



УДК 577.113.6.088.53:543.422.25

## ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРЫ АЗИНОВ, ПРИСОЕДИНЕННЫХ К 5'-КОНЦЕВОМУ ФОСФАТУ ОЛИГОНУКЛЕОТИДА, НА ТЕРМОДИНАМИКУ ОБРАЗОВАНИЯ КОМПЛЕМЕНТАРНЫХ КОМПЛЕКСОВ

© 1999 г. Д. В. Пышный, С. Г. Лохов, В. Н. Сильников,  
Г. В. Шишкин, Е. М. Иванова<sup>#</sup>, В. Ф. Зарытова

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

Поступила в редакцию 19.01.98 г. Принята к печати 25.08.98 г.

Исследовано влияние структуры ряда красителей (D) на основе феназина или акридина на стабильность комплементарного комплекса (5')pTGTTTGGC · (5')(DL)pCCAAACA (L – линкер). Определены термодинамические параметры образования комплексов. Показано, что исследуемые красители, стабилизирующие комплекс в результате стэкинг-взаимодействия с концевым участком дуплексной структуры, оказывают влияние как на электростатическую, так и на неэлектростатическую составляющую свободной энергии комплексообразования. Электростатическая стабилизация достигается при наличии в остатке красителя положительного заряда, причем заряд, локализованный на его экзоциклических заместителях, оказывает большее влияние. Неэлектростатическая стабилизация внутри красителей одного класса возрастает с увеличением общей электронной плотности ароматической системы азина.

*Ключевые слова:* олигонуклеотиды; конъюгаты; комплексообразование, термодинамические параметры; интеркаляторы; азины.

В последние годы для эффективного воздействия на нуклеиновые кислоты все чаще используются конъюгаты олигонуклеотидов и полициклических соединений, повышающих термостабильность комплементарных комплексов олигонуклеотидов с НК [1]. Группировки, усиливающие комплексообразующую способность олигонуклеотидов, по способу их действия можно условно разделить на два типа. Соединения первого типа (например, нетропсин) стабилизируют комплементарные комплексы путем специфического связывания в малой бороздке двойной спирали [2]. Действие соединений второго типа, менее специфичное, основано на их интеркаляции в двойную спираль. Стабилизация олигонуклеотидных комплексов в этом случае обусловлена возникновением дополнительного стэкинг-взаимодействия оснований олигонуклеотидных цепей с остатками введенных красителей (например, таких как акридин [3], этидий [4], фагаронин [5], бензокумарин [6] и т.д.). Аналогичное действие на стабильность комплексов оказывает и введенный в олигонуклеотид остаток N-(2-гидроксиэтил)фена-

зина (Phn) [7]. Исследование структуры комплекса (5')pTGTTTGGC · (5')(PhnL)pCCAAACA (L – линкер) методом ЯМР высокого разрешения показало, что остаток красителя локализован между концевой парой оснований дуплекса и нависающим неспаренным основанием мишени [8, 9].

Способность соединений интеркалировать в двуспиральные нуклеиновые кислоты определяется особенностями их структуры: типом ароматической системы, природой экзоциклических заместителей, наличием заряда [1, 10].

В данной работе на примере производных олигонуклеотидов, содержащих азиновые красители, проведена оценка влияния элементов структуры азинов на термодинамические параметры образования комплементарных олигонуклеотидных комплексов. Показано, что стабилизирующие свойства азинов увеличиваются с ростом электронодонорности их ароматической π-системы и с введением в них экзоциклических заместителей, несущих положительный заряд.

Структуры использованных красителей приведены на схеме 1.

**Синтез производных олигонуклеотидов.** Синтез соединений PhzL, PhoL, Pht, PhL, Phn и PhnL проводили по описанным ранее методикам [11–14].

Сокращения: НК – нуклеиновые кислоты; префикс “d” в аббревиатуре олигодезоксирибонуклеотидов опущен.

<sup>#</sup> Автор для переписки (факс: (383-2) 35-16-65); e-mail: physhnyi@niboch.nsc.ru.

Неописанные ранее производные четвертичных солей бенз[а]феназина (Phn<sub>1</sub>L, Phn<sub>2</sub>L, Phn<sub>3</sub>L) синтезировали из 7-(2-гидроксиэтил)- и 12-(2-гидроксиэтил)бенз[а]феназинийхлоридов (схема 2).

Последние были получены по методике работы [15] оксиэтированием бенз[а]феназина и конденсацией 1,2-нафтохинона с N-(2-гидроксиэтил)фенилендиамином соответственно.

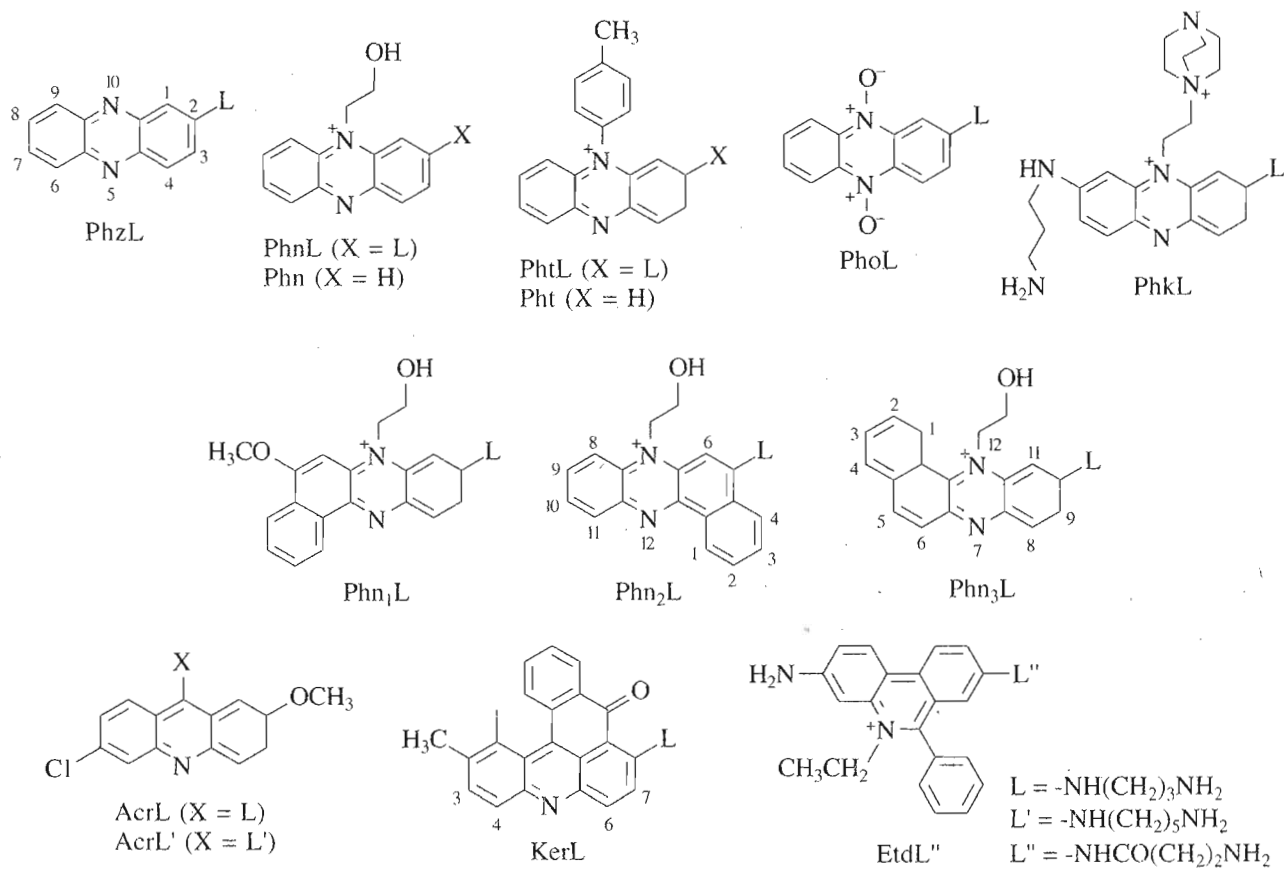


Схема 1.

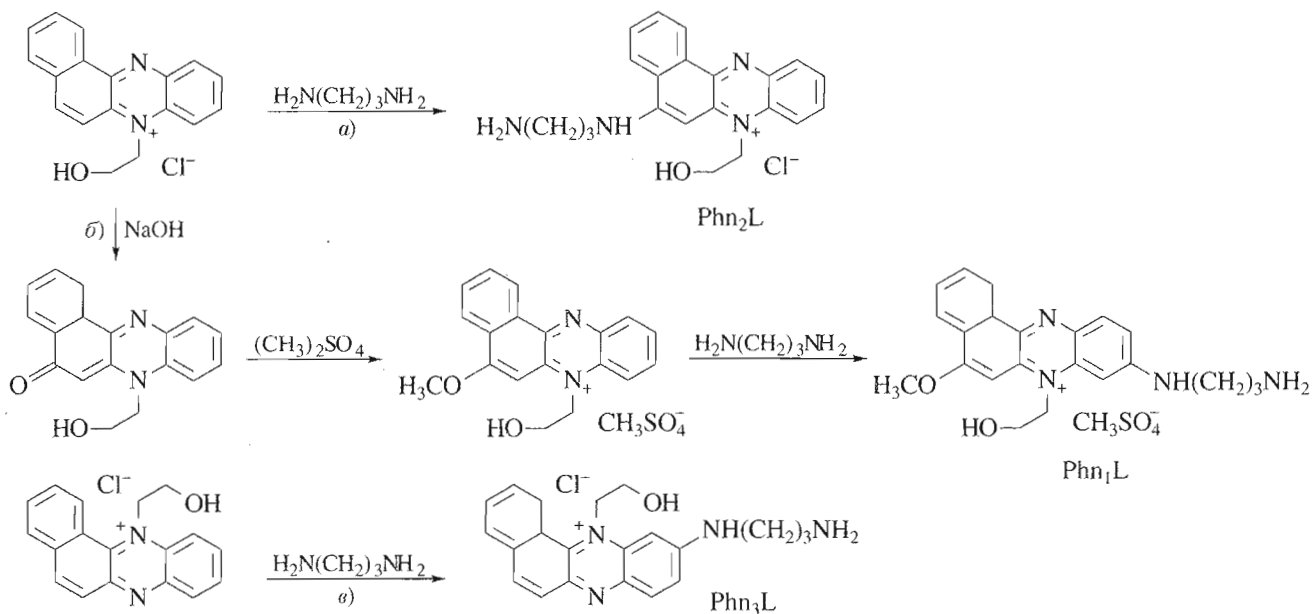


Схема 2.

**Таблица 1.** Спектральные характеристики красителей DL и величины зарядов их  $\pi$ -систем

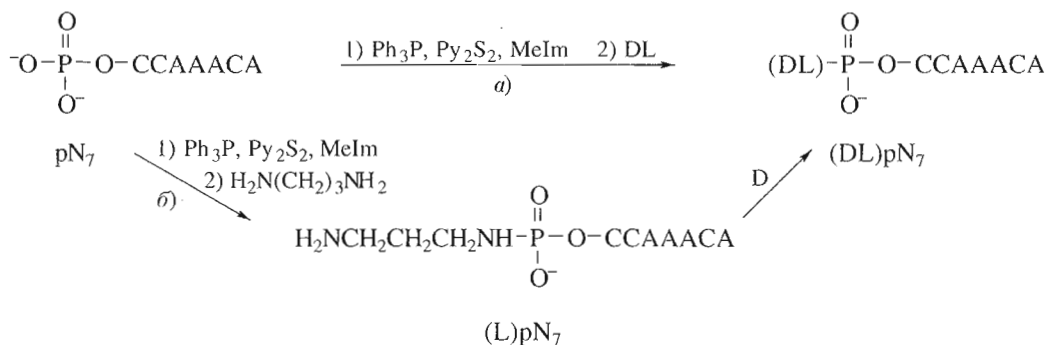
DL	$\lambda_{\max}$ , нм, ( $\epsilon$ , $\text{мМ}^{-1} \text{см}^{-1}$ )	$\epsilon_{260}$ , $\text{мМ}^{-1} \text{см}^{-1}$	$\pi$ -заряд
PhzL	233 (36.6), 282 (47.7), 364 (6.6), 478 (10.5)	20.8	-0.999
PhoL	202 (10.8), 294 (34.6), 396 (6.8), 418 (12.4), 546 (4.5)	8.7	0.214
PhtL	235 (32.3), 285 (34.3), 385 (9.2), 521 (17.5)	15.2	-0.274
PhnL	235 (31.1), 289 (34.3), 393 (11.1), 525 (14.8)	12.4	-0.332
Phn <sub>2</sub> L	202 (24.0), 229 (22.9), 275 (16.3), 318 (19.7), 387 (6.0), 492 (14.0)	12.5	-0.539
Phn <sub>3</sub> L	202 (17.4), 252 (16.6), 333 (16.7), 401 (4.2), 568 (9.9)	12.1	-0.574
Phn <sub>1</sub> L	201 (17.9), 230 (16.7), 274 (11.9), 320 (13.1), 390 (4.6), 494 (9.6)	11.5	-0.421
PhkL	235 (5.3), 270 (12.8), 540 (15.6)	10.1	-0.635
Acr	220 (18.0), 278 (45.6), 343 (4.8), 421 (7.8), 442 (7.1)	28.8	-0.332
KerL	202 (22.9), 242 (16.5), 257 (19.0), 277 (20.8), 370 (5.0), 413 (7.4), 470 (2.9), 500 (5.1), 536 (5.1)	18.8	-0.920

Красители присоединяли с помощью аминлинкера к 5'-концевому фосфату гептануклеотида рССАААСА. Синтез конъюгатов проводили в двух вариантах (схема 3) по методам [7, 16].

Структуру полученных олигонуклеотидных конъюгатов подтверждали кислотным гидролизом фосфамидной связи, приводящим к образованию исходного гептануклеотида [17], и сравнением спектров электронного поглощения в видимом диапазоне свободных красителей DL и их олиго-

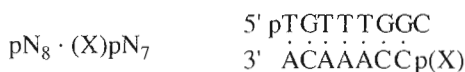
нуклеотидных производных (DL)pN<sub>7</sub> (табл. 1 и 2). Регистрируемый батохромный сдвиг в видимой области соответствующих полос поглощения остатков красителя может быть обусловлен снижением полярности его локального окружения в структуре олигонуклеотидного производного [18].

Дополнительным доказательством структуры олигонуклеотидных производных является также увеличение по сравнению с нативным гептануклеотидом времени их удерживания на колонке с



a) DL = PhzL, PhoL, PhkL, Phn<sub>1</sub>L, Phn<sub>2</sub>L, Phn<sub>3</sub>L, AcrL, AcrL', KerL; CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sub>2</sub> (Bt)

b) D = Phn, Pht

**Схема 3.**

X = OH (I), NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub> (Bt) (II), NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sub>2</sub> (L) (III)

X = DL: PhzL (IV), PhoL (V), PhkL (VI), PhtL (VII), PhnL (VIII), Phn<sub>1</sub>L (IX), Phn<sub>2</sub>L (X), Phn<sub>3</sub>L (XI), AcrL (XII), AcrL' (XIII), KerL (XIV), EtdL" (XV), pG (XVI)

**Схема 4.**

**Таблица 2.** Времена удерживания гептануклеотида pN<sub>7</sub> и его производных (DL)pN<sub>7</sub> на обращенной фазе и спектральные характеристики

(X)pN <sub>7</sub>	t <sub>уд</sub> , мин	ε <sub>260</sub> , мМ <sup>-1</sup> см <sup>-1</sup>	λ <sub>max</sub> , нм, (ε, мМ <sup>-1</sup> см <sup>-1</sup> )
pN <sub>7</sub>	14.7	66.0	258 (66.3)
(PhzL)pN <sub>7</sub>	28.8	86.8	234 (70.1), 268 (88.0), 375 (6.6), 482 (10.5)
(PhoL)pN <sub>7</sub>	19.4	74.7	260 (74.7), 297 (35.2), 400 (6.8), 424 (12.4), 560 (4.5)
(PhlL)pN <sub>7</sub>	24.6	81.2	237 (70.4), 260 (81.2), 395 (9.2), 530 (17.5)
(PhnL)pN <sub>7</sub>	18.5	78.4	235 (69.7), 260 (78.4), 395 (11.1), 530 (14.8)
(Phn <sub>2</sub> L)pN <sub>7</sub>	22.2	78.5	260 (78.5), 324 (19.7), 392 (6.0), 500 (14.0)
(Phn <sub>3</sub> L)pN <sub>7</sub>	21.1	78.1	256 (78.9), 335 (16.7), 408 (4.2), 585 (9.9)
(Phn <sub>1</sub> )pN <sub>7</sub>	22.2	77.5	260 (77.5), 325 (13.1), 395 (4.6), 501 (9.6)
(PhkL)pN <sub>7</sub>	19.5	76.1	265 (80.0), 558 (16.0)
(AcrL)pN <sub>7</sub>	24.7	94.8	264 (95.0), 347(5.0), 428 (8.0), 453 (7.5)
(Acr'L)pN <sub>7</sub>	28.4	94.8	264 (95.0), 347(5.0), 428 (8.0), 453 (7.5)
(KerL)pN <sub>7</sub>	39.5	84.8	259 (84.9), 372 (2.3), 415 (7.0), 472 (3.0), 502 (5.0), 539 (7.1)

обращенной фазой, характеризующее повышение его гидрофобных свойств (табл. 2).

#### Определение термодинамических параметров.

Влияние структуры остатков красителей D на гибридизационную способность олигонуклеотидных производных исследовали на примере образования дуплексов (5')pTGTTTGGC · (5')(DL)pССАААСА (схема 4).

Исследование термостабильности комплексов pN<sub>8</sub> · (X)pN<sub>7</sub> проводили методом термической денатурации. Эффективность комплексообразования олигонуклеотидов и их производных при данной ионной силе *a* характеризуется величиной равновесной константы комплексообразования ( $K_p^a$ ) и описывается уравнением (1), на основании кото-

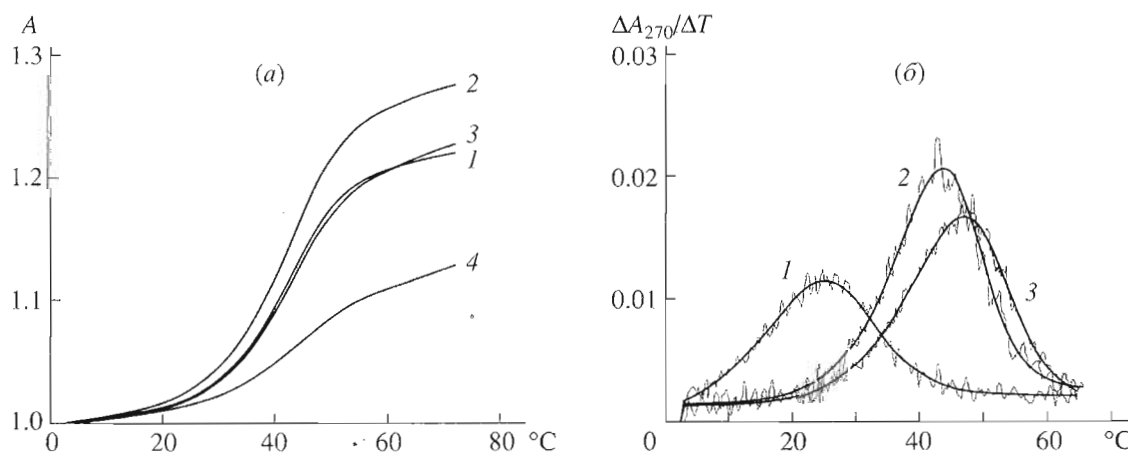
рого температура плавления комплекса ( $T_{пл}$ , К) может быть представлена в виде уравнения (2):

$$K_p^a = \frac{[pN_8 \cdot (X)pN_7]}{[pN_8][XpN_7]} = \exp\left\{\frac{-\Delta G_a^0}{RT}\right\}, \quad (1)$$

где  $\Delta G_a^0 = \Delta H_a^0 - T\Delta S_a^0$ ,

$$T_{пл} = \frac{\Delta H_a^0}{\Delta S_a^0 + R \ln(C_T/4)}. \quad (2)$$

Термодинамические параметры образования комплексов pN<sub>8</sub> · (PhzL)pN<sub>7</sub> (IV) и pN<sub>8</sub> · (PhnL)pN<sub>7</sub> (VIII) определяли двумя способами: 1) концентрационным методом из обратной зависимости температуры плавления комплексов ( $1/T_{пл}$ ) от сум-



**Рис. 1.** а) Нормированные (2°C) интегральные кривые плавления комплекса pN<sub>8</sub> · (PhnL)pN<sub>7</sub>, записанные при длинах волн: 260 (1), 270 (2), 280 (3) и 300 нм (4). б) Первые производные расчетных и экспериментальных кривых плавления комплексов pN<sub>8</sub> · pN<sub>7</sub> (1), pN<sub>8</sub> · (PhzL)pN<sub>7</sub> (IV) (2), pN<sub>8</sub> · (PhkL)pN<sub>7</sub> (VI) (3).

**Таблица 3.** Термодинамические параметры образования комплексов  $pN_8 \times (PhnL)pN_7$  и  $pN_8 \times (PhzL)pN_7$ , определенные методом оптимизации кривых плавления, записанных на разных длинах волн ( $C_T = 32$  мкМ, 0.16 М NaCl, 10 мМ  $Na_2HPO_4$ , 1 мМ  $Na_2EDTA$ , pH 7.0)

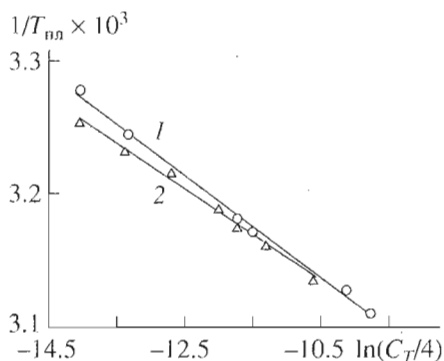
Параметры	Комплекс									
	$pN_8 \times (PhnL)pN_7$					$pN_8 \times (PhzL)pN_7$				
$\lambda$ , нм	260	270	280	$\Sigma^*$	Среднее значение	260	270	280	$\Sigma^*$	Среднее значение
$\Delta S_a^0$ , кал/моль	-147.3	-146.7	-146.5	-146.9	<b>-146.9</b>	-172.7	-172.1	-168.3	-167.8	<b>-170.2</b>
$\Delta H_a^0$ , ккал/моль	-53.6	-53.5	-53.4	-53.5	<b>-53.5</b>	-61.7	-61.5	-60.4	-60.1	<b>-60.9</b>
$A_d$	1.46	1.24	1.01	1.02		1.1	1.42	1.21	1.04	
$B_d \times 10^4$	7.58	10.0	6.57	6.71		0.11	9.44	8.26	3.97	
$A_s$	1.48	1.23	0.79	0.95		1.01	1.27	0.95	0.86	
$B_s \times 10^4$	16.4	20.3	19.5	15.7		7.98	25.7	23.7	15.44	
$\overline{\Delta A}^2 \times 10^7$	1.6	1.6	1.1	1.0		3.0	5.1	3.0	1.6	
$T_{пл}$	41.2	41.2	41.2	41.2	<b>41.2</b>	41.6	41.7	41.7	41.6	<b>41.7</b>
$\Delta G_a^0$ , ккал/моль	-7.94	-7.95	-7.95	-7.94	<b>-7.95</b>	-8.14	-8.16	-8.14	-8.11	<b>-8.14</b>

\* Для расчетной кривой плавления, полученной при усреднении экспериментальных кривых.

марной концентрации олигонуклеотидных компонентов ( $C_T$ ) ( $1/T_{пл}$  от  $\ln(C_T/4)$ ) [19] и 2) методом оптимизации, используя приближение модели двух состояний [20, 21]. Регистрацию оптического поглощения при денатурации комплексов проводили одновременно на нескольких длинах волн в интервале от 240 до 360 нм. Это позволило использовать широкий диапазон суммарной концентрации компонентов от  $3 \times 10^{-6}$  до  $2 \times 10^{-4}$  М. Для кривых плавления комплекса, записанных на нескольких длинах волн (например, рис. 1а), а также для кривой  $\Sigma$ , полученной при усреднении всех экспериментально зарегистрированных точек, проводился независимый поиск шести пара-

метров оптимизации  $\Delta H_a^0$ ,  $\Delta S_a^0$ ,  $A_s$ ,  $A_d$ ,  $B_s$  и  $B_d$  [21] (табл. 3) (см. эксперимент. часть).

Для комплексов  $pN_8 \cdot (PhzL)pN_7$  (IV) и  $pN_8 \cdot (PhnL)pN_7$  (VIII) наблюдалась линейная зависимость величин  $1/T_{пл}$  от  $\ln(C_T/4)$  (рис. 2), а также хорошее совпадение значений  $\Delta H_a^0$  и  $\Delta S_a^0$  ( $a - [Na^+]$ , равная 182 мМ), полученных на разных длинах волн (табл. 3). Кроме того, усредненные значения  $\Delta H_a^0$  и  $\Delta S_a^0$  образования этих комплексов, полученные методом оптимизации кривых плавления, записанных на разных длинах волн, хорошо совпадали со значениями, полученными концентрационным методом из зависимости  $1/T_{пл}$  от  $\ln(C_T/4)$  (отклонение не более чем на 6%) (в табл. 4 приведены термодинамические параметры образования комплекса  $pN_8 \cdot (PhnL)pN_7$  (VIII), определенные двумя методами). Эти данные свидетельствуют о применимости приближения двух состояний для описания процесса комплексообразования  $pN_8$  и  $(X)pN_7$ . Поэтому параметры образования остальных комплексов  $pN_8 \cdot (X)pN_7$  определяли методом оптимизации кривых плавления, записанных в многоволновом режиме при одной концентрации олигонуклеотидных компонентов. Во всех случаях рассчитанные параметры с высокой точностью описывают набор экспериментальных значений оптического поглощения во всем диапазоне температур, как это видно при сравнении первых производных наблюдаемых и расчетных кривых плавления комплексов (I), (IV)



**Рис. 2.** Зависимость обратной величины температуры плавления ( $1/K$ ) от логарифма суммарной концентрации олигонуклеотидных компонентов для комплексов  $pN_8 \cdot (PhnL)pN_7$  (VIII) (1) и  $pN_8 \cdot (PhzL)pN_7$  (IV) (2).

**Таблица 4.** Термодинамические параметры образования комплекса  $pN_8 \times (PhnL)pN_7$  (VIII), определенные концентрационным методом и методом оптимизации (условия см. табл. 3)

Характеристики	Метод							концентрационный
	оптимизации кривых плавления						среднее значение	
$C_T$ , мкМ	224	160	40	32	6.4	3.2		
$\lambda$ , нм	310	300	280	270	260	260		
Гипохромный эффект, % (2–70°C)	15	18	24	29	22	21		
$\Delta S_a^0$	-144.1	-149.0	-150.3	-146.7	-140.6	-145.4	<b>-146.0</b>	<b>-142.4</b>
$\Delta H_a^0$	-52.57	-54.05	-54.60	-53.46	-51.49	-52.86	<b>-53.17</b>	<b>-52.03</b>
$T_{пл}$ , °C	48.2	46.4	42.1	41.2	35.0	31.9		

и (VI) (рис. 1б). Величины температур плавления и изменения свободной энергии  $\Delta G_a^0$  (37°C) (ккал/моль) при образовании комплексов рассчитывали на основании усредненных значений  $\Delta H_a^0$  и  $\Delta S_a^0$  (табл. 5,  $a - [Na^+]$ , равная 182 мМ).

Изменение свободной энергии системы при образовании комплексов  $pN_8 \cdot (X)pN_7$  можно представить в виде:

$$\Delta G_a^0 = \Delta G_{ак}^0 + \Delta \Delta G_a^0 \quad (3)$$

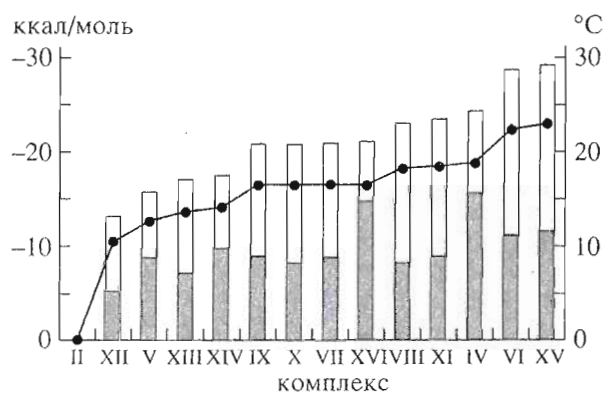
где  $\Delta G_{ак}^0$  – изменение свободной энергии при образовании дуплексной структуры без участия остатка красителя, а величина  $\Delta \Delta G_a^0$  определяет энергетический вклад взаимодействия остатка красителя с элементами дуплекса при данной ионной силе  $a$ .

Величины  $\Delta \Delta G_a^0$ , отражающие взаимодействие остатков красителей с дуплексным участком, можно оценить, если за  $\Delta G_{ак}^0$  принять изменение свободной энергии при образовании комплекса сравнения  $pN_8 \cdot (Bt)pN_7$  (II), также содержащего 5'-фосфамидную группу. Это представляется правомерным на основании того, что остаток красителя в составе производного (DL) $pN_7$  не структурирует его одноцепочечное состояние (образование термодинамически устойчивого состояния конъюгата (DL) $pN_7$  зарегистрировать не удастся), и, взаимодействуя с концевым участком дуплекса, не влияет на его общую структуру, как это было показано для комплекса  $pN_8 \cdot (PhnL)pN_7$  [8, 9].

Если введение в гептануклеотид аминоклипера (L) или бутиламина (Bt) практически не сказывается на параметрах комплексообразования, то наличие остатка красителя (D), присоединенного через

аминолинкер к 5'-концевому фосфату гептануклеотида (IV)–(XV), во всех случаях приводит к повышению термостабильности его комплементарных комплексов (табл. 5). Возрастание абсолютных значений энтальпии образования комплексов  $pN_8 \cdot (DL)pN_7$  свидетельствует о возникновении на конце дуплексной структуры дополнительного стэкинг-взаимодействия между нуклеотидными основаниями и остатком красителя.

Как видно из рис. 3, стабилизирующий эффект остатка красителя (D) в зависимости от его структуры обусловлен либо большим изменением энтальпии образования комплекса  $pN_8 \cdot (DL)pN_7$  относительно  $pN_8 \cdot (Bt)pN_7$  ( $\Delta \Delta H_a^0$ ), либо большим возрастанием величины отношения энтальпии и энтропии комплексообразования ( $\Delta H_a^0 / \Delta S_a^0$ ). Например, при введении в структуру гептануклеотида остатков акридина, феназина и этидия – пред-



**Рис. 3.** Изменение температур плавления комплексов  $pN_8 \cdot (DL)pN_7$  (линия), энтальпии комплексообразования (заштрихованный столбик) и величин  $dH^0/dS_a^0$  (незаштрихованный столбик) относительно контрольного комплекса  $pN_8 \cdot (Bt)pN_7$  (II).

**Таблица 5.** Термодинамические параметры образования комплексов  $pN_8$  с  $(X)pN_7$  при разных X и их температуры плавления (условия см. табл. 3). X\* – см. табл. 7

Номер комплекса	X	$\Delta H_a^0$ , ккал/моль	$\Delta S_a^0$ , кал/моль	$\Delta G_a^0$ , ккал/моль	$T_{пл}$ , °C
I	–	–45.1	–128.8	–5.1	23.2
II	Bt	–45.3	–129.7	–5.1	22.9
III	L	–45.0	–128.1	–5.2	23.8
IV	PhzL	–60.9	–170.2	–8.1	41.7
V	PhoL	–54.1	–151.8	–7.0	35.6
VI	PhkL	–56.4	–153.9	–8.7	45.3
VII	PhtL	–54.1	–149.7	–7.7	39.5
VIII	PhnL	–53.6	–147.3	–7.9	41.2
IX	Phn <sub>1</sub> L	–54.2	–150.0	–7.6	39.4
X	Phn <sub>2</sub> L	–53.4	–147.4	–7.6	39.4
XI	Phn <sub>3</sub> L	–54.2	–149.0	–8.0	41.4
XII	AcrL	–50.6	–141.7	–6.7	33.5
XIII	AcrL'	–52.4	–145.7	–7.2	36.6
XIV	KerL	–55.0	–154.1	–7.2	37.0
XV	EtdL	–56.9	–155.1	–8.8	45.9
XVI	pG	–60.1	–169.0	–7.7	39.5

\* Формулы соединений см. схему 1; Bt – бутиламин.

ставителей разных классов трициклических ароматических красителей, повышение значения  $T_{пл}$  комплексов (XII), (IV) и (XV) происходит в ряду AcrL < PhzL < EtdL". Абсолютная величина энтальпии образования этих же комплексов в зависимости от красителя возрастает в ряду AcrL < EtdL" < PhzL. Максимальная термостабильность комплекса (XV) с участием остатка этидия является результатом более выгодного соотношения величин изменения энтальпии и энтропии комплексообразования  $\Delta H_a^0/\Delta S_a^0$ , что достигается, по-видимому, благодаря наличию в структуре этидия положительного заряда. В то же время наличие положительного заряда на остатке акридина, протонированного по гетероциклическому атому азота при нейтральных pH [3], в сочетании с минимальным приростом энтальпии является недостаточным для эффективной стабилизации комплекса  $pN_8 \cdot (AcrL)pN_7$  (XII). Увеличение длины олигометиленового линкера, соединяющего остаток акридина с гептануклеотидом, благоприятно сказывается на стабилизирующем эффекте этого красителя (комплекс (XIII)), что согласуется с литературными данными [3].

Влияние остатков азинов на стабильность комплекса сравнимо с эффектом, вызванным удлинением гептануклеотида на одно звено pG, а в случае красителей PhzL, PhkL, PhnL и Phn<sub>3</sub>L даже превышает его (табл. 5). Стабилизация комплекса  $pN_8 \cdot pGpN_7$  (XVI) вызвана возникновением эф-

фективного стэкинг-взаимодействия пар оснований в динуклеотидном участке GC/GC октануклеотидного комплекса [22], что выражается в виде резкого возрастания абсолютного значения энтальпии комплексообразования (равного по величине энтальпии образования комплекса  $pN_8 \cdot (PhzL)pN_7$  (IV)) при низком соотношении величин  $\Delta H_a^0/\Delta S_a^0$  (рис. 3).

Таким образом, различие в структуре красителей, введенных в олигонуклеотид и стабилизирующих комплементарные комплексы последнего, сказывается в изменении термодинамических параметров комплексообразования, по-разному проявляясь в величинах  $\Delta H_a^0$  и  $\Delta S_a^0$ , что может быть обусловлено реализацией различных типов взаимодействий (электростатических и неэлектростатических) остатка красителя с элементами дуплексной структуры и их относительной эффективности.

**Влияние ионной силы на термостабильность комплексов.** Поскольку исследуемые красители являются как нейтральными соединениями (Phz, Pho и Ker), так и катионами (Acr, Phn, Phk, Etd и др.), введение их в гептануклеотид должно отражаться в различии влияния ионной силы раствора на эффективность образования комплексов  $pN_8 \cdot (X)pN_7$ .

Исследование влияния ионной силы раствора на термостабильность комплексов (I)–(XIV) про-

**Таблица 6.** Термодинамические характеристики образования комплексов  $pN_8 \times (PhnL)pN_7$  и  $pN_8 \times (PhzL)pN_7$  в растворах с различной ионной силой ( $C_T = 20$  мкМ)

Комплекс	Параметр	[Na <sup>+</sup> ], М				Среднее значение
		0.022	0.072	0.182	1.022	
$pN_8 \times (PhnL)pN_7$ (VIII)	$\Delta S_a^0$ , ккал/моль	-144.0	-146.5	-147.3	-140.7	-52.2
	$\Delta H_a^0$ , ккал/моль	-50.6	-52.5	-53.6	-52.4	
	$T_{пл}$ , °С	27.7	34.3	39.4	44.2	
	гипохромный эффект, % (260 нм)	20	20	21	22	
	$\Delta n$ , (моль Na <sup>+</sup> /моль дуплекса)	1.51	1.57	1.60	-	
$pN_8 \times (PhzL)pN_7$ (IV)	$\Delta S_a^0$ , ккал/моль	-172.2	-171.2	-170.2	-166.9	-60.2
	$\Delta H_a^0$ , ккал/моль	-59.3	-60.4	-60.9	-60.9	
	$T_{пл}$ , °С	28.5	35.6	40.2	45.6	
	гипохромный эффект, % (260 нм)	21	21	21	22	
	$\Delta n$ , (моль Na <sup>+</sup> /моль дуплекса)	1.75	1.78	1.79	-	

**Таблица 7.** Расчетные термодинамические характеристики образования комплексов  $pN_8 \times (X)pN_7$  (величины  $\Delta G^0$ , ккал/моль, рассчитаны для 0.16 М NaCl)

Номер комплекса	X	$dT_{пл}/d\lg[Na^+]$	$\Delta n$	$\Delta G_e^0$	$\Delta G_{nc}^0$	$\Delta G_{\Sigma}^0$
I	-	17.1	1.93	2.02	-7.35	-5.32
II	Bt	14.7	1.72	1.81	-6.95	-5.14
III	L	13.7	1.62	1.72	-7.02	-5.30
IV	PhzL	12.7	1.77	1.86	-10.04	-8.18
V	PhoL	14.8	1.87	1.96	-9.04	-7.08
VI	PhkL	8.5	1.08	1.13	-9.85	-8.72
VII	PhtL	12.5	1.59	1.67	-9.30	-7.63
VIII	PhnL	12.8	1.56	1.64	-9.58	-7.94
IX	Phn <sub>1</sub> L	12.9	1.60	1.68	-9.33	-7.65
X	Phn <sub>2</sub> L	13.6	1.67	1.76	-9.43	-7.67
XI	Phn <sub>3</sub> L	13.4	1.66	1.74	-9.77	-8.03
XII	AcrL	9.8	1.21	1.27	-7.99	-6.71
XIII	AcrL'	10.0	1.24	1.30	-8.48	-7.18
XIV	KerL	14.0	1.80	1.89	-9.13	-7.25

водили при изменении концентрации ионов натрия от 0.022 до 1.022 М.

Концентрация катионов натрия не оказывает существенного влияния на величину энтальпии комплексообразования (табл. 6), что согласуется с ранее полученными данными для нативных олигонуклеотидных комплексов [23] (поэтому в дальнейшем принимали  $\Delta H_a^0 = \Delta H^0$ ). Величина гипохромного эффекта в спектральном диапазоне регистрации плавления дуплексной структуры, в

том числе и на длине волны, на которой регистрируется изменение спектральных свойств красителя при диссоциации комплекса, также оказывается не зависящей от ионной силы буфера (табл. 6). Совокупность этих данных позволяет заключить, что ионная сила раствора влияет только на равновесное распределение одноцепочечной и дуплексной форм при комплексообразовании и не оказывает существенного влияния на структуру комплекса.

Во всех случаях снижение ионной силы раствора приводит к падению термостабильности ис-



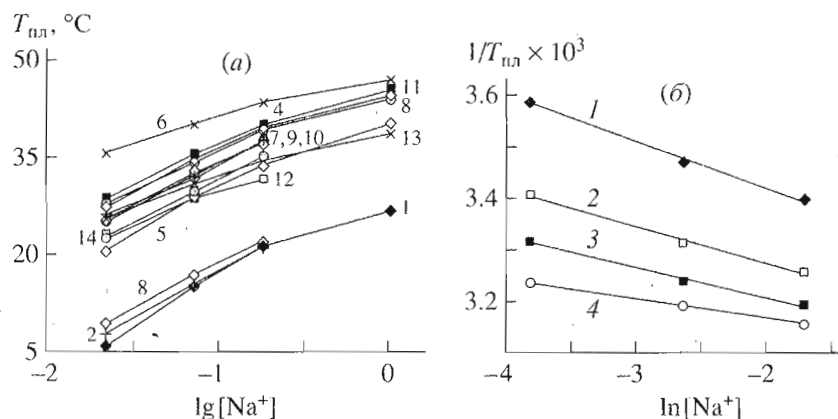


Рис. 4. а) Зависимость температуры плавления комплексов  $pN_8 \cdot (X)pN_7$  (I)–(XIV) от ионной силы буфера. б) Зависимость обратной величины температуры плавления ( $1/K$ ) комплексов  $pN_8 \cdot (X)pN_7$  от ионной силы буфера: X = HO (1); PhoL (2); PhzL (3); PhkL (4).

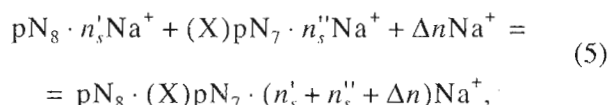
следуемых комплексов, а в интервале изменения концентрации ионов  $Na^+$  от 0.022 до 0.182 М наблюдается линейная зависимость температуры плавления комплексов от  $lg[Na^+]$  (рис. 4а), что согласуется с данными работы [23]. Величина  $dT_{пл}/d(lg[Na^+])$  (табл. 7) для комплекса  $pN_8 \cdot pN_7$  (I) составляет  $17.1^\circ C$ , что несколько меньше величины  $18.1^\circ C$ , полученной для  $[pd(GGAATTCC)]_2$  [24], и хорошо согласуется с значением  $17.11^\circ C$ , полученным для полинуклеотидов [23]. Потеря одного отрицательного заряда в структуре исходного гептануклеотида в результате формирования 5'-фосфамидной связи приводит к снижению величины  $dT_{пл}/d(lg[Na^+])$  до  $14.7^\circ C$ ; полученной для комплекса  $pN_8 \cdot (Bt)pN_7$  (II). Введение в структуру гептануклеотида остатка азина во всех случаях приводит к снижению величин  $dT_{пл}/d(lg[Na^+])$  (табл. 7).

Эффективность связывания противоионов с дуплексной формой характеризуется параметром  $\Delta n$ , который может быть получен при анализе зависимости величины  $\Delta G_a^0$  от  $[Na^+]$  согласно уравнению (4) [23, 24]:

$$\frac{d\Delta G_a^0}{d(\ln[Na^+])} = -RT\Delta n. \quad (4)$$

Однако термодинамические параметры комплексообразования, получаемые из экспериментальных кривых плавления, максимально точно описывают величину  $\Delta G_a^0$  только вблизи температуры плавления [19]. Поскольку исследуемые комплексы  $pN_8 \cdot (X)pN_7$  обладают различающейся термостабильностью,  $\Delta n$  определяли из зависимости температуры плавления, как наиболее достоверно определяемого параметра, от концентрации катионов натрия.

Уравнение равновесия с учетом катионов, принимающих участие в образовании комплекса, имеет вид:



где  $n'_s$  и  $n''_s$  – число катионов, связанных с однопочечными формами взаимодействующих олигонуклеотидных цепей,  $\Delta n$  – число катионов, дополнительно связывающихся при образовании дуплексной формы [25].

Выражения для константы равновесия  $K_p$ , независимой от ионной силы и температуры плавления комплекса, в этом случае могут быть записаны как

$$K_p = \frac{[pN_8 \cdot (X)pN_7 \cdot (n'_s + n''_s + \Delta n) Na^+]}{[pN_8 \cdot n'_s Na^+][(X)pN_7 \cdot n''_s Na^+][Na^+]^{\Delta n}} = \exp\left\{\frac{-\Delta G^0}{RT}\right\} = \exp\left\{\frac{-\Delta H^0 + T\Delta S^0}{RT}\right\}, \quad (6)$$

$$T_{пл} = \frac{\Delta H^0}{\Delta S^0 + \Delta n R \ln[Na^+] + R \ln(C_T/4)}, \quad (7)$$

$$\frac{d(1/T_{пл})}{d(\ln[Na^+])} = \frac{R\Delta n}{\Delta H^0} = \beta, \quad \Delta n = \beta \frac{\Delta H^0}{R}, \quad (8)$$

где  $\beta$  – наклон прямой, описывающей зависимость  $1/T_{пл}$  комплекса от натурального логарифма  $[Na^+]$ .

Анализ зависимостей  $1/T_{пл}$  от  $\ln[Na^+]$  комплексов проводили при концентрации ионов  $Na^+$  от 0.022 до 0.182 М. Величина  $1/T_{пл}$  является линей-

но зависимой от  $\ln[\text{Na}^+]$ , что видно из уравнения (7), и в исследуемом интервале ионной силы хорошо согласуется с экспериментальными данными (рис. 4б). Величины  $\Delta n$  образования комплексов  $pN_8 \cdot (X)pN_7$  определяли для каждой ионной силы раствора, используя при этом соответствующие значения  $\Delta H_a^0$  (например, табл. 6). Усредненные значения  $\Delta n$  по всем буферным условиям для комплексов (I)–(XIV) приведены в табл. 7.

Максимальное число противоионов связывается при формировании комплекса  $pN_8 \cdot pN_7$  (I) (табл. 7). Для комплексов  $pN_8 \cdot (\text{DL})pN_7$ , стабилизированных остатком азина, наблюдается как снижение, так и возрастание величины  $\Delta n$  относительно комплекса сравнения  $pN_8 \cdot (\text{Vt})pN_7$  (II) (табл. 7).

**Влияние особенностей структуры азинов на стабилизацию олигонуклеотидных комплексов.** При образовании комплексов между нуклеотидными цепями возникают взаимодействия, которые условно можно разделить на электростатические, вызванные кулоновскими силами, возникающими между заряженными группами олигонуклеотидных цепей, и неэлектростатические – стэкинг-взаимодействия между основаниями, гидрофобные, гидратационные взаимодействия [26, 27]. Изменение общей энергии комплексообразования  $\Delta G^0$ , входящее выражение (6) для константы равновесия  $K_p$ , не зависит от ионной силы раствора и может быть принято за неэлектростатическую составляющую общей энергии образования комплекса. Поэтому изменение свободной энергии системы взаимодействующих олигонуклеотидов при ионной силе  $a$  можно представить в виде:

$$\Delta G_a^0 = \Delta G_{ne}^0 + \Delta G_e^0, \quad (9)$$

где индексами  $ne$  и  $e$  обозначены неэлектростатическая и электростатическая составляющие общей энергии взаимодействия, а  $\Delta G_{ne}^0 = \Delta G^0$ .

Поскольку при образовании комплекса возникающие электростатические взаимодействия фосфатных групп компенсируются дополнительным связыванием противоионов, приводящим к снижению энтропии системы, их энергетический вклад ( $\Delta G_e^0$ ) должен зависеть от величины  $\Delta n$  и может быть определен из зависимости  $T_{пл}$  от ионной силы раствора.

Из сопоставлений уравнений (2) и (7) следует, что при одинаковой концентрации катионов натрия полное изменение энтропии системы при комплексообразовании может быть представлено в виде суммы изменения энтропии системы при комплексообразовании, не включающем электростатическое связывание катионов натрия ( $\Delta S^0$ ), и изменения энтропии системы, вызванного

дополнительным связыванием ионов  $\text{Na}^+$  ( $\Delta nR \ln[\text{Na}^+]$ )

$$\Delta S_a^0 = \Delta S^0 + \Delta nR \ln[\text{Na}^+]. \quad (10)$$

Таким образом, величина  $\Delta nR \ln[\text{Na}^+]$  является энтропией электростатических взаимодействий при комплексообразовании ( $\Delta S_e^0$ ). Общее изменение свободной энергии системы при комплексообразовании в этом случае имеет вид:

$$\Delta G_a^0 = \Delta H^0 - T\Delta S_a^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 - T\Delta S_e^0. \quad (11)$$

Энергетические составляющие общей энергии комплексообразования могут быть определены как

$$\Delta G_e^0 = -T\Delta S_e^0 = -T\Delta nR \ln[\text{Na}^+], \quad (12)$$

$$\begin{aligned} \Delta G_{ne}^0 &= \Delta H^0 - T\Delta S^0 = \\ &= \Delta H^0 - T(\Delta S_a^0 - \Delta nR \ln[\text{Na}^+]). \end{aligned} \quad (13)$$

Величины  $\Delta G_e^0$  образования комплексов (I)–(XV) (при 37°C) рассчитывали для буфера с ионной силой 0.182 М, используя усредненное значение  $\Delta n$  (табл. 7). Во всех случаях электростатические взаимодействия в структуре олигонуклеотидного дуплекса оказывают дестабилизирующее влияние – величины  $\Delta G_e^0$  имеют положительное значение, зависят от типа красителя, введенного в гептануклеотид и по абсолютной величине существенно меньше общей энергии комплексообразования  $\Delta G_a^0$ .

Величину  $\Delta G_{ne}^0$  рассчитывали, используя усредненные значения  $\Delta H^0$  и  $\Delta S^0$ , полученные для различных буферных условий, для которых величину  $\Delta S^0$  получали согласно уравнению (10). Величины  $\Delta G_{ne}^0$  значительно превосходят по абсолютным значениям величины  $\Delta G_e^0$  соответствующих комплексов (в 3.6 раза для комплекса  $pN_8 \cdot pN_7$  и 8.7 раза для комплекса  $pN_8 \cdot (\text{PhkL})pN_7$ ) (табл. 7). Значения  $\Delta G_{ne}^0$ , полученные как сумма  $\Delta G_{ne}^0$  и  $\Delta G_e^0$ , хорошо совпадают с величинами  $\Delta G_a^0$ , приведенными в табл. 5.

Остаток красителя, вводимый в структуру одного из взаимодействующих олигонуклеотидов, оказывает влияние на обе энергетические составляющие. Эффективность реализации неэлектростатических ( $\Delta \Delta G_{ne}^0$ ) и электростатических ( $\Delta \Delta G_e^0$ ) взаимодействий остатков красителей с элементами дуплексной структуры оценивали по разнице вели-

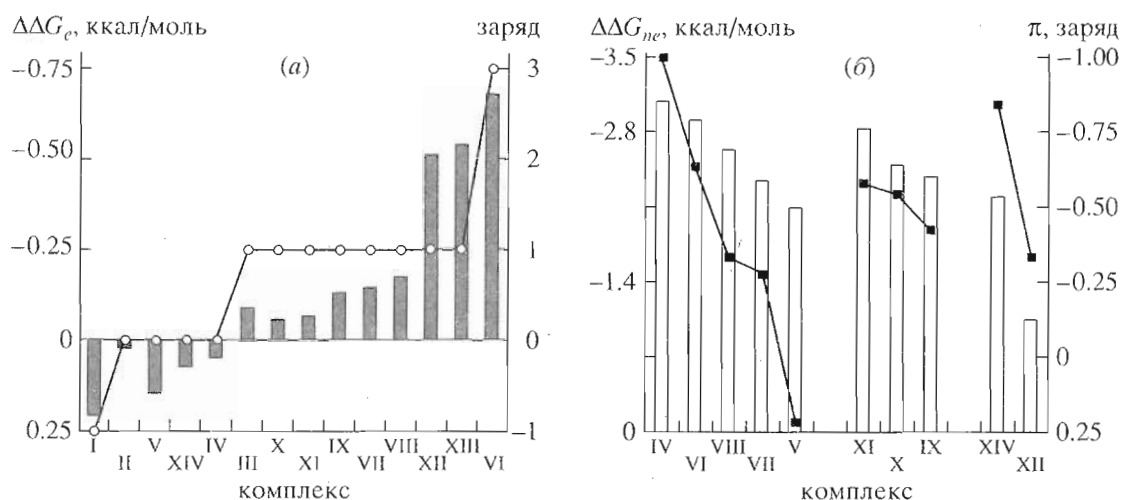


Рис. 5. Изменение составляющих энергии образования ( $37^\circ\text{C}$ ) комплексов  $pN_8 \cdot (X)pN_7$  (столбики) относительно комплекса сравнения  $pN_8 \cdot (Vt)pN_7$ : (а) электростатической составляющей в зависимости от заряда на производном (X) $pN_7$  (линия) и (б) неэлектростатической составляющей в зависимости от заряда  $\pi$ -системы красителя (линия).

чин  $\Delta G_{ne}^0$  и  $\Delta G_e^0$  соответственно, рассчитанных для комплексов  $pN_8 \cdot (DL)pN_7$  и  $pN_8 \cdot (Vt)pN_7$ .

**Влияние остатка красителя на электростатическую составляющую общей энергии комплексообразования.** Энергетический вклад кулоновского взаимодействия ( $\Delta\Delta G_e^0$ ) остатка красителя в комплексе с элементами дуплексной структуры  $pN_8 \cdot (DL)pN_7$  зависит от наличия в его структуре положительного заряда (рис. 5а).

Незаряженные остатки PhzL, KerL и PhoL вызывают дополнительную электростатическую дестабилизацию соответствующих стабилизированных комплексов  $pN_8 \cdot (DL)pN_7$  (IV), (XIV) и (V) относительно комплекса сравнения  $pN_8 \cdot (Vt)pN_7$  (II) (рис. 5а). Это может быть вызвано тем, что в нестабилизированном комплексе  $pN_8 \cdot (Vt)pN_7$  концевые участки дуплексной структуры являются "подплавленными", что приближает их по свойствам к одноцепочечному состоянию, в котором отталкивание фосфодиэфирных группировок выражено слабее [28]. Наличие остатка красителя в олигонуклеотиде, приводя к стабилизации комплементарного комплекса, вызывает упорядочивание концевой участка дуплексной структуры [29], что требует дополнительных энергетических затрат для конденсации добавочных противоионов среды.

Максимальное электростатическое дестабилизирующее влияние оказывает остаток PhoL, в структуре которого внешние центры с высокой плотностью электронов – атомы кислорода N-оксидного типа – обеспечивают наличие локального отрицательного заряда. Это приводит к необходимости больших энергетических затрат на

связывание дополнительных противоионов при образовании комплекса (V).

Появление в структуре феназина положительного заряда за счет кватернизации гетероциклического атома азота приводит к уменьшению числа связываемых комплексами (VI)–(XI) противоионов и вызывает выгодную для комплексообразования электростатическую энергетическую составляющую (рис. 5а), вклад которой в стабилизирующий эффект  $\Delta\Delta G^0$  красителя в зависимости от его структуры составляет 2–6%. Увеличение площади ароматической системы феназиниевого красителя в результате бензоанелирования, т.е. увеличение размера катиона, приводящее к большей делокализации заряда, вызывает снижение величины  $\Delta\Delta G_e^0$  электростатической стабилизации комплексов (IX)–(XI) по сравнению с трициклическим остатком PhnL (VIII).

Эффективность электростатической стабилизации комплекса (VI) остатком красителя PhkL в значительной степени возрастает благодаря наличию двух дополнительных положительных зарядов на заместителях при трициклической системе азина. Величина  $\Delta\Delta G_e^0$  в этом случае достигает значения  $-0.68$  ккал/моль, что составляет 19% от общего стабилизирующего эффекта, вызванного введением остатка этого красителя в гептануклеотид.

Протонированный остаток акридина Asc имеет неожиданно эффективный одиночный положительный заряд, влияние которого практически не зависит от длины линкера. Высокое абсолютное значение  $\Delta\Delta G_e^0$  кулоновского взаимодействия остатков акридина в дуплексах (XII), (XIII)

может быть обусловлено более выгодной с точки зрения электростатики интеркаляцией между первой и второй парами оснований [30], а также меньшей, по сравнению с феназином, степенью делокализации заряда по  $\pi$ -системе красителя. Вклад  $\Delta\Delta G_e^0$  в  $\Delta\Delta G_a^0$  остатков акридина в зависимости от длины линкера составляет 25 и 34% для AcL' и AcL соответственно. Это различие обусловлено меньшим общим стабилизирующим эффектом AcL по сравнению с AcL' из-за меньшего вклада неэлектростатической составляющей (табл. 7).

**Влияние остатка красителя на неэлектростатическую составляющую общей энергии комплексообразования.** Стабилизация комплексов  $pN_8 \cdot (DL)pN_7$  остатками красителей, как видно из данных, представленных в табл. 7, в основном достигается реализацией взаимодействий неэлектростатической природы. Вклады  $\Delta\Delta G_{ne}^0$  в общую энергию стабилизации комплексов изменяются от -1 до -3.1 ккал/моль в зависимости от структуры остатка красителя и многократно превышают по абсолютным значениям величины  $\Delta\Delta G_e^0$ . Стабилизирующее влияние остатков PhzL, PhoL, KerL в комплексах (IV), (V) и (XIV) обусловлено реализацией исключительно этого типа взаимодействий, которые, кроме того, компенсируют положительные значения  $\Delta\Delta G_e$ , присущие этим красителям. Минимальный вклад  $\Delta\Delta G_{ne}^0$  в стабилизацию комплекса наблюдается для остатка акридина, введенного в гептануклеотид через триметиленовый линкер (66% от общей энергии стабилизации  $\Delta\Delta G^0$  комплекса (XII)) (табл. 7). Гидрофобные взаимодействия, по-видимому, не вносят значительного вклада в составляющую  $\Delta\Delta G_{ne}^0$ , поскольку не наблюдается какой-либо корреляции между гидрофобными свойствами производного (DL)pN<sub>7</sub> (см.  $t_{уд}$  в табл. 2) и величинами  $\Delta\Delta G_{ne}^0$  образования соответствующего комплекса  $pN_8 \cdot (DL)pN_7$ .

Практически во всех случаях наблюдаемое возрастание величины  $\Delta\Delta G_{ne}^0$  происходит на фоне увеличения абсолютного значения  $\Delta\Delta H^0$ , что связано с реализацией стэкинг-взаимодействия между концевыми основаниями дуплекса и остатком красителя. Стэкинг-взаимодействие относится к донорно-акцепторному типу межплоскостного связывания ароматических соединений, эффективность которого определяется свойствами  $\pi$ -систем и структурными особенностями вовлекаемых в него компонентов [27]. В качестве характеристики  $\pi$ -системы красителя можно использовать величину  $\pi$ -донорности, которая определяется как сумма частичных зарядов на атомах,

участвующих в формировании  $\pi$ -системы.  $\pi$ -Донорность ароматической системы тем больше, чем выше величина суммарного отрицательного заряда [31, 32]. Величины суммарных зарядов на атомах, формирующих  $\pi$ -системы красителей, рассчитанные нами по алгоритму РМЗ, приведены в табл. 1.

Сравнение величин  $\Delta\Delta G_{ne}^0$  и заряда  $\pi$ -системы красителей позволяет распределить красители на несколько групп, которые включают в себя красители близкой структуры, – группа трициклических феназинов, группа тетрациклических феназинов, группа акридинов (рис. 5б). Среди всех рассмотренных красителей максимальная величина  $\Delta\Delta G_{ne}$  наблюдается для остатка PhzL (комплекс (IV)), ароматическая система которого обладает максимальной  $\pi$ -донорностью. Введение заместителя по атому азота, приводящее к падению  $\pi$ -донорных свойств ароматической системы феназина благодаря появлению дополнительного положительного заряда, вызывает в общем случае снижение величины  $\Delta\Delta G_{ne}^0$ . Причем введение более акцепторного N-заместителя – толила – вызывает большее падение суммарного отрицательного заряда  $\pi$ -системы по сравнению с гидроксиэтильным заместителем, что находит свое отражение и в относительно большем снижении стабилизирующего эффекта в комплексе (VII). С другой стороны для остатка красителя PhkL, несущего два положительных заряда,  $\pi$ -донорность ароматической системы уменьшается в меньшей степени, что происходит, по-видимому, благодаря наличию дополнительного донорного заместителя – аминогруппы пропилендиамина при C7 феназина. Это обеспечивает высокое значение величины  $\Delta\Delta G_{ne}^0$  образования комплекса  $pN_8 \cdot (PhkL)pN_7$  (VI), что в сочетании с наибольшим значением  $\Delta\Delta G_e^0$  приводит к максимальному стабилизирующему эффекту среди всех рассмотренных красителей (табл. 7). Наиболее электронодефицитной является ароматическая система остатка PhoL благодаря наличию большего положительного заряда на атомах азота в результате высокой поляризации N–O-связей. В соответствии с этим для комплекса  $pN_8 \cdot (PhoL)pN_7$  (V) наблюдается минимальное значение величины  $\Delta\Delta G_{ne}^0$  в группе красителей на основе феназина. Вторая группа объединяет тетрациклические производные 2-гидроксиэтилфеназина. Известно, что бензоаннелирование ароматических гетероциклов приводит к увеличению общей  $\pi$ -донорности ароматической системы [32]. По сравнению с исходным феназиновым остатком PhnL увеличение  $\pi$ -донорности ароматической системы происходит в ряду  $Phn_1L < Phn_2L < Phn_3L$ . В этом же ряду на-

блюдается возрастание абсолютной величины  $\Delta\Delta G_{nc}^0$  в комплексах (IX)–(XI). Однако по сравнению с остатком PhnL только Phn<sub>3</sub>L даст большую неэлектростатическую стабилизацию. По-видимому, меньшая эффективность красителей Phn<sub>1</sub>L и Phn<sub>2</sub>L обусловлена стерическими факторами, которые препятствуют оптимальному перекрытию π-систем нуклеотидных оснований и трициклической феназиниевой части красителя из-за введения дополнительных аннелированных бензольных колец.

Корреляция между величинами  $\Delta\Delta G_{nc}^0$  красителей и отрицательного заряда их π-системы наблюдается не только для феназиновых красителей, но и для группы акридинов. Ароматическая система протонированного акридина обладает π-донорными свойствами, сопоставимыми с таковыми для остатка PhnL. Однако вклад неэлектростатической стабилизации комплекса (XV) даже в случае оптимального для этого красителя пентаметиленового линкера ниже, чем в случае PhnL, что может быть вызвано различием в способе интеркаляции для этих красителей. Увеличение, по сравнению с акридином, отрицательного заряда π-системы керамидонина KerL приводит к большей величине  $\Delta\Delta G_{nc}^0$  комплекса (XIV), что подтверждает найденную закономерность влияния π-донорности красителя на его стабилизирующий эффект.

Таким образом показано, что красители на основе феназина и акридина, стабилизирующие комплекс путем стэкинг-взаимодействия с концевым участком дуплексной структуры, оказывают влияние как на электростатическую, так и на неэлектростатическую составляющие общей энергии образования комплементарного комплекса. Электростатическая стабилизация достигается при наличии в остатке красителя положительного заряда, причем большее влияние оказывает локализация заряда на экзоциклических заместителях. Неэлектростатическая стабилизация внутри красителей одного класса возрастает с увеличением общей электронной плотности ароматической системы азина. Стабилизирующий эффект красителя может быть увеличен путем введения в его структуру электронодонорных экзоциклических заместителей. Идеальный краситель, стабилизирующий концевой участок дуплексной структуры, таким образом, должен обладать гетероароматической трициклической системой, содержащей два типа заместителей, одни из которых несут сопряженный с π-системой красителя положительный заряд, а другие – обеспечивают повышенные электронодонорные свойства ароматической системы.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Красители** керамидонин (Ker) и акридины (AcrL, AcrL') синтезированы Р.П. Шишкиной (НИОХ СО РАН) и Э. Соттофатори (Университет Генуи, Италия). Динитрат 2,7-бис(3-аминопропил)амино-9-{2-(1-азония-4-азабицикло[2,2,2]октан-1-ил)этил}феназиния (PhkL) любезно предоставлен Н.П. Лукьянчук (НИБХ СО РАН).

**Синтез азинов.** Спектры электронного поглощения записывали на спектрофотометре Specord M-40 в этаноле. Спектры <sup>1</sup>H-ЯМР регистрировали на спектрометре Bruker WR-200 в DMF-d<sub>7</sub>, внутренний стандарт гексаметилдисилоксан; приведены химические сдвиги (δ, м. д.) и КССВ (Гц). Контроль за ходом реакций и чистотой соединений осуществляли ТСХ на пластинках Silufol UV-254 в системе *трет*-бутанол–метилэтилкетон–муравьиная кислота–вода 8 : 6 : 3 : 3.

**Перхлорат 5-(3-аминопропил)амино-7-(2-гидроксиэтил)бенз[а]феназиния (Phn<sub>2</sub>L).** К раствору 1 г (3.2 ммоль) хлорида 7-(2-гидроксиэтил)бенз[а]феназиния в 50 мл метанола при интенсивном перемешивании добавляли раствор 1 мл (12 ммоль) 1,3-диаминопропана в 50 мл воды. Раствор интенсивно перемешивали при доступе воздуха 24 ч. Реакционную смесь упаривали в вакууме, к остатку добавляли 25 мл воды и кипятили в течение 30 мин. Горячий раствор отфильтровывали и осадок промывали горячей водой (2 × 10 мл). К объединенному фильтрату добавляли 5 мл 10% LiClO<sub>4</sub> в воде и охлаждали. Выпавший осадок отфильтровывали, сушили и промывали горячим толуолом (3 × 15 мл). После кристаллизации из смеси метанол–ацетон получали 0.67 г (47%) Phn<sub>2</sub>L. R<sub>f</sub> 0.62. Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР: 2.20 (м, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.23 (т, 2H, CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, J 9), 3.95 (т, 2H, CH<sub>2</sub>NH, J 9), 4.20 (т, 2H, CH<sub>2</sub>OH, J 7.5), 5.08 (т, 2H, CH<sub>2</sub>N<sup>+</sup>, J 7.5), 6.90 (с, 1H, H6), 7.93–8.24 (м, 7H, H<sub>аром</sub>), 9.18 (дд, 1H, H1, J<sub>1,2</sub> 7.5, J<sub>1,3</sub> 2).

**Перхлорат 9-(3-аминопропил)амино-5-метокси-7-(2-гидроксиэтил)бенз[а]феназиния (Phn<sub>1</sub>L).** К раствору 1 г (3.2 ммоль) хлорида 7-(2-гидроксиэтил)бенз[а]феназиния в 50 мл воды при интенсивном перемешивании добавляли 15 мл 1 М NaOH и выдерживали при перемешивании в течение 3 ч при доступе воздуха. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали водой до pH 7. Осадок, содержащий по данным ТСХ 5-оксо-7-(2-гидрокси)бенз[а]феназин с незначительной примесью бенз[а]феназина сушили, суспендировали в 20 мл толуола, добавляли 5 мл диметилсульфата и кипятили в течение 6 ч. Осадок, содержащий в основном метилсульфат 5-метокси-7-(2-гидроксиэтил)бенз[а]феназиния отфильтровывали, промывали эфиром. К раствору 0.21 г (0.5 ммоль) метилсульфат 5-метокси-7-(2-гидроксиэтил)бенз[а]феназиния в 15 мл метанола добавляли рас-

твор 0.1 мл (1.2 ммоль) 1,3-диаминопропана в 5 мл воды. Раствор интенсивно перемешивали при доступе воздуха в течение суток. После выделения аналогично Phn<sub>2</sub>L получали 0.13 г (56% в расчете на последнюю стадию) Phn<sub>3</sub>L. R<sub>f</sub> 0.70. Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР: 2.20 (м, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.26 (с, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.36 (т, 2H, CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, J 7.5), 3.76 (т, 2H, CH<sub>2</sub>NH, J 7.5), 4.30 (т, 2H, CH<sub>2</sub>OH, J 7.5), 5.28 (т, 2H, CH<sub>2</sub>N<sup>+</sup>, J 7.5), 7.18 (с, 1H, H<sub>6</sub>), 7.24 (д, 1H, H<sub>8</sub>, J 2), 7.88–8.42 (м, 5H, H<sub>аром</sub>), 9.22 (дд, 1H, H<sub>1</sub>, J<sub>1,2</sub> 7.5, J<sub>1,3</sub> 2).

**Перхлорат 9-(3-аминопропил)амино-12-(2-гидроксиэтил)бенз[а]феназиния (Phn<sub>3</sub>L).** Получали аналогично Phn<sub>2</sub>L из хлорида 12-(2-гидроксиэтил)бенз[а]феназиния. Выход 39%. R<sub>f</sub> 0.62. Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР: 2.20 (м, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.32 (т, 2H, CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, J 7.5), 3.75 (т, 2H, CH<sub>2</sub>NH, J 7.5), 4.21 (т, 2H, CH<sub>2</sub>OH, J 6.0), 5.62 (т, 2H, CH<sub>2</sub>N<sup>+</sup>, J 6.0), 7.28 (д, 1H, H<sub>11</sub>, J<sub>9,11</sub> 2), 7.72–8.22 (м, 7H, H<sub>аром</sub>), 8.74 (дд, 1H, H<sub>1</sub>, J<sub>1,2</sub> 8, J<sub>1,3</sub> 2).

**Олигонуклеотиды,** содержащие 5'-концевой фосфат синтезировали фосфотриэфирным методом в растворе по методике работы [33].

**Синтез азинсодержащих производных гептануклеотида.** Производные (PhnL)рССАААСА и (PhL)рССАААСА получали по методу [7]. Производные (X)рССАААСА (X = PhzL, PhoL, PhkL, Phn<sub>1</sub>L, Phn<sub>2</sub>L, Phn<sub>3</sub>L, KerL, AcrL, AcrL') синтезировали по методике [16].

Производное гептануклеотида (EtdL')рССАААСА предоставлено А.А. Кошкиным (НИБХ СО РАН).

Все производные гептануклеотида (DL)рN<sub>7</sub> получены с выходом не менее 70%.

Олигонуклеотиды и их производные выделяли обращенно-фазовой (LiChrosorb RP-18, Merck) хроматографиями на хроматографе Beckman-332 на колонке 4 × 250 мм со скоростью элюции 2 мл/мин в линейном градиенте концентрации (0 → 20%) ацетонитрила в 0.05 М LiClO<sub>4</sub> за 30 мин. Хроматографическая гомогенность полученных соединений была не ниже 98%. Хроматографические и оптические характеристики полученных соединений приведены в табл. 2.

**Концентрацию олигонуклеотидов** и их производных определяли спектрофотометрически. Молярные коэффициенты поглощения на длине волны 260 нм (ε<sub>260</sub>) олигонуклеотидов рССАААСА и рТГТТТГГС были определены по данным их полного фосфодиэстеразного гидролиза [34] и составили 66.0 и 70.2 мМ<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup> соответственно. Молярные коэффициенты поглощения азинсодержащих производных гептануклеотида (табл. 3) рассчитывали как сумму величин ε<sub>260</sub> свободного

линкерсодержащего красителя (табл. 1) и нативного гептануклеотида.

**Спектры электронного поглощения** водных растворов олигонуклеотидов, свободных красителей с введенным в них амиолинкером, а также азинсодержащих производных гептануклеотида записывали в диапазоне длин волн 200–700 нм на спектрофотометре Shimadzu UV-2100.

**Оптические кривые плавления** регистрировали на специальной установке, созданной на базе спектрофотометрического УФ-детектора жидкостного хроматографа "Миличром", по [7]. Каждая кривая плавления состояла из набора не менее чем 600 значений поглощения с частотой 10 точек/°С. Для всех кривых плавления производили поправку на тепловое расширение воды. Кривые нагрева совпадали с кривыми охлаждения. Регистрацию кривых плавления в многоволновом режиме проводили с пошаговым автоматическим переключением монохроматора (не более 4 длин волн). Время интегрирования сигнала на каждой длине волны не превышало 1.2 с.

**Определение термодинамических параметров** образования комплексов методом оптимизации в рамках модели двух состояний с наклонными базовыми линиями [20, 21].

Величины ΔH<sup>0</sup> и ΔS<sup>0</sup> комплексообразования рассчитывали путем минимизации среднеквадратичного отклонения (ΔA<sup>2</sup>) между экспериментальной кривой плавления, зарегистрированной на длине волны λ, и расчетной, полученной на основе уравнений:

$$K_p = \frac{2F}{(1-F)^2 C_T} = \exp\left(-\frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R}\right) \quad (14)$$

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

где K<sub>p</sub> – равновесная константа комплексообразования; F – доля двухцепочечной формы олигонуклеотидов в растворе; C<sub>T</sub> – суммарная концентрация взаимодействующих олигонуклеотидных компонентов, взятых в стехиометрическом соотношении; A(T) – экспериментальная величина поглощения раствора олигонуклеотидов в зависимости от температуры; A<sub>ds</sub>(T) и A<sub>ss</sub>(T) – зависимости оптического поглощения раствора олигонуклеотидов от температуры в двух- и в одноцепочечной форме соответственно.

Предполагали, что функции A<sub>ds</sub>(T), A<sub>ss</sub>(T) (базовые линии) являются линейными [21] и описывали их уравнениями

$$A_{ds}(T) = A_d + TB_d,$$

$$A_{ss}(T) = A_s + TB_s,$$

где A<sub>d</sub>, B<sub>d</sub>, A<sub>s</sub> и B<sub>s</sub> – константы.

В процедуре минимизации использовали шесть варьируемых параметров, не зависящих от температуры:  $\Delta H^0$ ,  $\Delta S^0$ ,  $A_s$ ,  $B_s$ ,  $A_d$ ,  $B_d$  [21]. Оптимизацию проводили с учетом всех экспериментальных точек при использовании программы "Simplex", разработанной А.В. Ивановым (ИЛФ СО РАН) для работы в среде Windows95.

При всех значениях  $C_T$  в интервале от 3.2 до 220 мкМ разница между экспериментальной и расчетной кривыми плавления в каждой точке не превышала 0.1%. Величины  $\Delta H^0$  и  $\Delta S^0$ , полученные методом оптимизации индивидуальных кривых, усредняли, среднее отклонение не превышало  $\pm 3$  ккал/моль и  $\pm 6$  ккал/моль/К соответственно.

**Определение термодинамических параметров концентрационным методом** проводили путем линеаризации зависимости  $T_{пл}^{-1}$  от  $\ln(C_T/4)$  [19–21] согласно уравнению (2), рассматривая величины  $T_{пл}$  с использованием значений  $\Delta H^0$  и  $\Delta S^0$ , полученных методом оптимизации. Параметр линейной корреляции ( $r^2$ ) в этих случаях был не ниже 0.993.

**Влияние ионной силы раствора** на термодинамические параметры комплексообразования проводили в буфере 10 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 7.0), 1 мМ EDTA, динатриевая соль, содержащем NaCl в концентрации: 0, 0.05, 0.16 и 1.0 М при суммарной концентрации олигонуклеотидных компонентов  $C_T$ , равной 20 и/или 32 мкМ. Принимали, что концентрация ионов натрия выше концентрации NaCl на величину 22 мМ из-за наличия в буфере  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  и EDTA.

**Квантово-механические и молекулярно-механические расчеты** для остатков красителей, содержащих аминоклипер, проводили с использованием пакета программ "Hyperchem" по алгоритмам PM3 и MM+ соответственно.

Работа выполнена при поддержке Государственной научно-технической программы "Новейшие методы биоинженерии", межвузовской научно-технической программы "Биотехнология" и программы "Геном".

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Asseline U., Thuong N.T., Helene C. // New J. Chem. 1997. V. 21. P. 5–17.
2. Marky L.A., Breslauer K.J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. P. 4359–4363.
3. Asseline U., Delarue M., Lancelot G., Toulme F., Thuong N. T., Montenay-Garestier T., Helene C. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. P. 3297–3301.
4. Koshkin A.A., Kropachev K.Yu., Mamaev S.V., Bulychiev N.V., Lokhov S.G., Vlassov V.V., Lebedev A.V. // J. Mol. Recognition. 1994. V. 7. P. 177–188.
5. Chan J.K., Carlson D.V., Weith H.L., O'Brien J.A., Doldman M.E., Cushman M. // Tetrahedron Lett. 1992. V. 33. P. 2275–2278.
6. Balbi A., Sottofattori E., Grandi T., Mazzei M., Abramova T.V., Lokhov S.G., Lebedev A.V. // Tetrahedron. 1994. V. 50. P. 4009–4018.
7. Lokhov S.G., Podyminogin M.A., Sergeev D.S., Silnikov V.N., Kutyavin I.V., Shishkin G.V., Zarytova V.F. // Bioconj. Chem. 1992. V. 3. P. 414–419.
8. Биченкова Е.В., Зарытова В.Ф., Иванова Е.М., Мальцева Т.В., Сальников Г.Е., Лебедев А.В. // Биоорган. химия. 1992. Т. 18. С. 398–411.
9. Биченкова Е.В., Горенштейн Л.А., Воробьев Ю.Н., Тэннэ Е.Ю., Зарытова В.Ф., Иванова Е.М., Мальцева Т.В., Лебедев А.В. // Биоорган. химия. 1992. Т. 18. С. 901–910.
10. Wilson W.D., Ratmeyer L., Zhao M., Strekovski L., Boykin D. // Biochemistry. 1993. V. 32. P. 4098–4104.
11. Nagai K., Carter B.J., Xu J., Hecht S.M. // J. Am. Chem. Soc. 1991. V. 113. P. 5099–5100.
12. Киприянов А.И., Прилуцкий Г.М. // Ж. орг. хим. 1959. Т. 29. С. 1020–1026.
13. Шишкин Г.В. // Хим. гетероцикл. соед. 1984. № 10. С. 1407–1411.
14. Сильников В.Н., Лукъянчук Н.П., Шишкин Г.В. // Изв. АН. Сер. хим. 1996. № 8. С. 2059–2062.
15. Сильников В.Н. Синтез и свойства аннелированных ароматическими кольцами 1,4-диазобинцикло[2,2,2]октанов. Дис. ... канд. хим. наук. Новосибирск: НИБХ СО РАН, 1993. С. 89.
16. Годовикова Т.С., Зарытова В.Ф., Халимская Л.М. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. С. 475–481.
17. Пышный Д.В., Репкова М.Н., Лохов С.Г., Иванова Е.М., Венямина А.Г., Зарытова В.Ф. // Биоорган. химия. 1997. Т. 23. С. 497–504.
18. Кантор Ч., Шиммель П. Биофизическая химия. М.: Мир, 1985. Т. 2.
19. Breslauer K.J. // Thermodynamic Data for Biochemistry and Biotechnology / Ed. H.-J. Hinz. Berlin; Heidelberg; New York; Tokyo: Springer-Verlag, 1986. P. 402–427.
20. Breslauer K.J. // Methods in molecular Biology. V. 26 / Ed. S. Agrawal. Totowa, New Jersey: Humana Press, 1994. P. 347–372.
21. Petersheim M., Turner D.H. // Biochemistry. 1983. V. 22. P. 256–263.
22. Breslauer K.J., Frank R., Blocker H., Marky L.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. P. 3746–3750.
23. Williams A.P., Longfellow C.E., Freier S.M., Kierzek R., Turner D.H. // Biochemistry. 1989. V. 28. P. 4283–4291.
24. Bower M., Summers M.F., Kell B., Hoskins J., Zon G., Wilson W.D. // Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. P. 3531–3547.
25. Кантор Ч., Шиммель П. Биофизическая химия. М.: Мир, 1985. Т. 3. Гл. 15, 21, 22.
26. Record M.T., Jr., Anderson C.F., Lohman T.M. // Q. Rev. Biophys. 1978. V. 11. P. 103–178.
27. Шабарова З.А., Богданов А.А. Химия нуклеиновых кислот и их компонентов. М.: Химия, 1978. С. 272–275.

28. Maltseva T.V., Agback P., Chattopadhyaya J. // Nucl. Acids Res. 1993. V. 21. P. 4246–4252.
29. Maltseva T., Sandstrom A., Zarytova V.F., Ivanova E.M., Sergeev D.S., Chattopadhyaya J. // J. Biochem. Biophys. Methods. 1993. V. 26. P. 173–236.
30. Cieplak P., Rao S. N., Helene C., Montenay-Garestier T., Kollman P.A. // J. Biomol. Struct. Dynam. 1987. V. 5. P. 361–382.
31. Гурьянова Е.Н., Гольдштейн И.П., Ромм И.П. Физико-химические свойства ЭДА-комплексов. Дорно-акцепторная связь. М.: Химия, 1973. С. 94–310.
32. Пожарский А.Ф. Теоретические основы химии гетероциклов. М.: Химия, 1985. С. 53–102.
33. Зарытова В.Ф., Иванова Е.М., Романенко В.П. // Биоорг. химия. 1983. Т. 9. С. 516–521.
34. Shabarova Z.A., Dolinnaya N.G., Drutsa V.L., Melnikova N.P., Purmal A.A. // Nucl. Acids Res. 1981. V. 9. P. 5747–5761.

## The Effect of the Structure of Azines Attached to the Terminal Phosphate of the Oligonucleotide on the Thermodynamics of Complementary Complex Formation

D. V. Pyshnyi, S. G. Lokhov, V. N. Silnikov, G. V. Shishkin, E. M. Ivanova<sup>#</sup>, and V. F. Zarytova

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

The effect of the structure of a series of dyes (D) based on phenazine or acridine on the stability of the complementary complex (5')pTGTTGGC · (5')(DL)pCCAAACA (L is a linker) was studied, and the thermodynamic parameters of complex formation were determined. It was shown that the dyes stabilizing the complex by stacking with a terminal duplex structure affect both electrostatic and nonelectrostatic components of the energy of free complex formation. Electrostatic stabilization was achieved if the dye residue was positively charged, with the impact of the charge located on its exocyclic substituents being the highest. The nonelectrostatic stabilization within the same class of dyes increased parallel with the rise in the electron density of the azine aromatic system.

*Key words: oligonucleotides, conjugates, complex formation, thermodynamic parameters, intercalators, azines*

---

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed; phone/fax: +7 (3832) 35-1665, e-mail: physhnyi@niboch.nsc.ru.