



УДК 577.113.6.088.53:543.422.25

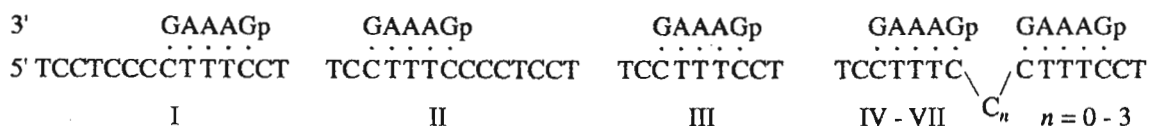
ВЛИЯНИЕ ИНТЕРКАЛИРУЮЩИХ КРАСИТЕЛЕЙ ЭТИДИЯ И ФЕНАЗИНИЯ, КОВАЛЕНТНО ПРИСОЕДИНЕННЫХ К 5'- ИЛИ 3'-КОНЦУ ПЕНТАНУКЛЕОТИДА d(pGAAAG), НА ТЕРМОДИНАМИКУ КОМПЛЕМЕНТАРНОГО И КООПЕРАТИВНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ*

© 1995 г. С. Г. Лохов, А. А. Кошкин, И. В. Кутявин, М. П. Митякин, М. А. Подыминогин, А. В. Лебедев

Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН, 630090, Новосибирск, пр. Лаврентьева, 8

Поступила в редакцию 3.06.93 г. После доработки 21.04.94 г.

Изучена термическая стабильность и рассчитаны термодинамические параметры образования пентануклеотидных комплексов



а также соответствующих комплексов производных пентануклеотида, несущих на 5'- или 3'-конце ковалентно присоединенные остатки интеркалирующих красителей: N-(2-гидроксиэтил)феназиния (Phn) или 2-N-(3-аминопропионил)этидия (Etd). Показано, что производные пентануклеотида образуют более прочные комплементарные комплексы. Наибольший эффект стабилизации наблюдается в том случае, когда краситель находится со стороны длинного одноцепочечного участка тетрадекануклеотида. При этом температура плавления комплексов увеличивается по сравнению с немодифицированным дуплексом на 22.5 (Phn) и 31.2°C (Etd) для 5'-производных или на 21.6 (Phn) и 27.2°C (Etd) в случае 3'-производных. В "тандемных" комплексах IV - VII константа кооперативного взаимодействия производных пентануклеотида выше по сравнению с немодифицированным пентануклеотидом и составляет для комплекса IV: 33 (немодифицированный), 35 (5'Phn), 57 (3'Phn), 190 (5'Etd), 100 (3'Etd) (37°C). При n = 3 в комплексе VII константы кооперативности во всех случаях близки к 1.

Ключевые слова: олигонуклеотиды, модификация; дуплексы, термостабильность, термодинамика; кооперативность; интеркалятор; этидий; феназиний.

Термодинамическая стабильность коротких олигонуклеотидных дуплексов в значительной степени определяется состоянием концевых пар оснований. Конкуренция молекул растворителя за образование водородных связей с основаниями [1], неполный стэкинг по сравнению с центральными парами приводят к их дестабилизации. Появление на конце дуплекса ароматической полициклической молекулы, ковалентно связанной с олигонуклеотидом (неспаренного "свисающего" основания [2] или интеркалирующего красителя [3, 4]), приводит к заметному (особенно во втором случае) повышению стабильности дуплекса преимуще-

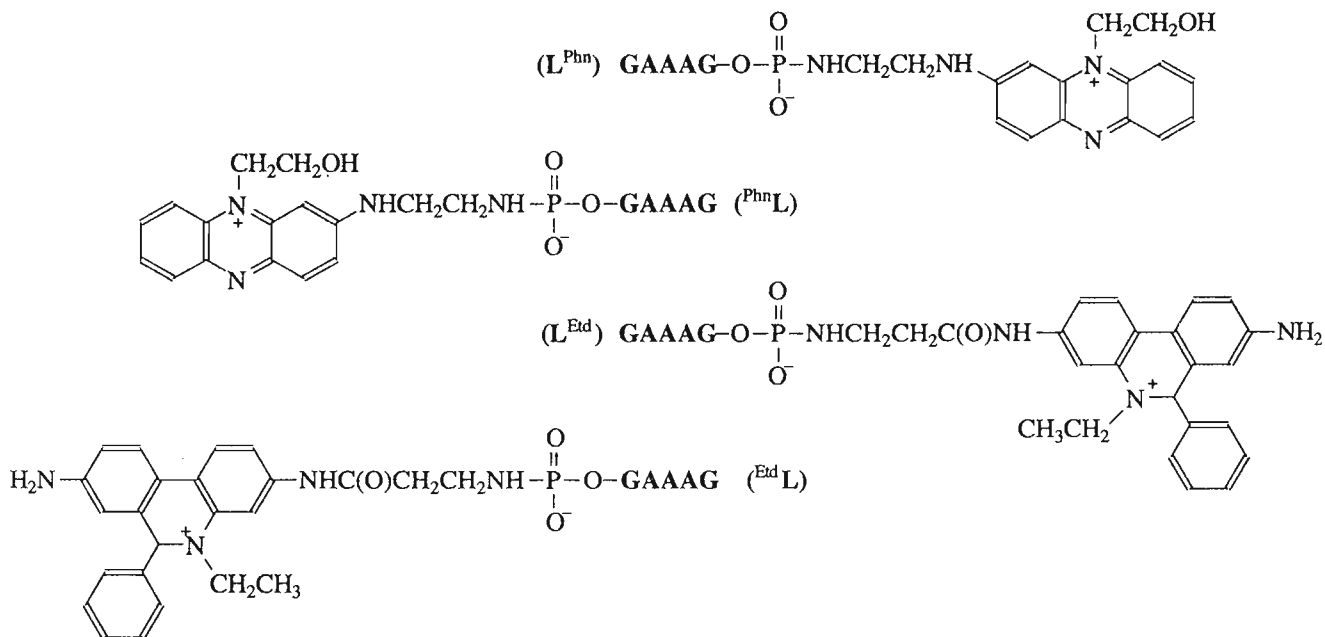
ственно за счет появления дополнительного стэкинга. Краситель препятствует также молекулам воды конкурировать за образование водородных связей с основаниями крайней пары [5].

Качественно похожий эффект наблюдается в случае кооперативного связывания двух олигонуклеотидов на общей комплементарной цепи в стык с образованием "тандемного" дуплекса [6]. На примере системы (I)₅₋₁₂-poly(C) показано, что энтальпия комплексообразования в пересчете на одно звено не зависит от длины олигомера, а КД-спектры олигомер-полимерного и полимер-полимерного комплексов совпадают, что косвенно доказывает наличие полноценного стэкинг-взаимодействия между основаниями, граничащими в одноцепочечном разрыве НК [7]. Сочетание эффективности кооперативности с увеличением эффективности комплексообразования олигонуклеотида за счет ковалентного присоединения по концевому

* Сокращения: Phn – остаток N-(2-гидроксиэтил)феназиния, Etd – остаток 2-N-(3-аминопропионил)этидия; $\Delta H_{\text{вн}}$, $\Delta S_{\text{вн}}$, $\Delta G_{\text{вн}}$ – термодинамические параметры, рассчитанные по уравнению Вант-Гоффа в интегральной форме; префикс "d" в обозначении олигодезоксинуклеотидов в тексте опущен.

Дезоксипентануклеотид и его производные серии L (5'-3')

pGAAAG (L)



Дезоксиолигонуклеотиды серии M (5'-3')

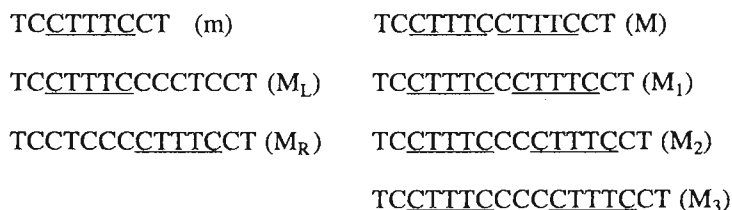


Схема.

фосфату интеркалирующего красителя дает возможность получать прочные комплементарные комплексы [3, 8] и тем самым, например, значительно увеличить выход реакции сайт-специфичной модификации нуклеиновых кислот [9, 10] реакционноспособными производными олигонуклеотидов.

Цель данной работы – определить количественные характеристики взаимодействия пентануклеотида pGAAAG, модифицированного по 5'- или 3'-концу остатками интеркалирующих красителей этидия и феназиния с комплементарными олигонуклеотидными матрицами; исследовать влияние на величину кооперативного эффекта природы красителя, места его присоединения к олигонуклеотиду (5' или 3'), расстояния между двумя местами связывания пентануклеотидов в “тандемном” дуплексе.

Для решения поставленной задачи были синтезированы олигодезоксинуклеотиды, представ-

ленные на схеме. Соответствующие комбинации производных пентануклеотида серии L с комплементарными последовательностями олигонуклеотидов серии M (места связывания подчеркнуты) позволяют получить комплексы типа I - III с одним дуплексным участком соответственно с олигонуклеотидами M_R (правый), M_L (левый) и m (короткий), а также комплексы IV - VII с двумя дуплексными участками в стык и с увеличивающейся брешью между ними на олигонуклеотидных матрицах M, M₁, M₂, M₃ соответственно.

На первом этапе были определены термодинамические параметры образования комплексов I, II всеми производными пентануклеотида. Расчет параметров (табл. 1) проводили по методике, изложенной в “Экспериментальной части”.

Используя в качестве критерия величины $\Delta G_{\text{вн}}$ и ΔT_{max} , можно высказать четыре достаточно очевидных утверждения: 1) термостабильность комплементарных комплексов пентануклеотидов,

Таблица 1. Термодинамические параметры образования комплексов I и II пентануклеотидами с тетрадекануклеотидами M_R и M_L

Пентануклеотид и производные	Комплекс I ТССТССССТТТССТ M _R				Комплекс II ТССТТТССССТССТ M _L			
	$\Delta H_{\text{вн}}$	$\Delta S_{\text{вн}}$	$\Delta G_{\text{вн}}^{37^\circ\text{C}}$	T_{max}^*	$\Delta H_{\text{вн}}$	$\Delta S_{\text{вн}}$	$\Delta G_{\text{вн}}^{37^\circ\text{C}}$	T_{max}^*
L	-30.9	-89.5	-3.19	9.4	-31.5	-90.7	-3.40	11.7
PhеL	-35.0	-94.9	-5.62	31.9	-37.0	-100.4	-5.86	34.2
	(-4.1)	(-5.4)	(-2.43)	(22.5)	(-5.5)	(-9.7)	(-2.46)	(22.5)
L ^{Phе}	-37.0	-101.8	-5.48	31.0	-35.0	-96.4	-5.11	27.6
	(-6.1)	(-12.3)	(-2.29)	(21.6)	(-3.5)	(-5.7)	(-1.71)	(15.6)
EtdL	-41.3	-112.7	-6.36	38.1	-46.9	-128.4	-7.09	42.9
	(-10.4)	(-23.2)	(-3.17)	(28.7)	(-15.4)	(-37.7)	(-3.69)	(31.2)
L ^{Etd}	-47.3	-133.0	-6.08	36.2	-42.2	-117.8	-5.70	33.5
	(-16.4)	(-43.5)	(-2.89)	(26.8)	(-10.7)	(-27.1)	(-2.30)	(21.8)

* Температура максимума первой производной кривой плавления. Средние арифметические отклонения параметров: $\Delta H_{\text{вн}} \pm 1$ ккал/моль; $\Delta S_{\text{вн}} \pm 3$ кал/(моль К); $\Delta G_{\text{вн}} \pm 0.02$ ккал/моль; $T_{\text{max}} \pm 0.2$ град. Цифры в скобках – разница между величинами соответствующих параметров комплексов, образованных модифицированными и немодифицированным пентануклеотидами: $\Delta\Delta H_{\text{вн}}$, $\Delta\Delta S_{\text{вн}}$, $\Delta\Delta G_{\text{вн}}(37^\circ\text{C})$, ΔT_{max} .

модифицированных красителями, значительно выше, чем немодифицированного; 2) оба красителя оказывают большее стабилизирующее влияние на дуплекс в том случае, когда они присоединены к 5'-, а не к 3'-концу пентануклеотида; 3) из двух комплексов (I или II), образуемых модифицированным пентануклеотидом, большей термостабильностью обладает тот, в котором краситель расположен к центру тетрадекануклеотида (т.е. в сторону более длинного одноцепочечного семизвенного участка); 4) остаток Etd обладает заметным преимуществом перед Phn, как стабилизатор дуплекса.

Все варианты модификации пентануклеотида интеркалирующими красителями характеризуются повышенными значениями энтальпии комплексообразования ($\Delta H_{\text{вн}} < 0$) по сравнению с немодифицированным пентануклеотидом. Это означает наличие стэкинг-взаимодействия между ковалентно присоединенным красителем и крайними парами оснований дуплекса [3, 4]. При этом комплексы, в которых краситель ориентирован к центру матрицы, характеризуются заметно более высокими величинами термодинамических параметров, свидетельствующими о большей упорядоченности вторичной структуры и прочности комплексов по сравнению с комплексами, в которых краситель расположен с краю.

$$\Delta H_{\text{вн}}(\text{PhnLM}_L) \approx \Delta H_{\text{вн}}(\text{L}^{\text{Phn}}\text{M}_R) > \Delta H_{\text{вн}}(\text{PhnLM}_R) \approx \Delta H_{\text{вн}}(\text{L}^{\text{Phn}}\text{M}_L);$$

$$\Delta H_{\text{вн}}(\text{EtdLM}_L) \approx \Delta H_{\text{вн}}(\text{L}^{\text{Etd}}\text{M}_R) > \Delta H_{\text{вн}}(\text{EtdLM}_R) \approx \Delta H_{\text{вн}}(\text{L}^{\text{Etd}}\text{M}_L).$$

Объяснения данной закономерности были получены после изучения комплексообразования вышеперечисленных дезокси-пентануклеотидов с укороченной последовательностью ТССТТТССТ (m).

В табл. 2 приведены результаты обработки экспериментальных данных. Сравнение табл. 1 и 2 показывает, что при отсутствии красителя комплекс mL прочнее комплексов LM_L и LM_R, т.е. протяженный одноцепочечный участок, находящийся рядом с дуплексным, дестабилизирует его. По-видимому, происходит увеличение конформационной подвижности пары оснований дуплекса, ближайшей к одноцепочечному фрагменту. В то же время комплексы I и II, образованные 3'Phn-, 5'Etd-, 3'Etd-производными пентануклеотида (исключая 5'Phn-), при ориентации красителя в сторону длинного одноцепочечного фрагмента более термостабильны, чем комплексы с укороченной матрицей m. Таким образом, стабилизирующий

Таблица 2. Термодинамические параметры образования комплексов III пентануклеотидов с нонануклеотидом ТССТТТССТ (m)*

Пентануклеотид и производные	$\Delta H_{\text{вн}}$	$\Delta S_{\text{вн}}$	$\Delta G_{\text{вн}}^{37^\circ\text{C}}$	T_{max}
L	-32.2	-91.8	-3.74	15.0
PhеL	-38.5	-104.9	-6.02	35.5
	(-6.3)	(-13.1)	(-2.28)	(20.5)
L ^{Phн}	-37.4	-103.5	-5.30	29.6
	(-5.2)	(-11.7)	(-1.56)	(14.6)
EtdL	-44.3	-120.9	-6.78	41.1
	(-12.1)	(-29.1)	(-3.04)	(26.1)
L ^{Etd}	-46.0	-129.0	-6.02	35.8
	(-13.8)	(-37.2)	(-2.28)	(20.8)

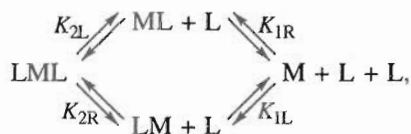
* См. табл. 1.

эффект красителя обусловлен и дополнительным стэкингом с крайней парой оснований дуплекса и взаимодействием с протяженным одноцепочечным фрагментом. Например, при расположении красителя к краю (табл. 1) величины $\Delta\Delta G_{\text{ВН}}(37^\circ\text{C})$ и ΔT_{max} немногим больше аналогичных величин в табл. 2 – в среднем на 0.15 ккал/моль и 1.5°C соответственно. При ориентации красителя к центру тетрадекануклеотида величины $\Delta\Delta G_{\text{ВН}}(37^\circ\text{C})$ и ΔT_{max} превышают соответствующие параметры для короткой матрицы в среднем на 0.65 ккал/моль и 6°C соответственно.

Для 5'Phn-производного стабильность комплексов I и II практически одинакова и ниже стабильности комплекса III. В этом случае стабилизирующий эффект красителя, по-видимому, не достаточен для компенсации дестабилизирующего влияния одноцепочечного фрагмента тетрадекануклеотида.

На втором этапе работы были исследованы “тандемные” комплексы, образованные двумя пентануклеотидами с каждой из матриц M, M₁, M₂ и M₃. Количественную оценку кооперативных свойств данной системы проводили, используя подход Вебера [11], предложенный для описания взаимозависимого связывания двух лигандов с макромолекулой, имеющей два места связывания лиганда.

Рассмотрим на примере комплекса LML равновесие в растворе между всеми олигонуклеотидными компонентами:



где K_{1R} , K_{1L} – равновесные константы присоединения одного пентануклеотида справа или слева; K_{2R} , K_{2L} – равновесные константы присоединения второго пентануклеотида справа или слева. Согласно работе [11], константа кооперативности K_k определяется уравнением

$$K_k = \frac{K_{2L}}{K_{1L}} = \frac{K_{2R}}{K_{1R}} = \frac{[\text{LML}][\text{M}]}{[\text{LM}][\text{ML}]}. \quad (1)$$

Используя уравнения (1 - 5), можно получить выражение (6) для K_k через величины K_{1R} , K_{1L} , $[\text{L}]$.

$$K_{1R} = [\text{ML}]/([\text{M}][\text{L}]), \quad (2)$$

$$K_{1L} = [\text{LM}]/([\text{M}][\text{L}]), \quad (3)$$

$$[\text{M}_0] = [\text{LML}] + [\text{ML}] + [\text{LM}] + [\text{M}], \quad (4)$$

$$[\text{M}_0] = 0.5[\text{L}_0], \quad (5)$$

$$K_k = (0.5[\text{L}_0]/[\text{L}]\{(K_{1L} + K_{1R})[\text{L}] + 2\} - (K_{1L} + K_{1R})[\text{L}] - 1)\{K_{1L}K_{1R}[\text{L}]^2\}^{-1}, \quad (6)$$

где $[\text{M}_0]$, $[\text{L}_0]$ – суммарные концентрации олигонуклеотидов M и L. Константы K_{1R} и K_{1L} , которые

в нашем случае не могут быть получены из экспериментальных данных, рассчитывали по уравнению (8), используя значения $\Delta H_{\text{ВН}}$ и $\Delta S_{\text{ВН}}$ соответствующих комплексов I и II (табл. 1). Расчет основан на допущении, что вследствие одинаковой протяженности и близости первичной последовательности олигонуклеотида M и олигонуклеотидов M_R и M_L их комплексообразующие свойства с одним пентануклеотидом одинаковы. Такое же допущение было сделано и в случае олигонуклеотидов M₁, M₂ и M₃, что, однако, менее корректно и может вносить ошибку в расчеты. Текущую концентрацию пентануклеотидов $[\text{L}]$ в растворе рассчитывали по кривым плавления “тандемных” дуплексов, используя уравнения (7) и (9 - 11) (см. “Экспериментальную часть”):

$$[\text{L}] = [\text{L}_0](1 - F). \quad (7)$$

Для расчета доли дуплексной формы пентануклеотида (F) из кривой плавления необходимо знать параметры a_{ds} , b_{ds} , a_{ss} , b_{ss} данной кривой. Расчет параметров проводили двумя способами: 1) графическим, основанным на аппроксимации начального и конечного участков кривой плавления линейными функциями температуры; 2) расчетным, аналогичным процедуре, описанной для расчета термодинамических параметров левого или правого комплексов, и отличающимся тем, что в процедуру минимизации включали отдельно низко- или высокотемпературный участок, составляющий приблизительно 70% от всей кривой, и описывали его формальными параметрами $\Delta H_{\text{ВН}}$, $\Delta S_{\text{ВН}}$. В результате расчета для низкотемпературного участка получали параметры a_{ds} , b_{ds} , для высокотемпературного – a_{ss} и b_{ss} . Согласно вышеописанной процедуре, были рассчитаны константы кооперативности всех исследованных “тандемных” комплексов в интервале изменения F от 0.95 до 0.05.

Как следует из кривых плавления, представленных на рис. 1, для всех модификаций пентануклеотида максимальную термостабильность проявляет “тандемный” комплекс IV. При увеличении расстояния между местами связывания (т.е. при замене M на M₁, M₂ или M₃) термостабильность “тандема” снижается. Три дополнительных остатка дезоксицитидина, разделяющих эти места на матрице M₃, практически устраняют кооперативные взаимодействия пентануклеотидов в “тандемном” комплексе, т.е. комплексообразование левой и правой частей “тандема” происходит независимо. При этом кривая плавления близка к плавлению комплексов I и II.

Результаты расчетов констант кооперативности K_k представлены графически (рис. 2а, 2б) в виде функции $\ln(K_k) = f(1/T)$. Прежде всего необходимо отметить, что разность величин $\ln(K_k)$ “тандемных” IV и V для всех типов модификации пентануклеотидов составляет 1 - 1.5, что соответствует

величине $\Delta\Delta G$ (37°C) 0.6 - 0.9 ккал/моль. В то же время для немодифицированных пентануклеотидов это изменение в 2.5 раза больше. Данный факт говорит о том, что краситель занимает промежуток между крайними гуанозинами напротив дополнительного “-С-” в дуплексе V и способствует сохранению эффективного стэкинг-взаимодействия, а следовательно, и кооперативных свойств “тандема”.

Графики зависимости $\ln(K_k) = f(1/T)$ (рис. 2) разделены на две группы (а, б). К группе а относятся данные по 5'-производным и немодифицированному пентануклеотиду. Для этих комплексов наблюдается зависимость, близкая к линейной, т.е. описываемая уравнением Вант-Гоффа, что свидетельствует о существовании только одной (или одной преобладающей) конформации “центрального” красителя и ближайших к нему дезоксигуанозинов соседних пентануклеотидов в “тандемах” IV и V. Линейным регрессионным анализом были рассчитаны термодинамические параметры кооперативности в комплексе IV (для сравнения приведены также величины вклада соседних пар -G-G-/-C-C- в термодинамические параметры образования комплексов олигодезоксинуклеотидов [12]):

	немодиф.*			
	-G-G- -C-C-	5'Phn	5'Etd	-G-G- -C-C-
$\Delta H_{\text{вн}}$ (кал/моль)	-13.5 ± 1	-11.7 ± 1	-10.3 ± 1	-11.0
$\Delta S_{\text{вн}}$ (кал/моль/К)	-37.4 ± 2	-30.3 ± 2	-22.5 ± 2	-26.6
$\Delta G_{\text{вн}}(37^\circ\text{C})$ (ккал/моль)	-1.9 ± 0.1	-2.3 ± 0.1	-3.3 ± 0.1	-2.8

* 5'-концевой фосфат не показан.

Сравнение параметров кооперативности для немодифицированных пентануклеотидов с параметрами взаимодействия “ближайших соседей” -G-G-/-C-C- приводит к выводу об образовании полного межплоскостного стэкинга между концевыми дезоксигуанозинами соседних пентануклеотидов, фланкирующими разрыв. Энтальпия кооперативного взаимодействия больше, чем энтальпия взаимодействия “ближайших соседей”. Однако образование кооперативного комплекса сопровождается уменьшением числа открытых концов олигонуклеотидов, что является неблагоприятным энтропийным фактором, в целом отрицательно сказывающимся на изменении свободной энергии кооперативного процесса. В результате кооперативное взаимодействие двух немодифицированных пентануклеотидов в дуплексе IV с образованием нового стэкинга концевых дезоксигуанозинов, ближайших к разрыву, в меньшей степени стабилизирует дуплек-

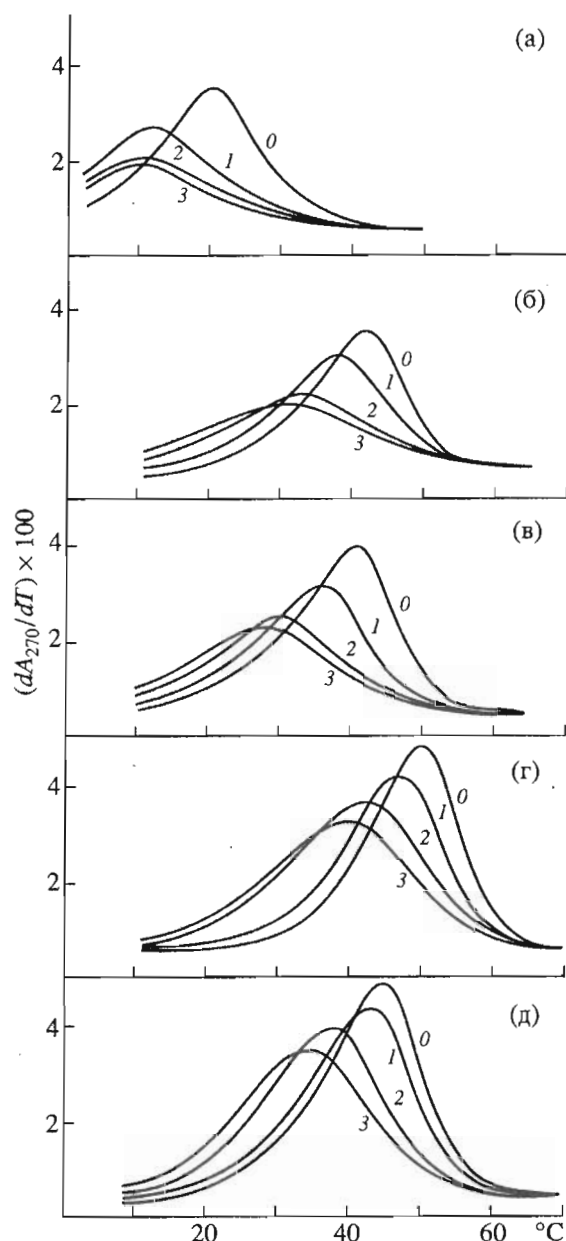


Рис. 1. Дифференциальные кривые плавления “тандемных” комплексов, образованных немодифицированным пентануклеотидом L (а), его 5'Phn-производным PhnL (б), 3'Phn-производным L^{Phn} (в), 5'Etd-производным EtdL (г), 3'Etd-производным L^{Etd} (д) и олигонуклеотидами с двумя комплементарными местами связывания: М (0), М₁ (1), М₂ (2), М₃ (3). (Концентрации олигонуклеотидов и состав буфера см. в “Экспериментальной части”)

сы, составляющие “тандем”, чем удлинение дуплекса на одну G · C-пару с образованием нового -G-G-/-C-C-контакта. Например, константа связывания при 37°C дезоксигексануклеотида рGGAAAG примерно в 4 раза превышает константу связывания пентануклеотида рGAAAG в комплексе IV.

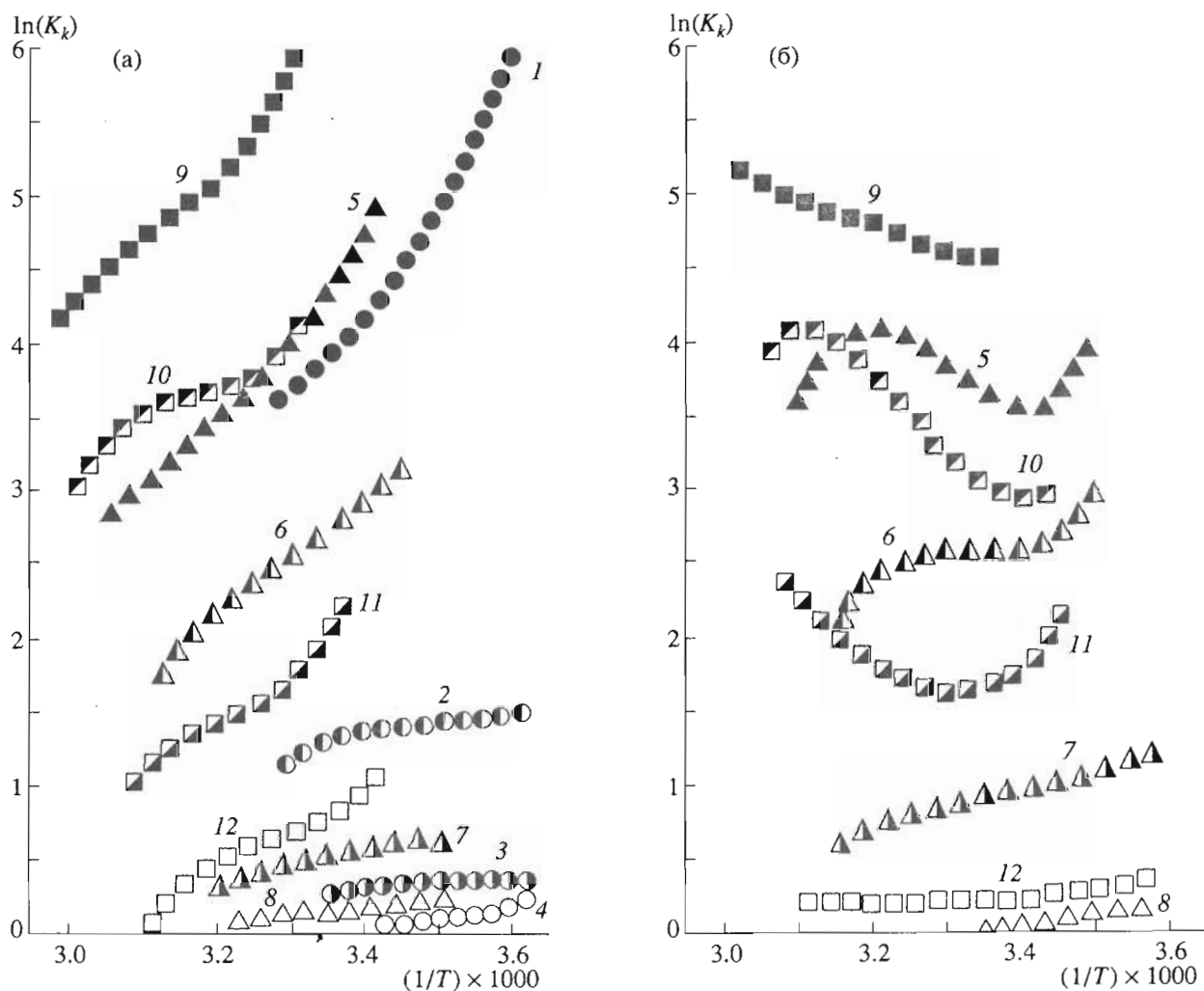


Рис. 2. Графики зависимости логарифма констант кооперативности в "тандемных" комплексах IV - VII от температуры на комплементарных олигонуклеотидах M, M_1, M_2, M_3 соответственно для: а - немодифицированного пентануклеотида L (1 - 4), 5'Phn-производного $PhnL$ (5 - 8), 5'Etd-производного $EtdL$ (9 - 12); б - 3'Phn-производного L^{Phn} (5 - 8), 3'Etd-производного L^{Etd} (9 - 12). (Концентрации олигонуклеотидов и состав буфера см. в "Экспериментальной части".)

В случае 5'Phn-производного энтальпия кооперативности на -6 ккал/моль больше средней величины $\Delta\Delta H_{vH}$ (-4.5 ± 1 ккал/моль) вклада красителя в энтальпию образования комплексов I и II. Кооперативное взаимодействие между 5'Phn и 3'-концевым дезоксигуанозином соседнего пентануклеотида в "тандеме" не может сопровождаться энтальпийным эффектом, более чем в 2 раза превышающим эффект ковалентно присоединенного красителя. Единственным возможным объяснением наблюдаемой разницы может быть конформационная перестройка в области разрыва, связанная с выходом "центрального" красителя из стэкинга (+4.5 ккал/моль) и образованием нового -GG-контакта (-13.5 ккал/моль) по аналогии с дуплексом LML. Феназиний при этом, как показали расчеты [5], может укладываться в большую бороздку дуплексного участка.

5'Etd характеризуется высоким средним вкладом в энтальпию образования комплекса (-13 ± 3 ккал/моль) и энтальпию кооперативности (-10.3 ккал/моль). Из этого следует, что в "тандемном" комплексе этидий не выходит из стэкинга с основаниями дуплекса. В противном случае общий энтальпийный эффект кооперативности с образованием нового -GG-стэкинга приблизился бы к нулю, что противоречит полученному значению. Кроме того, значение ΔG_{vH} кооперативности, характерное для -GG-контакта, намного меньше ($+1.4$ ккал/моль) рассчитанного для 5'Etd-производного. Известные факты повышенной способности свободного этидия интеркалировать в место локальных нарушений двухцепочечной структуры нуклеиновых кислот [13, 14], каковым можно считать разрыв "тандемного" дуплекса, также свидетельствуют в пользу его

расположения между 5'- и 3'-концевыми дезокси-гуанозинами. При этом константа кооперативности возрастает относительно немодифицированного пентануклеотида в 10 раз, а по сравнению с 5'-Phn-производным – в 5 раз.

3'-Производные, относящиеся ко второй группе (рис. 2б), отличаются сложной формой графика $\ln K_k = f(1/T)$. Можно предположить, что подобное поведение отражает изменение конформационного состояния красителя между пентануклеотидами в “тандемном” дуплексе при увеличении температуры, причем “высокотемпературная” конформация обладает более высокой кооперативностью. Для объяснения полученных данных необходимо учесть, что в случае обычного дуплекса стабилизирующий эффект ковалентно присоединенного красителя для 3'-производных заметно меньше, чем для 5'-производных. Таким образом, в “тандеме” вытеснение красителя из стэкинга (особенно 3'-Phn) и образование нового -G G-стэкинга должны происходить с большей вероятностью для 3'- по сравнению с 5'-производными. При увеличении температуры раствора, как следует из графика на рис. 2а, константа кооперативности, определяемая -G G-контактом, быстро уменьшается, отражая увеличение лабильности оснований в области разрыва, при этом гидрофобная полициклическая группировка красителя стремится интеркалировать в дуплекс. В результате интеркаляции, по-видимому, и наблюдается увеличение константы кооперативности с ростом температуры, причем величины K_k для 3'-производных становятся заметно больше, чем в случае 5'-производных. Можно отметить, что подобный процесс наблюдается для “экстра”-оснований одной из цепей олигонуклеотидного дуплекса, встраивающихся в структуру дуплекса при повышении температуры раствора [15, 16].

Результаты данной работы показывают, что ковалентно присоединенный к олигодезоксинуклеотиду интеркалирующий краситель повышает константу комплексобразования с комплементарной последовательностью на величину, эквивалентную удлинению дуплекса на одну - две А · Т- или G · С-пары. Этидий эффективнее стабилизирует дуплексную структуру и способствует повышению кооперативности связывания в “тандемном” комплексе по сравнению с немодифицированным олигодезоксинуклеотидом или его феназиниевым производным. Поэтому этидиевые производные олигонуклеотидов предпочтительнее для высоконаправленного воздействия коротким олигонуклеотидным реагентом на ДНК-мишень. Так, например, при использовании пентануклеотида в качестве адресующего олигонуклеотидного реагента эффективность его комплексобразования с комплементарным участком ДНК-мишени может быть увеличена до уровня декануклеотида. Для этого участок связы-

вания пентануклеотида должен быть “зажат” с двух сторон олигонуклеотидами, несущими в одном случае на 5'-, а в другом на 3'-концах ковалентно присоединенные остатки этидия, направленные в сторону этого участка. В результате селективность связывания пентануклеотида в подобной “тандемной” структуре может превысить 20000, что обеспечивает практически 100% модификацию только заданного участка ДНК-мишени.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез олигонуклеотидов осуществляли несколькими методами. Пуриновый пентануклеотид L получали триэфирным методом в растворе [17], пиримидиновые олигодезоксинуклеотиды m, M_R, M_L, M, M₁, M₂, M₃ – фосфитамидным на автоматическом синтезаторе “Виктория-5М” [18].

5'-Phn-производные синтезировали согласно методике [19], 3'-Phn-производные – по методике [20], 5'Etd- и 3'Etd-производные – аналогично работе [21].

Очистку олигонуклеотидов проводили последовательно методами ионообменной (смола Lichrosorb NH₂ (10 мкм), в 30% ацетонитриле, градиент KН₂PO₄ 0 - 30%) и обращенно-фазовой (смола Nucleosil 10 C18, в 0.05 M LiClO₄, градиент концентрации ацетонитрила 0 - 20%) хроматографии на хроматографической системе Waters 600E с многоволновым детектором Waters 484 (США).

Первичная последовательность всех олигонуклеотидов подтверждена методом Максама-Гилберта [22].

Растворы олигонуклеотидов заданной концентрации в воде готовили разбавлением до определенного оптического поглощения при 260 нм и 20°C. Молярные коэффициенты поглощения рассчитывали по результатам полного фосфодиэстерного гидролиза [23]; получены следующие значения $\epsilon_{260} \times 10^3$ (M⁻¹ см⁻¹): 49.8 (L), 68.8 (m), 106.6 (M), 104.7 (M_R, M_L), 113.6 (M₁), 120.5 (M₂), 127.5 (M₃). Для расчета молярных коэффициентов поглощения производных олигонуклеотида L к соответствующей величине олигонуклеотида (49.8×10^3 (M⁻¹ см⁻¹)) прибавляли 10×10^3 (Phn) и 11.8×10^3 (Etd). Водные растворы смешивали с концентрированным буферным раствором. Конечный состав буферной смеси: 1 M NaCl, 10 mM NaH₂PO₄, 0.1 mM EDTA, pH 7.3. Конечная концентрация олигонуклеотидов в растворе: L, m, M_L, M_R – 5×10^{-5} M; M, M₁, M₂, M₃ – 2.5×10^{-5} M.

Оптические кривые плавления регистрировали на специальной установке, созданной на базе спектрофотометрического УФ-детектора жидкостного хроматографа “Миличром”. Установка имела термостатированную кювету объемом 2 мкл. Температуру кюветы поддерживали за счет прокачивания теплоносителя жидкостным термостатом через кюветодержатель. Температуру измеряли

медь-константановой термопарой, откалиброванной с абсолютной погрешностью $\pm 0.1^\circ\text{C}$ и подключенной к цифровому вольтметру Щ-1516.

Данные накапливали и обрабатывали с помощью ПЭВМ. Каждую экспериментальную точку получали интегрированием сигнала за 10 с. Каждая кривая плавления содержала 500 - 600 точек. Данные сглаживали центральной линейной интерполяцией в интервале 2°C , делали поправку на тепловое расширение воды. Скорость нагрева растворов во всех случаях составляла $0.6 - 0.7^\circ\text{C}/\text{мин}$.

Термодинамические параметры образования комплексов рассчитывали по оптическим кривым плавления в рамках модели "двух состояний" [24]. Величины $\Delta H_{\text{вн}}$ и $\Delta S_{\text{вн}}$ определяли путем минимизации среднеквадратичного отклонения между расчетной и экспериментальной кривыми плавления, используя уравнения

$$K = \frac{2F}{C(1-F)^2} = \exp\left(-\frac{\Delta H_{\text{вн}}}{RT} + \frac{\Delta S_{\text{вн}}}{R}\right), \quad (8)$$

$$F = \frac{A_{ss}(T) - A(T)}{A_{ss}(T) - A_{ds}(T)}, \quad (9)$$

где K – равновесная константа комплексообразования; F – доля двухцепочечной формы олигонуклеотидов в растворе; C – суммарная концентрация олигонуклеотидов; $A_{ss}(T)$ – зависимость оптического поглощения раствора одноцепочечных олигонуклеотидов от температуры; $A_{ds}(T)$ – зависимость оптического поглощения раствора олигонуклеотидов в составе дуплекса от температуры; $A(T)$ – оптическое поглощение раствора олигонуклеотидов при данной температуре.

Изменения величин $A_{ss}(T)$ и $A_{ds}(T)$ при изменении температуры описывали с помощью линейной аппроксимации

$$A_{ss}(T) = a_{ss} + Tb_{ss}, \quad (10)$$

$$A_{ds}(T) = a_{ds} + Tb_{ds}. \quad (11)$$

В процедуре минимизации использовали шесть варьируемых параметров, не зависящих от температуры: $\Delta H_{\text{вн}}$, $\Delta S_{\text{вн}}$, a_{ss} , b_{ss} , a_{ds} , b_{ds} . Минимизировали разницу между расчетной и экспериментальной величинами оптического поглощения в 20 точках, равнолежащих по температуре на кривой плавления комплекса. Во всех случаях средняя относительная разница не превышала 0.02% в каждой точке, максимальная – 0.03%. Конечные значения параметров $\Delta H_{\text{вн}}$, $\Delta S_{\text{вн}}$ для каждого дуплекса получали усреднением результатов процедуры минимизации не менее чем двух параллельных экспериментов, при этом среднее арифметическое отклонение варьируемых параметров составляло не более 3%.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

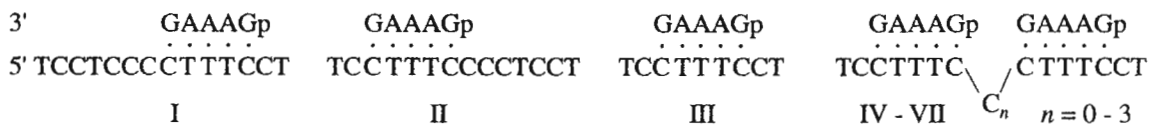
1. Marky L.A., Canuel L., Jones R.A., Breslauer K.J. // *Bio-phys. Chem.* 1981. V. 13. P. 141 - 149.
2. Freier S.M., Burger B.J., Alkema D., Neilson T., Turner D.H. // *Biochemistry.* 1983. V. 22. P. 6198 - 6206.
3. Asseline U., Delarue M., Lancelot G., Toulme F., Thuong N.T., Montenay-Garestier T., Helene C. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1984. V. 81. № 11. P. 3297 - 3301.
4. Lokhov S.G., Podyminogin M.A., Sergeev D.S., Silnikov V.N., Kutyavin I.V., Shishkin G.V., Zarytova V.P. // *Bioconj. Chem.* 1992. V. 3. P. 414 - 419.
5. Биченкова Е.В., Горенштейн Л.А., Воробьев Ю.Н., Тэниэ Е.Ю., Зарытова В.Ф., Иванова Е.М., Мальцева Т.В., Лебедев А.В. // *Биоорган. химия.* 1992. Т. 18. № 7. С. 901 - 910.
6. Абрамова Т.В., Горн В.В., Кутявин И.В., Лебедев А.В., Лохов С.Г., Подыминогин М.А. // *Докл. АН СССР.* 1990. Т. 315. № 6. С. 1485 - 1488.
7. Tazawa I., Tazawa S., Ts'o P.O.P. // *J. Mol. Biol.* 1972. V. 66. P. 115 - 130.
8. Asseline V., Thuong N.T., Helene C. // *J. Biol. Chem.* 1985. V. 260. P. 8936 - 8941.
9. Зарытова В.Ф., Кутявин И.В., Левина А.С., Мамаев С.В. // *Докл. АН СССР.* 1988. Т. 302. С. 102 - 104.
10. Зарытова В.Ф., Кутявин И.В., Мамаев С.В., Подыминогин М.А. // *Биоорган. химия.* 1990. Т. 16. С. 1653 - 1660.
11. Кантор Ч., Шиммель П. *Биофизическая химия.* М.: Мир, 1985. Т. 3. С. 27.
12. Breslauer K.J., Frank R., Blocker H., Marky L.A. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1986. V. 83. P. 3746 - 3750.
13. Nelson J.W., Tinoco I.Jr. // *Biochemistry.* 1985. V. 24. P. 6416 - 6421.
14. Lee C.H., Tinoco I.Jr. // *Nature.* 1978. V. 274. P. 609 - 610.
15. Kalnik M.W., Norman D.G., Zagorski M.G., Swann P.F., Patel D.J. // *Biochemistry.* 1989. V. 28. P. 294 - 303.
16. Le Blanc D.A., Morden K.M. // *Biochemistry.* 1991. V. 30. P. 4042 - 4047.
17. Абрамова Т.В., Мундус Д.А., Перебоева О.С. // VIII Всесоюз. симпоз. по целенаправленному изысканию лекарственных веществ. Рига, 1989. С. 90 - 92.
18. Грязнов С.М., Горн В.В., Зарытова В.Ф., Кумарев В.П., Левина А.С., Полищук А.С., Потапов В.К., Потемкин Г.А., Средин Ю.Г., Шабарова З.А. // *Изв. СО АН СССР. Сер. хим. наук.* 1987. Вып. 1. С. 911 - 920.
19. Зарытова В.Ф., Кутявин И.В., Сильников В.Н., Шишкин Г.В. // *Биоорган. химия.* 1986. Т. 12. № 6. С. 911 - 920.
20. Зарытова В.Ф., Иванова Е.М., Кутявин И.В., Сергеев Д.С., Сильников В.Н., Шишкин Г.В. // *Изв. СО АН СССР. Сер. хим. наук.* 1989. Вып. 6. С. 3 - 9.
21. Кошкин А.А., Иванова Е.М., Бульчев Н.В., Добриков М.И., Лебедев А.В. // *Биоорган. химия.* 1993. Т. 19. № 5. С. 570 - 582.
22. Maxam A.M., Gilbert M. // *Meth. Enzymol.* 1980. V. 65. P. 499 - 560.
23. Shabarova Z.A., Dolinnaya N.G., Drutsa V.L., Melnikova N.P., Purnal A.A. // *Nucl. Acids Res.* 1981. V. 9. P. 5747 - 5761.
24. Petersheim M., Turner D.H. // *Biochemistry.* 1983. V. 22. P. 256 - 263.

Influence of Intercalating Dyes Ethidium and Phenazinium Covalently Linked to 5'- or 3'-End of Pentanucleotide d(pGAAAG) on Thermodynamics of Complementary and Cooperative Interactions

S. G. Lokhov, A. A. Koshkin, I. V. Kutyavin, M. P. Mityakin,
M. A. Podyminogin, and A. V. Lebedev

*Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division, Russian Academy of Sciences,
pr. Akademika Lavrent'eva 8, Novosibirsk, 630090 Russia*

Abstract – Thermal stability was studied and thermodynamic parameters of complex formation were calculated for pentanucleotide complexes



and corresponding complexes of pentanucleotide derivatives carrying at their 5'- or 3'-ends covalently bound residues of intercalating dyes: N-(2-hydroxyethyl)-phenazine (Phn) or 2-N-(3-aminopropionyl)-ethidium. Pentanucleotide derivatives were shown to form more stable complementary complexes. The best stabilizing effect was observed when the dye was oriented towards the long single-stranded fragment of tetradecanucleotide, melting temperature of the complexes being by 22.5 (Phn) and 31.2°C (Etd) greater than that of unmodified complexes in the case of 5'-derivatives and by 21.6 (Phn) and 27.2°C (Etd) for 3'-derivatives. Cooperativity constant of pentanucleotide derivatives in "tandem" complexes IV - VII was higher than that of unmodified pentanucleotide. For complex IV at 37°C the constant values were 33 (unmodified), 35 (5'Phn), 57 (3'Phn), 190 (5'Etd), 100 (3'Etd). With $n = 3$ in complex VII cooperativity constants approached 1 in any case.

Key words: oligonucleotides, modification; duplexes, thermostability, thermodynamics; cooperativity; intercalator; ethidium; phenazinium.