov S.A., Nikitin S.M., Mikhailov M.V., Surovaya A.N., Rechinsky V.O., Beablashvilly R.Sh., Krylov A.S., Gottikh B.P. // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1983. V. 47. P. 361–372.
12. Сидорова Н.Ю., Семенов Т.Е., Суrowая А.Н., Венгеров Ю.Ю., Стрельцов С.А., Хорлин А.А., Гомтих Б.П., Жузе А.Л., Гурский Г.В. // Молекуляр. биология. 1987. Т. 21. С. 1534–1550.
13. Grokhovsky S.L., Surovaya A.N., Brussov R.V., Chernov B.K., Sidorova N.Yu., Gursky G.V. // J. Biomol. Struct. Dynam. 1991. V. 8. P. 989–1025.
14. Суrowая А.Н., Гурский Г.В., Николаев В.А., Талалаев А.А., Гроховский С.Л., Жузе А.Л. // Молекуляр. биология. 1996. Т. 30. С. 1357–1369.
15. Макаров В.Л., Стрельцов С.А., Венгеров Ю.Ю., Хорлин А.А., Гурский Г.В. // Молекуляр. биология. 1983. Т. 17. С. 1089–1101.
16. Streltsov S.A., Semenov T.E., Moroz O.V. // J. Biomol. Struct. Dynam. 1993. V. 10. P. 763–784.
17. Streltsov S.A., Martinkina L.P., Khorlin A.A., Florentiev V.L., Vengerov Yu.Yu., Zhenodarova S.M., Sedelnikova E.A., Smolyaninova O.A. // J. Biomol. Struct. Dynam. 1994. V. 11. P. 1403–1415.
18. Streltsov S.A., Martinkina L.P., Vengerov Yu.Yu. // FEBS Lett. 1999. V. 444. P. 231–234.
19. Streltsov S.A., Khorlin A.A., Victorova L.S., Kochetkova S.V., Tsilevich T.L., Florentiev V.L. // FEBS Lett. 1992. V. 298. P. 57–60.

20. Seto C.T., Whitesides G.M. // J. Am. Chem. Soc. 1993. V. 115. P. 905–916.
21. Стрельцов С.А. О связывании коротких пептидов с нуклеиновыми кислотами. Дис. ... канд. физ.-мат. наук. М.: МГУ им. М.В. Ломоносова, 1988. С. 293.
22. Streltsov S.A., Gursky G.V. // J. Biomol. Struct. Dynam. 1995. V. 12. P. 231.
23. Baron M.N., DeLoze C., Toniolo C., Fasman C.D. // Biopolymers. 1978. V. 17. P. 2225–2239.
24. Narayanan U., Keiderling T.A., Bonora G.M., Toniolo C. // J. Am. Chem. Soc. 1986. V. 108. P. 2431–2437.
25. Kopka M.L., Yoon C., Goodsell D., Pjura P., Dickerson R.E. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. P. 1376–1380.

## Determination of the Dimerization Constant of Trivaline Dansylhydrazide in Aqueous Solution

S. A. Streltsov<sup>#</sup> and Yu. D. Nechipurenko

Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, Moscow, 117984 Russia

Dimerization of trivaline, a peptide modeling the DNA-recognizing sequences of regulatory proteins, was studied. The measurement of the weighted mean molecular mass of a fluorescent derivative of trivaline, dansylhydrazide (DHTV), by osmometry at about 1 mM concentration showed its value to be between weighted mean molecular masses of the peptide in the monomeric and dimeric forms. From optical absorption, circular dichroism, and fluorescence intensities of the DHTV aqueous solutions versus its concentration, the DHTV dimerization constant was evaluated as  $900 \pm 500 \text{ M}^{-1}$ . This parameter allows the energy of the DHTV interaction with DNA to be determined.

*Key words:* osmometry, circular dichroism, optical absorption, fluorescence, bioactive peptide aggregates, trivaline

---

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 135-1255; e-mail: strelcov@imb.imb.ac.ru.