



УДК 547.963.32

КОМПЛЕМЕНТАЦИОННЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ
ТРИДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ
С ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДНЫМИ МАТРИЦАМИ
РАЗНОЙ ДЛИНЫ

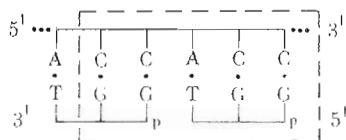
*Долгинная Н. Г., Громова Е. С., Михайлов С. Н.,
Шабарова З. А.*

*Химический факультет и Лаборатория им. А. Н. Белозерского
Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова;
Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва*

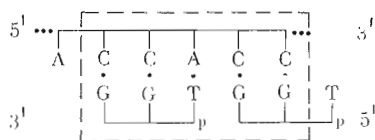
Методами КД и УФ-спектроскопии изучено комплексообразование комплементарных олигодезоксирибонуклеотидов различной длины: $d(pA-C-C)_{2-4} \cdot d(pG-G-T)$, $d(pA-C-C)_{2-4} \cdot d(pT-G-G) \cdot d(pC-C-A)_{1,2} \cdot d(pG-G-T)$, $d(pC-C-A)_{1,2} \cdot d(pT-G-G)$, $d(pT-G-G)_2 \cdot d(pC-C-A)^*$. Показано, что при образовании комплекса осуществляется полное заполнение матричного олигомера тридезоксирибонуклеотидами. Впервые обнаружена зависимость КД нуклеотидных дуплексов от последовательности оснований в компонентах при идентичности структуры «внутри» спирали. Длина матрицы, а также наличие «отвисяющих концов» не сказывается на спектральных свойствах олигомерных дуплексов. Термическая устойчивость и величина гипохромии комплексов возрастают с ростом длины матричного олигомера, но не зависят от нуклеотидной последовательности в одном или обоих компонентах комплексообразования. Установлена линейная зависимость $1/T_{пл}$ от величины, обратной длине матрицы. Полученные с помощью модели двух состояний термодинамические параметры комплексообразования, ΔH° и ΔS° , пропорциональны количеству комплементарных пар в комплексах.

В последние годы получено большое количество экспериментальных данных по термодинамике и кинетике комплементационных взаимодействий синтетических олигорибонуклеотидов. Менее изучены комплексы олигодезоксирибонуклеотидов, причем исследования практически ограничиваются самокомплементарными дуплексами с повторяющейся динуклеотидной последовательностью $d(A-T)_n$ [1] и $d(G-C)_n$ [2]. Сравнительно недавно появились работы по исследованию конформационных особенностей комплексов гетерогенных олигодезоксирибонуклеотидов методом ЯМР-спектроскопии высокого разрешения [3—5]. В этих работах изучены комплексы, образованные олигомерами с одинаковым числом мономерных звеньев. Нами на примере системы три(гекса)нуклеотид — комплементарный додекануклеотид была показана возможность образования олигомерных дуплексов с разрывами в одной из цепей [6]. В настоящей работе предпринято детальное исследование методами КД и УФ-спектроскопии комплексообразования гетерогенных олигодезоксирибо-

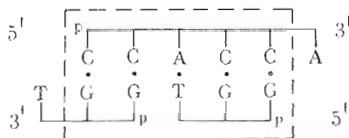
* Формулами $d(pA-C-C)_n$ и $d(pT-G-G)_2$ обозначены 5'-О-метилловые эфиры соответствующих олигодезоксирибонуклеотидов.



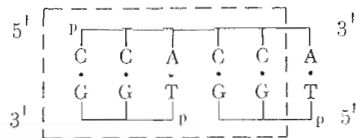
Семейство „а“
 $d(pA-C-C)_n \cdot d(pG-G-T)$
 $n = 2-4$



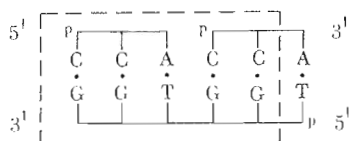
Семейство „б“
 $d(pA-C-C)_n \cdot d(pT-G-G)$
 $n = 2-4$



Семейство „в“
 $d(pC-C-A)_2 \cdot d(pG-G-T)$



Семейство „г“
 $d(pC-C-A)_2 \cdot d(pT-G-G)$



Семейство „д“
 $d(pT-G-G)_2 \cdot d(pC-C-A)$

нуклеотидов различной длины, содержащих повторяющиеся тринуклеотидные последовательности.

В приведенных системах варьировали длину матричного олигомера, а также нуклеотидный состав и последовательность оснований в матрице и комплементарном тринуклеотиде. Для сравнения был изучен комплекс, состоящий из олигомеров одинаковой длины — $d(pT-G-G)_2 \cdot d(pA-C-C)_2$. Во всех дуплексах общий нуклеотидный состав оставался одинаковым (66% G-C-пар). Выбор систем позволил рассмотреть комплексообразование при полном заполнении матрицы короткими олигомерами (семейства «а», «г» и «д» на схеме) и при смещении олигомерных молекул друг относительно друга на одно мононуклеотидное звено (семейства «б» и «в» на схеме).

Кроме самостоятельного теоретического интереса изучение комплементарных комплексов с разрывами в одной из цепей представляется перспективным для проведения различных реакций, в основе которых лежат комплементационные взаимодействия, например сшивание ориентированных на матрице и активированных олигонуклеотидов или ковалентное закрепление олигомера на матрице. Введение заместителя (например, остатка аминокислоты или пептида) по 5'-концевой фосфатной группе более короткого компонента комплекса дает возможность исследовать взаимодействие заместителя с нуклеотидными дуплексами.

Поскольку олигомер-олигомерные комплексы малоустойчивы, для исследования систем, указанных на схеме, были выбраны условия, в максимальной степени способствующие комплексообразованию: высокая нуклеотидная концентрация (10^{-2} М в расчете на мононуклеотидное звено) и нейтральный фосфатный буфер умеренной ионной силы с высоким содержанием ионов Mg^{+2} (0,075 М). В этих условиях удалось исследовать комплексообразование в области температур начиная с -8° .

Доказательством образования комплементарных двухцепочечных комплексов в системах, приведенных в табл. 1, является неаддитивность спектров КД смесей, выдержанных в условиях комплексообразования,

Некоторые характеристики комплексов олигодезоксирибонуклеотидов
 0,004 М фосфатный буфер, pH 7,3; 0,2 М NaCl, 0,075 М MgCl₂;
 нуклеотидная концентрация на мономерное звено 0,8·10⁻² М;
 соотношения компонентов в расчете на мономерное звено — 1:1 в системах (I),
 (IV)–(XII), 1:2 в системе (II), 2:1 в системе (III)

Номер системы	Состав комплекса	T _{пл.} , °C (±1°)		Гипохромия комплексообразования, h, % (±1%)*	
		КД	УФ	h ^a	h ^b
(I)	d(pA-C-C) ₂ ·d(pG-G-T)	11	9	11,5	16
(II)	d(pA-C-C) ₂ ·d(pG-G-T)	13	13	9	—
(III)	d(pA-C-C) ₂ ·d(pG-G-T)	7	8	8,5	—
(IV)	d(pA-C-C) ₃ ·d(pG-G-T)	18	18	13,5	18
(V)	d(pA-C-C) ₄ ·d(pG-G-T)	22	23	16	21
(VI)	d(pA-C-C) ₂ ·d(pT-G-G)	9	9	10,5	—
(VII)	d(pA-C-C) ₃ ·d(pT-G-G)	18	18	13	—
(VIII)	d(pA-C-C) ₄ ·d(pT-G-G)	21	22	16	—
(IX)	d(pC-C-A) ₂ ·d(pG-G-T)	9	9	14,5	—
(X)	d(pC-C-A) ₂ ·d(pT-G-G)	8	9	16	—
(XI)	d(pT-G-G) ₂ ·d(pC-C-A)	3	2	10,5	—
(XII)	d(pA-C-C) ₂ ·d(pT-G-G) ₂	13	15	11	—

* $h = \frac{D_t - D_s}{D_t} \cdot 100\%$, где D_s — оптическая плотность комплекса при —5° (λ 260 нм),

D_t — оптическая плотность смеси компонентов при t 45° (h^a) и 90° (h^b) (λ 260 нм).

и суммарных спектров компонентов, а также кооперативный характер кривых плавления — зависимостей циркулярно-дихроичного поглощения (Δε) и оптической плотности (D) комплексов от температуры. В качестве примера на рис. 1 представлены кривые КД систем (IV), (VIII), (IX)–(XI) (табл. 1). Спектры комплексов (рис. 1, кривые 1) существенно отличаются от кривых 3 (рис. 1), полученных суммированием спектров КД компонентов, снятых в тех же условиях (рис. 2). При температурах, превышающих температурный интервал кооперативного плавления, спектры КД смесей (кривые 2, рис. 1) совпадают с суммарными спектрами компонентов (кривые 4, рис. 1). На вставках к рис. 1 приведены зависимости Δε от температуры при длинах волн, отвечающих максимальному изменению спектров КД. Эти кривые плавления, как и зависимости D от температуры, носят кооперативный характер в отличие от аналогичных зависимостей компонентов (исключение составляет гексануклеотид d(pT-G-G)₂, см. ниже).

Анализ спектров КД олигомеров — компонентов комплексообразования — позволяет выявить следующие закономерности. Спектры КД соединений с одинаковой нуклеотидной последовательностью, но с разной длиной цепи близки по форме, но несколько варьируют по амплитуде (рис. 2а и б), причем для олигомеров с n ≥ 3 различия в спектрах сглаживаются (рис. 2а). Спектры КД олигомеров с разной нуклеотидной последовательностью значительно различаются (ср. КД олигомеров равной длины на рис. 2а и б, в и г). Различия в оптической активности изомеров такого типа неоднократно отмечались в литературе [7, 8]. При повышении температуры амплитуда сложного Коттон-эффекта на спектрах КД олигомеров изменяется при сохранении подобия профиля кривых и положении точек нулевого перехода (рис. 2а — в). Резкие различия в форме спектров КД при низкой и высокой температурах наблюдаются лишь для d(pT-G-G)₂. Это свидетельствует о самоагрегации гексануклеотида при охлаждении. Агрегация d(pT-G-G)₂, очевидно, является причиной того, что при низких температурах кривые КД d(pT-G-G) и d(pT-G-G)₂ существенно

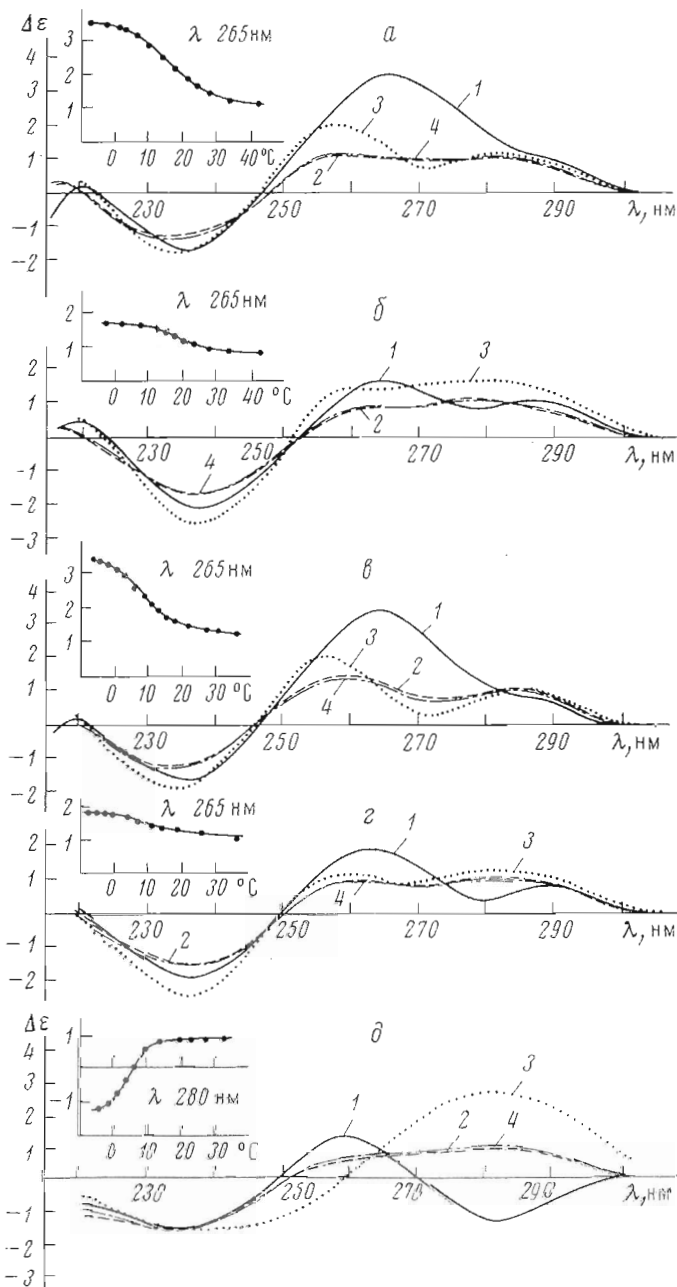


Рис. 1. Спектры КД комплексов *a* — $d(pA-C-C)_3 \cdot d(pG-G-T)$, *б* — $d(pA-C-C)_4 \cdot d(pT-G-G)$, *в* — $d(pC-C-A)_2 \cdot d(pG-G-T)$, *г* — $d(pC-C-A)_2 \cdot d(pT-G-G)$ при температуре от -4 до -7° (1) и $33-43^\circ$ (2); расчетные спектры КД суммы компонентов комплексов при температуре от -4 до -7° (3) и $33-43^\circ$ (4). На вставках: зависимости $\Delta\epsilon$ комплексов от температуры при λ 265 (*a-e*) и 280 нм (*г*). Условия: 0,004 М фосфатный буфер (pH 7,3), 0,2 М NaCl, 0,075 М $MgCl_2$, общая нуклеотидная концентрация, C (на мононуклеотидное звено) — $0,8 \cdot 10^{-2}$ М

различаются и по форме и по амплитуде (рис. 2*а*). Нагревание вызывает разрушение агрегата (вставка к рис. 2*а*), причем температура плавления его лежит в области отрицательных температур. Известно, что самоагрегация компонентов может конкурировать с процессом комплексообразования [9]. Однако в случае систем, в состав которых входит $d(pT-G-G)_2$

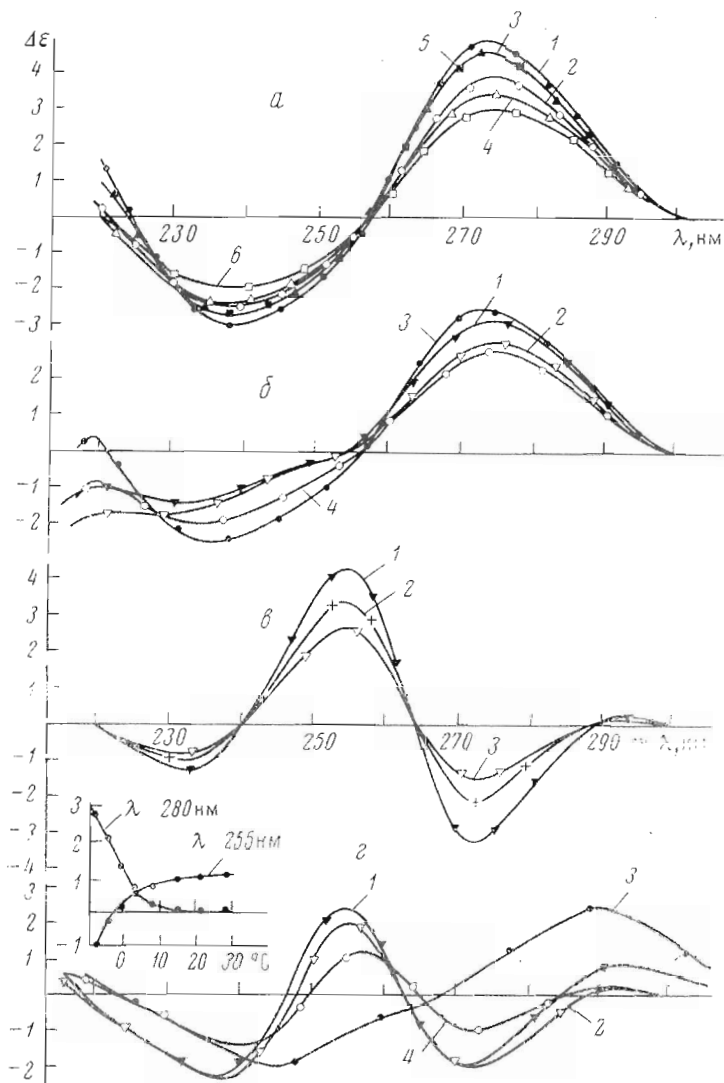
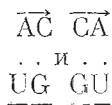


Рис. 2. Спектры КД олигодезоксирибонуклеотидов *a*: $d(pA-C-C)_2$ при -7° (1) и 32° (2), $d(pA-C-C)_3$ при -6° (3) и 37° (4), $d(pA-C-C)_4$ при -6° (5) и 45° (6); *б*: $d(pC-C-A)$ при -7° (1) и 21° (2), $d(pC-C-A)_2$ при -6° (3) и 37° (4); *в*: $d(pG-G-T)$ при -6° (1), 21° (2) и 40° (3); *г*: $d(pT-G-G)$ при -6° (1) и 22° (2), $d(pT-G-G)_2$ при -6° (3) и 30° (4). На вставке: зависимость $\Delta\epsilon$ $d(pT-G-G)_2$ от температуры при λ 280 и 255 нм. Условия те же, что и на рис. 1

((XI) и (XII) в табл. 1), комплементарные комплексы образуются. Наблюдается неаддитивный кооперативный эффект относительно отдельных компонентов (ср. вставки к рис. 2*г* и рис. 1*б*), а также несовпадение спектра КД комплекса с кривой, полученной суммированием спектров КД компонентов, снятых в условиях комплексообразования (кривые 1 и 3 на рис. 1*б* и 3).

Как видно из рис. 1, вид спектров КД комплексов варьирует в зависимости от природы компонентов. Проанализируем наблюдаемые различия. В литературе описано изменение спектров КД рибонуклеотидных дуплексов в зависимости от последовательности оснований в спирали [10]. По мнению авторов, эти изменения обусловлены различной относитель-

ной геометрией соседних пар оснований в дуплексах, например:



По этой же причине различаются спектры КД полимерных комплексов с повторяющейся триплексионидной последовательностью, например $d(A-T-C)_m \cdot d(G-A-T)_m$ и $d(T-A-C)_m \cdot d(G-T-A)_m$ [11]. В случае изученных нами систем также меняется нуклеотидная последовательность в компонентах комплексов, однако особенностью последних является идентичность структуры «внутри» спирали (см. области, заключенные в квадрат на схеме). Поэтому комплексы (I)–(XI) (табл. 1), имеющие одинаковый нуклеотидный состав, можно условно рассматривать и как комплексы с одинаковой нуклеотидной последовательностью. Различие заключается в том, что места разрывов в олигомерном тяжке, составленном из тридезоксирибонуклеотидов, не совпадают для разных комбинаций комплементарных олигомеров. Из рис. 1 видно, что спектры КД существенно меняются при переходе от семейства «а» к «б», от семейства «в» к «г» или от семейства «а» — «г» к семейству «д», для которых места разрывов в олигомерном тяжке не совпадают; если же места разрывов совпадают (семейства «а» и «в» или «б» и «г»), спектры претерпевают лишь незначительные изменения. Таким образом, различия в спектрах КД комплексов могут обуславливаться различием в степени перекрывания ковалентно связанных и просто сближенных на матрице оснований одинаковой природы (ср.,



Альтернативное объяснение наблюдаемых различий в спектрах КД заключается в следующем. Наибольшее несовпадение КД характерно для тех комплексов, компоненты которых имеют сильно различающиеся спектры. Это комплексы, в которых меняется последовательность нуклеотидов в тримере $d(pG-G-T)$ или $d(pT-G-G)$ (ср. а и б, в и г на рис. 1). Нуклеотидная последовательность в матрице $d(pC-C-A)_n$ и $d(pA-C-C)_n$ в значительно меньшей степени сказывается на форме кривых КД (ср. а и в, б и г на рис. 1). В то же время и спектры КД $d(pC-C-A)_n$ и $d(pA-C-C)_n$ различаются гораздо меньше, чем спектры КД олигомеров с последовательностью $d(pG-G-T)$ и $d(pT-G-G)$ (рис. 2). Таким образом, возможно, что различие спектров КД олигомерных комплексов заложено в различии КД составляющих компонентов. Высказанным предположениям не противоречит и тот факт, что длина олигомерной матрицы практически не сказывается на спектральных свойствах комплексов: для систем (I) и (V) спектры КД соответствуют спектру комплекса (IV), изображенному на рис. 1а, а для систем (VI) и (VII) характерен спектр комплекса (VIII) (рис. 1б). Наблюдаемые спектральные различия нельзя объяснить влиянием концевых нуклеотидов на оптические свойства комплексов, так как по мере увеличения длины олигомерной спирали спектры КД не меняются. Наличие или

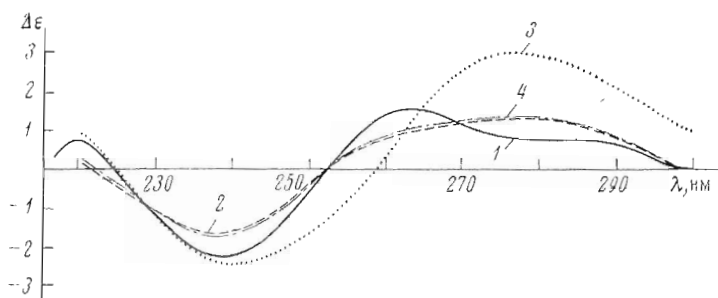


Рис. 3. Спектры КД комплекса $d(pA-C-C)_2 \cdot d(pT-G-G)_2$ при -5° (1) и 35° (2); расчетные спектры КД суммы компонентов комплекса при -5° (3) и 35° (4). Условия те же, что и на рис. 1

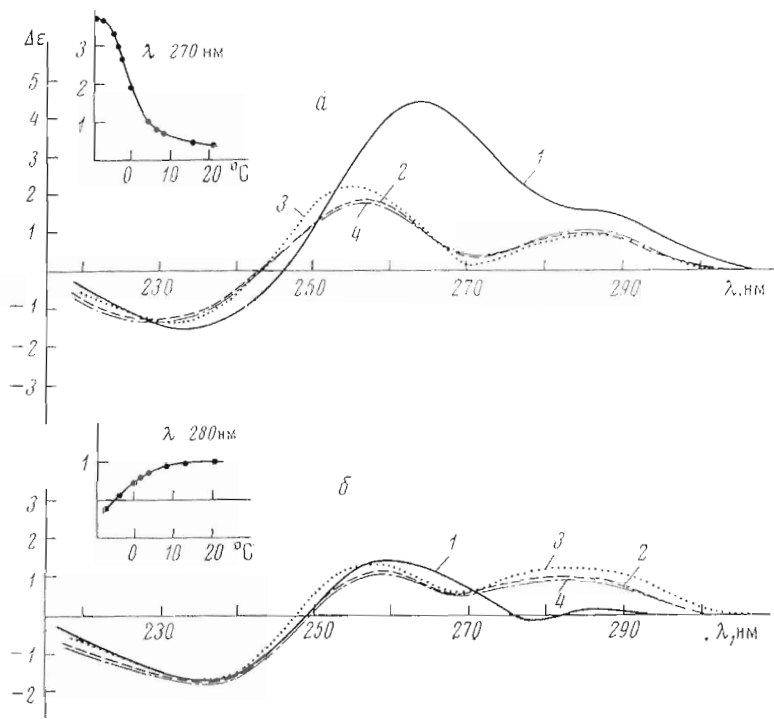


Рис. 4. Спектры КД комплексов: а — $d(pC-C-A) \cdot d(pG-G-T)$, б — $d(pC-C-A) \cdot d(pT-G-G)$ при -7° (1) и 21° (2); расчетные спектры КД суммы компонентов комплексов при -7° (3) и 21° (4). На вставках: зависимости $\Delta\epsilon$ комплексов от температуры при λ 270 (а) и 280 нм (б). Условия те же, что и на рис. 1

отсутствие «отвисающих концов» также не является фактором, определяющим вид спектров.

Для выяснения влияния длины олигомерной матрицы на оптические свойства систем представляло интерес исследовать комплексы с минимальной длиной матрицы. Недавно методом ЯМР-спектроскопии было показано образование межмолекулярных димеров в водных растворах $d(pG-C)$ [12], $d(pC-G)$ [13] и $d(pG-T) + d(pA-C)$ [13] при концентрации нуклеотидного материала 0,1 М. Используя метод КД, нам удалось впервые зарегистрировать комплементарный комплекс между двумя тридезоксирибонуклеотидами, удерживаемый двумя G-C- и одной A-T-парами — $d(pC-C-A) \cdot d(pT-G-G)$, либо только двумя G-C-парами — $d(pC-C-A) \cdot d(pG-G-T)$ (рис. 4). Кривые плавления (вставки к рис. 4) свидетельствуют

Термодинамические параметры комплексообразования олигодезоксирибонуклеотидов различной длины

Состав комплекса	Кол-во взаимодействующих нуклеотидных пар	ΔH^0 , ккал/моль, комплекса (± 3) *	ΔS^0 , э.е. (± 10) **	ΔH^0 , ккал/моль комплекса (± 4) ***		ΔS^0 , э.е. (± 12) ****	
				КД	УФ	КД	УФ
$d(pA-C-C)_2 \cdot d(pG-G-T)$	6	-63	-193	-65	-54	-197	-163
$d(pA-C-C)_3 \cdot d(pG-G-T)$	9	-94	-280	-96	-87	-288	-262
$d(pA-C-C)_4 \cdot d(pG-G-T)$	12	—	—	-122	-119	-355	-343
$d(pA-C-C)_2 \cdot d(pT-G-G)$	5	—	—	—	-47	—	-138
$d(pA-C-C)_3 \cdot d(pT-G-G)$	8	—	—	—	-78	—	-226
$d(pA-C-C)_4 \cdot d(pT-G-G)$	11	—	—	—	-106	—	-302
$d(pC-C-A)_2 \cdot d(pG-G-T)$	5	—	—	-64	-58	-198	-176
$d(pC-C-A)_2 \cdot d(pT-G-G)$	6	—	—	—	-60	—	-183
$d(pT-G-G)_2 \cdot d(pC-C-A)$	6	—	—	—	-65	—	-204
$d(pA-C-C)_2 \cdot d(pT-G-G)_2$	5	—	—	—	-53	—	-169
$d(pC-C-A) \cdot d(pG-G-T)$	2(8)	—	—	-86	—	-300	—

* Рассчитаны из наклона прямых в координатах $\ln C_0 - 1/T_{пл}$. Использовали усредненные (КД и УФ-спектроскопия) значения $T_{пл}$. В случае комплекса $d(pA-C-C)_2 \cdot d(pG-G-T)$ варьировали концентрацию тридезоксирибонуклеотида (системы I) — (III), табл. 1; в случае комплекса $d(pA-C-C)_3 \cdot d(pG-G-T)$ — общую нуклеотидную концентрацию при сохранении эквимольного соотношения компонентов: $C_0 = 2,74 \cdot 10^{-2}$ М, $T_{пл} 21,7^\circ$; $C_0 = 0,77 \cdot 10^{-2}$ М, $T_{пл} 15,5^\circ$; $C_0 = 0,69 \cdot 10^{-2}$ М, $T_{пл} 15^\circ$; $C_0 = 1,53 \cdot 10^{-2}$ М, $T_{пл} 6,5^\circ$; $C_0 = 1,03 \cdot 10^{-2}$ М, $T_{пл} 18^\circ$.

** Рассчитаны по уравнению (6).

*** Рассчитаны из наклона прямых в координатах $\ln K - 1/T$. Использовали температурные зависимости $\Delta \epsilon$ при $\lambda 265$ нм (КД) и D при $\lambda 257$ нм (УФ).

**** Рассчитаны по уравнению (5).

о кооперативном разрушении дуплексов. Однако для системы $d(pC-C-A) \cdot d(pT-G-G)$ нельзя исключить неполного комплексообразования при используемых условиях (вставка к рис. 4б). Тогда спектр КД $d(pC-C-A) \cdot d(pT-G-G)$ при низких температурах соответствует смеси спиральных и диссоциированных молекул. В случае комплекса $d(pC-C-A) \cdot d(pG-G-T)$ возможно образование конкатомеров, что подтверждается структурными особенностями этой системы (комплекс удерживается двумя G-C-парами, А и Т остаются неспаренными), а также более узким температурным интервалом перехода спираль — клубок и большей термической устойчивостью по сравнению с комплексом $d(pC-C-A) \cdot d(pT-G-G)$ (вставки к рис. 4а, б). Этому предположению не противоречат высокие значения ΔH^0 и ΔS^0 , рассчитанные для комплекса $d(pC-C-A) \cdot d(pG-G-T)$ (табл. 2). Принимая значение ΔH^0 для пары комплементарных оснований равным $-10,4$ ккал/моль (см. ниже), можно предположить образование конкатомера, стабилизированного восемью Н-связанными нуклеотидными парами. Оптические свойства комплексов олигодезоксирибонуклеотидов с минимальной длиной матрицы близки к свойствам комплексов родственных олигомеров большей длины. Так, спектр КД $d(pC-C-A) \cdot d(pG-G-T)$ (рис. 4а) имеет большое сходство со спектром комплекса семейства «е» — $d(pC-C-A)_2 \cdot d(pG-G-T)$ (рис. 1а), отличающ от последнего только амплитудой сложного Коттон-эффекта, в то же время в спектре КД $d(pC-C-A) \cdot d(pT-G-G)$ (рис. 4б), родственного двум семействам — «г» и «д», отражены черты сходства со спектрами комплексов обоих семейств, например $d(pC-C-A)_2 \cdot d(pT-G-G)$ (рис. 1а) и $d(pT-G-G)_2 \cdot d(pC-C-A)$ (рис. 1д). Следует подчеркнуть большое различие в спектрах КД комплексов, образуемых комплементарными тридезоксирибонуклеотидами одинакового нуклеотидного состава, но разной последовательности в одном из компонентов. Трудно сказать, является ли это следствием различий в степени перекрытия соседних хромофоров или вариаций в структуре образующихся миниспиралей.

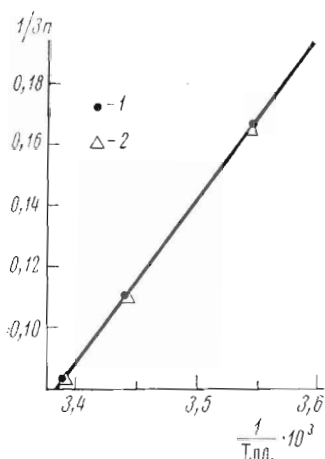


Рис. 5

Рис. 5. Зависимость $1/T_{пл}$ комплексов $d(pA-C-C)_n \cdot d(pG-G-T)$, $n = 2-4$ (1) и $d(pA-C-C)_n \cdot d(pT-G-G)$, $n = 2-4$ (2), от величины, обратной длине матричного олигомера, $-1/3n$

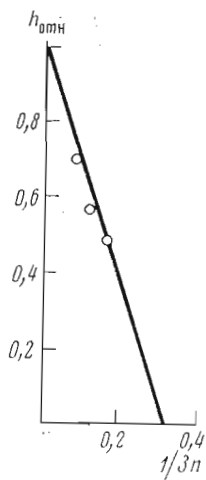


Рис. 6

Рис. 6. Зависимость относительной гипохромии $h_{0тн} = h^6/h_{\infty}$ (h^6 , см. в табл. 1, $h_{\infty} = 31\%$ [22]) $d(pA-C-C)_n \cdot d(pG-G-T)$, $n = 2-4$, от величины, обратной длине матричного олигомера, $-1/3n$; эффективная длина двойной спирали $3n - 3$

Для определения термической устойчивости комплексов (I) — (XI) (табл. 1) и термодинамических параметров комплексообразования были изучены зависимости $\Delta\epsilon$ и D от температуры при фиксированных длинах волн. Плавление олигомер-олигомерных комплексов происходит в широком температурном интервале и сопровождается разрушением стэкинга одноцепочечных компонентов. Процессы образования и диссоциации комплексов полностью обратимы в температурном интервале от -8 до $+45^\circ$. Для характеристики перехода спираль — клубок и оценки температуры плавления кривые плавления были обработаны по методике [13]. Данные по термической устойчивости комплексов суммированы в табл. 1. При сравнении температуры плавления дуплексов, образованных матрицами одинаковой длины, видно, что в пределах ошибки опыта устойчивость дуплексов не зависит от нуклеотидной последовательности в одном (системы (I) и (VI), (VI) и (X), табл. 1) или обоих (системы (VI) и (XI), табл. 1) компонентах комплексообразования. Это, по-видимому, является отражением характерной структурной особенности изучаемых комплексов, а именно идентичности структуры внутри спирали. Следует отметить, что добавление А-Т-пары к повторяющемуся нуклеотидному фрагменту (ср. семейства «а» — «г») практически не сказывается на температуре плавления комплексов. Однако для системы $d(pT-G-G)_2 \cdot d(pC-C-A)$ ((XI), табл. 1) зарегистрирована значительно более низкая температура плавления (2°) по сравнению с температурами плавления ряда комплексов с той же длиной матричного олигомера, например $d(pC-C-A)_2 \cdot d(pT-G-G)$ (9°). В комплексе (XI) в отличие от комплексов семейств «а» — «г» в месте разрыва олигомерной цепи контактируют остатки аденина и цитозина. Учитывая разницу в энергии стэкинг-взаимодействия А с С и Т с G [14], можно предположить, что разрыв цепи в месте контакта А и С сильнее дестабилизирует спираль, чем разрыв между G и Т (Т и G). Как и следовало ожидать, температура плавления комплекса, составленного из двух гексануклеотидов $d(pT-G-G)_2 \cdot d(pA-C-C)_2$, заметно выше (14°) температуры плавления дуплексов той же длины, но

содержащих разрывы в одной из цепей: $d(pT-G-G)_2 \cdot d(pC-C-A)$ (2°), $d(pA-C-C)_2 \cdot d(pT-G-G)$ (9°). При увеличении длины матричного олигомера устойчивость комплексов возрастает. Установлена линейная зависимость $1/T_{пл}$ от величины, обратной длине матрицы, $N=3n$ (рис. 5). Существование линейной зависимости между $1/N$ (N — длина олигомера) и $1/T_{пл}$ было показано для олигомер-олигомерных [15] и полимер-олигомерных комплексов [16]. Этот факт отражает экспоненциальную зависимость константы связывания от длины цепи олигомера.

Для расчета термодинамических параметров образования олигодезоксирибонуклеотидных комплексов с разрывами в одной из цепей простейшим подходом является анализ экспериментальных кривых плавления с помощью модели двух состояний, которая служит хорошим приближением для комплексов олигомеров одинаковой длины [2, 17]. Согласно этой модели, процесс комплексообразования для систем (I) — (XI) (табл. 1) описывается уравнением



где n — число молекул тридезоксирибонуклеотида, взаимодействующих с олигомерной матрицей.

Пусть C_0 — общая нуклеотидная концентрация (в расчете на мономерное звено), а C_A , C_B и C_{AB} — молярные равновесные концентрации матричного олигомера, тридезоксирибонуклеотида и комплекса соответственно. Тогда

$$C_0 = mnC_A + mC_B + 2mnC_{AB}, \quad (2)$$

где m — количество нуклеотидных звеньев в более коротком компоненте комплекса (для изучаемых комплексов m равно 3). Обозначив $2mnC_{AB}/C_0$ — долю моонуклеотидных звеньев, участвующих в комплексообразовании, — через f , получаем

$$C_{AB} = \frac{fC_0}{2mn} \text{ и } \frac{mnC_A}{C_0} + \frac{mC_B}{C_0} = 1 - f.$$

Учитывая, что $C_B = nC_A$ (в условиях эксперимента соблюдалось эквимолярное в расчете на мономерное звено соотношение компонентов), получаем

$$C_A = \frac{(1-f)}{2mn} C_0 \text{ и } C_B = \frac{n(1-f)}{2mn} C_0.$$

Отсюда константу равновесия процесса, K , можно представить следующим образом:

$$K = \frac{C_{AB}}{C_A (C_B)^n} = \frac{f (2m)^n}{C_0^n (1-f)^{n+1}}. \quad (3)$$

Константа равновесия в точке плавления, $K_{T_{пл}}$ ($f = 1/2$) выражается уравнением

$$K_{T_{пл}} = (4m)^n / C_0^n. \quad (4)$$

Так как изменение свободной энергии при комплексообразовании

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ, \quad (5)$$

то

$$n (\ln C_0 - \ln 4 - \ln m) = \frac{\Delta H^\circ}{RT_{пл}} - \frac{\Delta S^\circ}{R}. \quad (6)$$

Тогда ΔH° может быть найдена из наклона прямой в координатах $\ln C_0$ — $1/T_{пл}$, а ΔS° — по уравнению (6). Значения ΔH° и ΔS° , вычисленные для системы $d(pA-C-C)_{2,3} \cdot d(pG-G-T)$, приведены в табл. 2.

ΔH° может быть также найдена из наклона прямой в координатах Вант-Гоффа: $\ln K - 1/T$. Выражая f через параметры КД ($\Delta\epsilon$) или УФ (ϵ), можно определить значения $\lg K$ непосредственно из кривых плавления. Так, значения $\Delta\epsilon$ равновесной системы при данной температуре, $\Delta\epsilon(T)$, можно представить следующим образом:

$$\Delta\epsilon(T) = \Delta\epsilon_A \frac{mnC_A}{C_0} + \Delta\epsilon_B \frac{mC_B}{C_0} + \Delta\epsilon_{AB} \frac{2mnC_{AB}}{C_0}. \quad (7)$$

Вводя указанные выше обозначения (f и $(1 - f)$), получаем

$$\Delta\epsilon(T) = \left(\frac{\Delta\epsilon_A + \Delta\epsilon_B}{2} \right) (1 - f) + \Delta\epsilon_{AB} f. \quad (8)$$

Очевидно, что $\Delta\epsilon_{AB}$ и $(\Delta\epsilon_A + \Delta\epsilon_B)/2$ — значения $\Delta\epsilon$ на низкотемпературном и высокотемпературном плато кривой плавления при данной температуре. Обозначая $(\Delta\epsilon_A + \Delta\epsilon_B)/2$ через $\Delta\epsilon_C$, получаем

$$f = \frac{\Delta\epsilon(T) - \Delta\epsilon_C}{\Delta\epsilon_{AB} - \Delta\epsilon_C}$$

и

$$K = \frac{(\Delta\epsilon(T) - \Delta\epsilon_C)(\Delta\epsilon_{AB} - \Delta\epsilon_C)^n (2m)^n}{(\Delta\epsilon_{AB} - \Delta\epsilon(T))^{n+1} C_0^n}. \quad (9)$$

Аналогичное уравнение получается, если K выразить через параметры УФ-спектроскопии — $\epsilon(T)$, ϵ_{AB} и ϵ_C^* .

Термодинамические параметры комплексообразования в системах (I), (IV) — (XII), а также в системе d(pC-C-A)·d(pG-G-T), вычисленные таким путем, суммированы в табл. 2, из которой видно, что значения ΔH° и ΔS° , рассчитанные по данным КД и УФ, близки. Кроме того, наблюдается хорошая корреляция между термодинамическими параметрами, вычисленными обоими описанными способами, что подтверждает правомерность применения модели двух состояний к исследуемым системам. Величины ΔH° и ΔS° , полученные для разного типа комплексов, пропорциональны количеству теоретически возможных комплементарных пар и не зависят от нуклеотидной последовательности компонентов комплексообразования. Это свидетельствует о полном заполнении матрицы тримерами и об отсутствии влияния разрывов в комплементарной цепи на термодинамические характеристики систем. Для всех изученных комплексов на усредненную нуклеотидную пару приходится величина ΔH° , равная $-10,4$ ккал/моль, и ΔS° , равная $-30,6$ э.е., что хорошо согласуется с литературными данными по ДНК-подобным дуплексам без внутренних разрывов [2]. Отметим, что в рассмотренной модели двух состояний не учитывается фактор кооперативности перехода спираль — клубок, используемый при расчете термодинамических параметров плавления полимерполимерных комплексов [18]. Однако полученное значение ΔH° для усредненной нуклеотидной пары хорошо согласуется с данными прямых микрокалориметрических измерений теплового эффекта денатурации ДНК [19]. Это свидетельствует о довольно слабой по сравнению с полимерными системами кооперативности в исследуемых дуплексах.

Образование олигодезоксирибонуклеотидных комплексов сопровождается сравнительно небольшим гипохромным эффектом (табл. 1). Природа тридезоксирибонуклеотида практически не сказывается на величине гипохромии, в то же время изменение нуклеотидной последовательности в матричном олигомере вызывает изменение h^0 , превышающее ошибку измерений. Удлинение матрицы сопровождается скачкообразным увеличе-

* Поскольку ϵ и D связаны прямо пропорциональной зависимостью, при расчетах можно пользоваться значениями оптической плотности.

нием гипохромии. В работе Пола [20], исследовавшего комплексообразование $dp(G-C)_n$, показано существование линейной зависимости относительной гипохромии $h_{отн} = h_N/h_\infty$ (h_N — гипохромия олигомерного комплекса, h_∞ — гипохромия полимера) от $1/N$ (N — длина двойной спирали) в том случае, если эффективная длина двойной спирали равняется $N - 2$, т. е. когда пары оснований на концах двойной спирали не вносят вклад в гипохромный эффект. Этот результат хорошо соответствует теоретическим расчетам Рича и Тиноко [21] для ДНК в В-форме. Для комплексов семейства «а» был построен график зависимости гипохромии от длины матрицы в координатах, предложенных Полом (рис. 6). За h_∞ принята гипохромия комплекса $polyd(A-G-C) \cdot polyd(G-C-T)$, равная 31% [22]. Значения h^6 (табл. 1) и $h_{отн} = h^6/h_\infty$ для исследованных нами комплексов несколько ниже, чем соответствующие величины для $dp(G-C)_n$, а экспериментальные точки хорошо ложатся на прямую при условии, если эффективная длина двойной спирали равняется $3n - 3$. Уменьшение гипохромного эффекта можно объяснить наличием А-Т-пар в комплексах, так как известно, что гипохромия $d(pT)_{12} \cdot d(pA)_6$ [23] существенно ниже, чем h $dp(G-C)_n$. Остается также вероятность того, что в выбранных нами условиях некоторые нуклеотидные звенья не участвуют в образовании водородных связей (например, концевые основания олигомеров) и имеются тримеры, полностью не связанные с матрицей. Однако, как показано ниже, этого не происходит.

Вопрос о полноте заполнения матрицы комплементарными олигомерами имеет принципиальное значение для комплексов с разрывами в одной из цепей. Можно привести ряд доказательств того, что при комплексообразовании в системах (I) — (XI) (табл. 1) реализуются все теоретически возможные комплементарные взаимодействия.

1. Совпадение спектров КД комплексов, различающихся длиной матрицы, свидетельствует об образовании одноцепных дуплексов, геометрические параметры которых совпадают.

2. ΔH° и ΔS° изученных комплексов (табл. 2) независимо от их длины и нуклеотидной последовательности пропорциональны числу нуклеотидных пар в системах и совпадают с термодинамическими параметрами дуплексов с тем же числом нуклеотидных звеньев, но не содержащих разрывов в цепи.

3. Величина гипохромного эффекта комплекса, образованного гексануклеотидами, $d(pT-G-G)_2 \cdot d(pA-C-C)_2$, совпадает с h^a комплекса того же состава, но имеющего разрыв в комплементарной цепи — $d(pA-C-C)_2 \cdot d(pT-G-G)$ (системы (VI) и (XII), табл. 1). Это означает, что доля спиральных участков в комплексах (VI) и (XII) одинакова и с точки зрения оптических свойств эти комплексы неразличимы. Кривые КД обоих дуплексов также практически совпадают (рис. 16 и 3).

4. Исследование комплексообразования $d(pA-C-C)_2$ с $d(pG-G-T)$ при разных соотношениях гексануклеотид — тринуклеотид (системы (I), (II) и (III), табл. 1) показало, что уже при эквимолярном соотношении компонентов тридезоксирибонуклеотид занимает все теоретически возможные места связывания на олигомерной матрице. Как видно из рис. 7, спектр КД комплекса (II) представляет собой линейную комбинацию следующих спектров: $\frac{2}{3} d(pA-C-C)_2 \cdot d(pG-G-T)$ (1 : 1) + $\frac{1}{3} d(pG-G-T)$, а спектр комплекса (III) — комбинацию $\frac{2}{3} d(pA-C-C)_2 \cdot d(pG-G-T)$ (1 : 1) + $\frac{1}{3} d(pA-C-C)_2$, т. е. избыток одного из компонентов не вызывает изменения структуры комплекса и соответственно вида спектра КД. Если это справедливо для самого термически нестабильного комплекса, то, очевидно, выполняется и для комплексов олигомеров с большей длиной цепи.

Таким образом, при формировании дуплексов короткий олигомер без пропусков заполняет комплементарную цепь. Полному заполнению матрицы способствует выигрыш в энергии стэкинга в месте контакта тридезоксирибонуклеотидов.

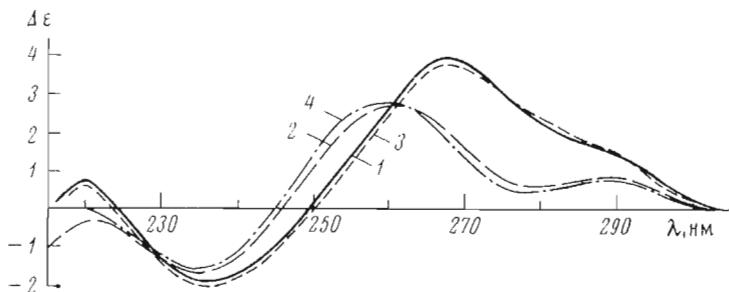


Рис. 7. Спектры КД (-7°) комплексов $d(pA-C-C)_2 \cdot d(pG-G-T)$, соотношение гексануклеотид — тринуклеотид в расчете на мономерное звено 2 : 1 (1) и 1 : 2 (2); расчетные спектры КД (-7°) — $2/3 d(pA-C-C)_2 \cdot d(pG-G-T)$ (1 : 1) + $1/3 d(pA-C-C)_2$ (3) и $2/3 d(pA-C-C)_2 \cdot d(pG-G-T)$ (1 : 1) + $1/3 d(pG-G-T)$ (4). Условия те же, что и на рис. 1

В заключение отметим следующее. Комплементарные олигодезоксирибонуклеотиды различной длины с повторяющейся тринуклеотидной последовательностью образуют комплексы, близкие по ряду свойств (линейная зависимость $T_{пл}$ и h от длины дуплекса, близкие значения термодинамических параметров, сохранение вида спектров КД при изменении длины спирали и др.) к комплексам олигомеров одинаковой длины, принимающих в растворе структуру, аналогичную *B*-форме ДНК [2,24]. Этот факт, а также подобие спектров КД комплексов семейств «а» — «г» (схема) со спектром КД ДНК с высоким содержанием *G-C*-пар дают возможность предположить, что в изученных нами системах образуются спирали, подобные *B*-форме ДНК. В связи с этим комплексы олигомеров с разрывами в цепи могут быть рекомендованы для моделирования различных ферментативных реакций, изучения белково-нуклеиновых взаимодействий, а также для проведения реакций на комплементарных матрицах.

Одно из свойств этих комплексов — наличие зависимости вида спектров КД от нуклеотидной последовательности компонентов при идентичности структуры внутри спирали — может представлять интерес для теоретического анализа КД нуклеиновых дуплексов.

Экспериментальная часть

Тридезоксирибонуклеотиды $d(pT-G-G)$, $d(pG-G-T)$ и $d(pC-C-A)$ синтезированы сотрудниками кафедры П. И. Поздняковым, Е. В. Ильиной и В. А. Бакановой по описанной методике [25]. Олигонуклеотиды с большей длиной цепи получены химической полимеризацией соответствующих тридезоксирибонуклеотидов. Синтез и выделение продуктов полимеризации $d(pA-C-C)$ описаны в работе [26]. Полимеризация $d(pC-C-A)$ и $d(pT-G-G)$ выполнена по аналогичной методике В. А. Бакановой и П. И. Поздняковым. Разделение полимерной смеси $d(pC-C-A)$ проводили при помощи ионообменной хроматографии по методу Томлинсона — Тенера на DEAE-сефадексе А-25 (*Cl*⁻-форма) в градиенте $NaCl$ [27]. Продукты полимеризации $d(pT-G-G)$ разделяли ионообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе, используя ступенчатый градиент триэтиламонийбикарбонатного буфера, содержащего 10% этанола. Окончательную очистку фракций осуществляли хроматографией по Томлинсону — Тенеру [27]. Дополнительную очистку продуктов полимеризации $d(pA-C-C)$ проводили при помощи нисходящей хроматографии на бумаге Ватман 1 в системе *n*-пропанол — конц. NH_3 — H_2O (55 : 10 : 35). Состав каждой фракции устанавливался на основании хроматографических подвижностей на DEAE-сефадексе А-25 и на бумаге, а также на основании результатов гидролиза продуктов фосфомоноэстеразой и фосфодиэстеразой змеиного яда. Гомогенность и длина олигодезоксирибонуклеотидов были дополнительно подтверждены микроколonoчной

хроматографией по Томлинсону — Тенеру [28] путем сравнения хроматографических подвижностей исследуемых и контрольных образцов. Для оптических исследований использованы 5'-О-метилвые эфиры $d(\text{pA-C-C})_n$, где $n = 2-4$, и $d(\text{pT-G-G})_2$; $d(\text{pC-C-A})_2$ не содержал фосфатблокирующей группы. Растворы комплексов готовили в 0,004 М фосфатном буфере (рН 7,3), содержащем 0,2 М NaCl и 0,075 М MgCl_2 . Соотношение компонентов комплексообразования было эквимолярным (если не оговорено особо), а концентрация составляла 10^{-2} М (в расчете на мононуклеотидное звено). Для спектрофотометрического определения концентрации нуклеотидного материала использовали следующие коэффициенты молярного поглощения: ϵ_{260} 9720 (гипохромия олигодезоксирибонуклеотида при 260 нм, h_{260}° , равна 9,4%), для $d(\text{pG-G-T})$, ϵ_{260} 9730 ($h_{260}^\circ = 9,3\%$) для $d(\text{pT-G-G})$, ϵ_{260} 9210 ($h_{260}^\circ = 7,9\%$) для $d(\text{pC-C-A})$, ϵ_{260} 9270 ($h_{260}^\circ = 13,6\%$) для $d(\text{pT-G-G})_2$, ϵ_{260} 8800 ($h_{260}^\circ = 12\%$) для $d(\text{pC-C-A})_2$, ϵ_{260} 8920 ($h_{260}^\circ = 10,8\%$) для $d(\text{pA-C-C})_2$ (определены путем гидролиза фосфодиэстеразой змеиного яда); ϵ_{260} для $d(\text{pA-C-C})_4$ равен 8250 [6], ϵ_{260} для $d(\text{pA-C-C})_3$ принимали равным 8500. Спектры КД и УФ и кривые плавления измеряли на дихрографе «Jouan II» (Франция) и спектрофотометре «Cary-15» (США). Чувствительность измерений на дихрографе составляла $1 \cdot 10^{-5}$ ОЕ/мм. Ошибка в определении дихроичного поглощения в области 230—320 нм не превышала 7%. Плавление проводили в термостабируемых кварцевых кюветках с длиной оптического пути 0,01 см. Температуру в кюветном отделении регистрировали при помощи медно-константановой термопары. Во избежание запотевания кювет при отрицательных температурах в кюветное отделение продували сухой азот.

Авторы выражают благодарность А. И. Долинному и В. Л. Флорентьеву за помощь при расчете термодинамических параметров комплексообразования, а также Р. Ш. Бибилашвили за обсуждение результатов работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Scheffler I. E., Elson E. L., Baldwin R. L. (1970) *J. Mol. Biol.*, **48**, 145—171.
2. Pohl F. M. (1974) *Eur. J. Biochem.*, **12**, 495—504.
3. Patel D. J., Tonelli A. E. (1974) *Biopolymers*, **13**, 1943—1964.
4. Patel D. J., Hilbers C. W. (1975) *Biochemistry*, **14**, 2651—2656.
5. Kallenbach N. R., Daniel W. E., Kaminker M. A. (1976) *Biochemistry*, **15**, 1218—1224.
6. Долинная Н. Г., Громова Е. С., Ильина Е. В., Сергеева Н. Ф., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. (1975) *Биоорганическая химия*, **1**, 1296—1302.
7. Cantor C. R., Tinoco I. (1967) *Biopolymers*, **5**, 821—835.
8. Ts'o P. O. P. (1974) in *Basic Principles in Nucleic Acid Chemistry*, vol. II, pp. 323—333, Acad. Press, New York—London.
9. Jaskunas S. R., Cantor C. R., Tinoco I. (1968) *Biochemistry*, **7**, 3164—3178.
10. Borer P. N., Uhlenbeck O. C., Dengler B., Tinoco I. (1973) *J. Mol. Biol.*, **80**, 759—771.
11. Wells R. D., Larson J. E., Grant R. C., Shortle B. E., Cantor C. R. (1970) *J. Mol. Biol.*, **54**, 465—497.
12. Patel D. J. (1976) *Biochim. et biophys. acta*, **442**, 98—108.
13. Young M. A., Krugh T. R. (1975) *Biochemistry*, **14**, 4841—4846.
14. Uhlenbeck O. C., Borer P. N., Dengler B., Tinoco I. (1973) *J. Mol. Biol.*, **73**, 486—496.
15. Crothers D. M., Kallenbach N. R., Zimm B. H. (1965) *J. Mol. Biol.*, **11**, 802—820.
16. Tazawa I., Tazawa S., Ts'o P. O. P. (1972) *J. Mol. Biol.*, **66**, 115—130.
17. Pörschke D. (1973) *Biopolymers*, **12**, 1313—1335.
18. Lazurkin Yu. S., Frank-Kamenetsky M. D., Trifonov E. N. (1970) *Biopolymers*, **9**, 1253—1306.
19. Привалов П. Л. (1969) *Молекулярная биология*, **3**, 690—695.
20. Pohl F. M. (1974) *FEBS Letters*, **38**, 202—204.
21. Rich A., Tinoco J. (1960) *J. Amer. Chem. Soc.*, **82**, 6409—6411.
22. Patliff R. L., Hoard D. E., Hayes F. N., Smith D. A., Gray D. M. (1976) *Biochemistry*, **15**, 168—176.
23. Naylor R., Gilham P. T. (1966) *Biochemistry*, **5**, 2722—2728.

24. Patel D. J., Tonelli A. E. (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **71**, 1945—1948.
25. Weber H., Khorana H. G. (1972) J. Mol. Biol., **72**, 219—230.
26. Смирнов В. Д., Сергеева Н. Ф., Ильина Е. В., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. (1974) Докл. АН СССР, **218**, 722—725.
27. Tomlinson R. V., Tener L. M. (1962) J. Amer. Chem. Soc., **84**, 2644—2645.
28. Грачев М. А. (1973) в кн. Ультрамикроанализ нуклеиновых кислот (Кнорре Д. Г., Венкстерн Т. В., ред.), с. 104—122, «Наука», М.

Поступила в редакцию
25.VII.1977

После доработки
8.IX.1977

COMPLEMENTARY INTERACTIONS BETWEEN TRIDEOXYRIBONUCLEOTIDES AND OLIGODEOXYRIBONUCLEOTIDE TEMPLATES OF VARIOUS LENGTH

DOLINNAYA N. G., GROMOVA E. S., MIKHAILOV S. N.,
SHABAROVA Z. A.,

*Chemistry Department and A. N. Belozersky Laboratory of Molecular Biology
and Bioorganic Chemistry, M. V. Lomonosov State University, Moscow;
Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

By CD and UV methods complex formation was studied between complementary oligodeoxyribonucleotides of various length: $d(pA-C-C)_{2-4} \cdot d(pG-G-T)$, $d(pA-C-C)_{2-1} \cdot d(pT-G-G)$, $d(pC-C-A)_{2-4} \cdot d(pG-G-T)$, $d(pC-C-A)_{1,2} \cdot d(pT-G-G)$, $d(pT-G-G)_2 \cdot d(pC-C-A)$. In complex the template oligomer¹ was shown to be entirely occupied by trideoxyribonucleotides. For the first time a dependence of CD curves of nucleotide duplexes on the base sequence was observed, the structure «inside» the helix being identical. Spectral properties of the oligomer duplexes did not depend on the length of template, oligomer and the presence of «having down» ends. The thermal stability and hypochromicity of the complexes increased with the lengthening of template oligomer, but showed no dependence on nucleotide sequence in one or both complex components. A linear relation was found between $1/T$ (melting point) and the inverse template length. Thermodynamic parameters of oligodeoxyribonucleotide complex formation were determined basing on the two-state model. The obtained ΔH° and ΔS° values are proportional to the number of complementary pairs in the complexes.
