



УДК 547.963.3

КОНФОРМАЦИЯ АМИДОВ ОЛИГОДЕЗОКСИАДЕНИЛОВЫХ КИСЛОТ И СВОЙСТВА ИХ КОМПЛЕКСОВ С ПОЛИУРИДИЛОВОЙ КИСЛОТОЙ

Громова Е. С., Должная Н. Г., Смирнов В. В.,
Шабарова З. А., Прокофьев М. А.

*Химический факультет и межфакультетская лаборатория биоорганической химии
Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова*

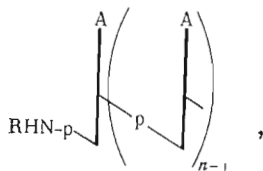
С помощью методов КД, флуоресценции и ПМР-спектроскопии изучены особенности конформации в растворе амидов олигодезоксиаденилатов и их комплексов с poly(U). Показано, что в амидах $d(pA)_n$ заместители ароматической природы взаимодействуют с 5'-концевым аденином без высдеряния между плоскостями оснований и нарушения геометрии стэкинг-взаимодействий адениновых остатков, причем это взаимодействие не зависит от длины олигонуклеотидной цепи. Расположение ароматических радикалов по отношению к ближайшему аденину, по-видимому, такое же, как в случае амидов 5'-адениловой кислоты. Амиды $d(pA)_n$ образуют с poly(U) трехспиральные комплексы (1A : 2U), геометрические параметры которых совпадают с параметрами комплексов $d(pA)_n \cdot 2poly(U)$ и не зависят от природы аминокомпонента, длины олигонуклеотидной цепи, состава и ионной силы буфера и концентрации нуклеотидного материала. Термическая устойчивость комплексов амидов $d(pA)_n$ с poly(U) меньше, чем комплексов с участием незамещенных $d(pA)_n$; наибольшим дестабилизирующим действием обладают остатки ароматических аминокислот. Высказано предположение об отсутствии интеркалирования ароматических радикалов в спираль и фиксации их в малой бороздке спирали за счет взаимодействия с N³-участком аденинового цикла.

Выяснение особенностей конформации модифицированных олигодезоксинуклеотидов и их способности к комплементарным взаимодействиям с полинуклеотидами представляет важный этап в изучении стереохимии различных матричных реакций, т. е. химических реакций, протекающих в спиральных комплексах комплементарных олиго- или полинуклеотидов между их функциональными группами, которые могут быть прямо активированы или модифицированы таким образом, что нуклеотидный фрагмент приобретает способность к реакции «активную» группу. Одной из таких реакций является неферментативное «сшивание» (образование межнуклеотидных связей) олигодезоксиадениловых кислот на poly(U) в качестве матрицы [1—3]. Первые сведения о физико-химических свойствах модельной системы, в которой использовали аминокислотные амиды олигодезоксиаденилатов, несущие потенциально активный концевой фосфат, были получены с помощью метода абсорбционной УФ-спектроскопии [4].

Задачей настоящей работы явилось изучение влияния заместителя у 5'-концевой фосфоамидной группы олигодезоксиаденилатов на конформацию олигомеров и геометрию трехспирального комплекса, образованного ими с poly(U). Важно было также изучить особенности взаимодействия амидных радикалов, в том числе и радикалов аминокислот, с олиго-

нуклеотидами и спиральными комплексами. В качестве основных методов исследования в работе были применены метод КД и флуоресцентный метод, в ряде опытов был использован, кроме того, метод ПМР-спектроскопии.

Набор исследованных амидов 5'-дезоксаденилатов, $d(pA)_n$, включал соединения с различной природой аминокомпонента и различной длиной олигонуклеотидной цепи:



где

(I) $R=H, n=2$;

(II) $R=-(CH_2)_2CH_3, n=2$;

(III) $R=-CH_2C_6H_5, n=2$;

(IV) $R=-CH \begin{matrix} \text{COOCH}_3 \\ | \\ \text{CH}_2C_6H_5, n=2 \\ | \\ \text{COOCH}_3 \end{matrix}$;

(V) $R=-CH \begin{matrix} \text{COOCH}_3 \\ | \\ \text{CH}_2 \text{---} \text{Indole ring} \\ | \\ \text{H} \end{matrix}, n=2$

(VI) $R=H, n=3$;

(VII) $R=-(CH_2)_2CH_3, n=3$;

(VIII) $R=-CH_2C_6H_5, n=3$;

(IX) $R=-CH \begin{matrix} \text{COOCH}_3 \\ | \\ \text{CH}_2C_6H_5, n=3 \\ | \\ \text{COOCH}_3 \end{matrix}$;

(X) $R=-CH \begin{matrix} \text{COOCH}_3 \\ | \\ \text{CH}_2 \text{---} \text{Indole ring} \\ | \\ \text{H} \end{matrix}, n=3$

(XI) $R=-CH \begin{matrix} \text{COOCH}_3 \\ | \\ \text{CH}_2C_6H_5, n=4 \end{matrix}$

Как видно из рис. 1, для замещенных олигодезоксаденилатов наблюдаются кривые КД с двойным эффектом Коттона в районе 260 нм, что свидетельствует о сохранении стэкинг-взаимодействий адениновых остатков в этих соединениях. Нарушение межплоскостных взаимодействий оснований приводило бы к резкому изменению кривых КД, как, например, в случае фенилаланинового производного $pGrU$ [5] или 2',3'-бензилиденовых производных олигорибоаденилатов [6]. В 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)-бензил-5'-фосфоамидах $d(pA)_n$ упорядоченное расположение оснований в олигонуклеотидной части молекулы также не разрушается [7].

Введение заместителя в 5'-положение $d(pA)_n$ (соединения (II) — (V), (VII) — (XI)) приводит к однотипным изменениям КД олигомеров (без изменения общего профиля кривых КД): происходит сужение отрицательного максимума и уменьшение его амплитуды, а также несколько возрастает амплитуда длинноволнового положительного максимума (рис. 1). Наблюдаемый эффект зависит от природы заместителя (рис. 1, а и б): наибольшие изменения КД характерны для производных фенилаланина и триптофана и ароматических аминов, наименьшие — для производных аммиака, промежуточное положение занимают производные пропиламина. Результаты, полученные методом КД, показывают, что ароматические радикалы аминокомпонента взаимодействуют с гетероциклическими основаниями. Взаимодействия такого типа были обнаружены и подробно изучены ранее при исследовании амидов мононуклеотидов [5, 9]; они приводи-

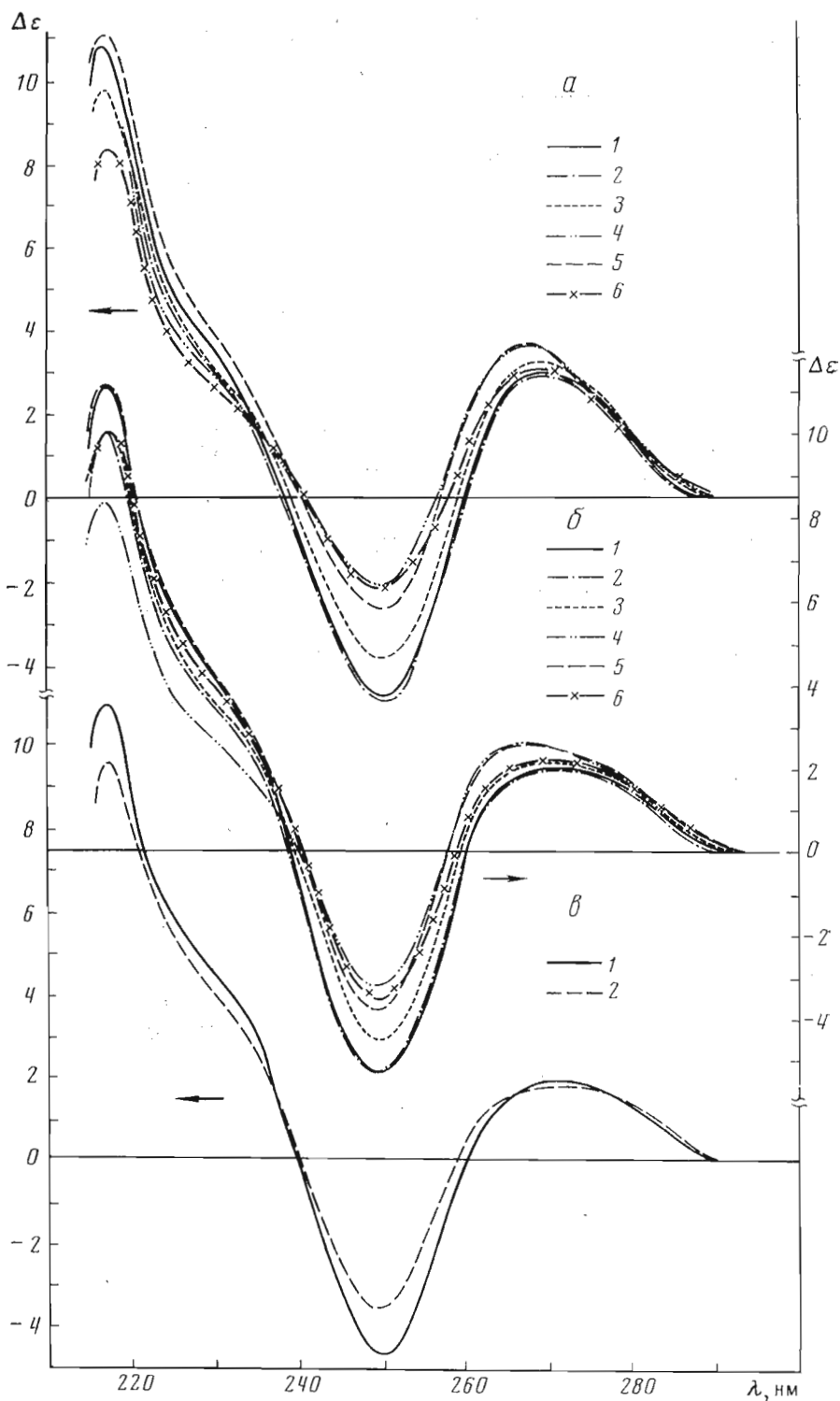


Рис. 1. Кривые КД амидов $d(pA)_2$ (а); амидов $d(pA)_3$ (б) и амидов $d(pA)_4$ (в) (для сравнения приведены кривые КД незамещенных олигонуклеотидов). а: 1 — $d(pA)_2$, 2 — $NH_2-d(pA)_2$ (I), 3 — $C_6H_7NH-d(pA)_2$ (II), 4 — $C_6H_5CH_2NH-d(pA)_2$ (III), 5 — $Phe-d(pA)_2$ (IV), 6 — $Trp-d(pA)_2$ (V); б: 1 — $d(pA)_3$, 2 — $NH_2-d(pA)_3$ (VI), 3 — $C_6H_7NH-d(pA)_3$ (VII), 4 — $C_6H_5CH_2NH-d(pA)_3$ (VIII), 5 — $Phe-d(pA)_3$ (IX), 6 — $Trp-d(pA)_3$ (X); в: 1 — $d(pA)_4$, 2 — $Phe-d(pA)_4$ (XI). Условия: $0,01$ М фосфатный буфер (рН 7,3), 20° , концентрация $1 \cdot 10^{-4}$ М

ли к появлению у этих соединений широкого положительного максимума КД в области 230—280 нм [5]. Именно вклад этого положительного циркулярно-дихроичного поглощения является причиной наблюдаемого изменения КД $d(pA)_n$ при введении в 5'-положение заместителя ароматической природы. В случае $C_3H_7NH-d(pA)_2$ (II) и $C_3H_7NH-d(pA)_3$ (VII) небольшие изменения КД, вероятно, также отражают наличие гидрофобных взаимодействий радикала пропила с аденином, но гораздо более слабых, чем в случае производных ароматических аминокислот и аминов. Таким образом, величина изменения КД качественно коррелирует с эффективностью взаимодействия 5'-заместителя и остатком аденина.

Вывод о взаимодействии ароматических радикалов аминок компонента с адениновыми остатками находит ряд других экспериментальных подтверждений. Как видно из табл. 1, в $Trp-d(pA)_2$ (V) и $Trp-d(pA)_3$ (X) наблюдается сильное тушение флуоресценции остатка триптофана по сравнению с метиловым эфиром N-(метилфосфо)-триптофана. Аномально низкий квантовый выход флуоресценции соединений (V) и (X) обусловлен взаимодействием остатков триптофана и аденина.

Ход температурной зависимости КД $Phe-d(pA)_2$ (IV), представленный на рис. 2, можно интерпретировать следующим образом: на процесс постепенного разрушения стэкинга оснований при повышении температуры, который сопровождается резким уменьшением амплитуды двойного эффекта Коттона, накладывается процесс «отрыва» ароматического радикала аминокислоты от гетероциклических оснований димера, приводящий к некоторому увеличению амплитуды двойного эффекта Коттона с ростом температуры. Поэтому кривая «плавления» $Phe-d(pA)_2$ имеет более пологий характер, чем аналогичная кривая для $d(pA)_2$ (рис. 2).

В спектре ПМР $Phe-d(pA)_2$ сигналы от 8-Н-протонов 3'- и 5'-связанных аденозиновых остатков и от протонов бензольного кольца фенилаланина смещаются в сильное поле на 23,12 и 37 Гц соответственно по сравнению с аналогичными сигналами для $d(pA)_2$ и метилового эфира N-(метилфосфо)-фенилаланина ($Phe-pOMe$) (табл. 2). Эти данные не только подтверждают факт взаимодействия бензольного кольца с остатками аденина [9], но и позволяют исключить возможность внедрения ароматической системы 5'-заместителя между плоскостями гетероциклических оснований данного олигонуклеотида, поскольку в этом случае сигналы от 8-Н-протонов претерпевали бы сдвиги в слабое поле [10, 11]. Отсутствие такого внедрения или интеркалирования следует также из различного характера изменений, вносимых в КД олигонуклеотидов заместителями, находящимися в 5'-положении (соединения (I) — (XI)) или у межнуклеотидного атома фосфора (в $d(TrA)$ -амидах [5] и в фосфотриэфирных производных $d(ApA)$ [12]).

На основании полученных результатов наиболее вероятной конформацией амидов $d(pA)_n$ (соединения (III) — (V), (VIII) — (XI)) представляется конформация, которая характеризуется сближением ароматического радикала аминок компонента с аденином 5'-концевого нуклеотида. Плоскости указанных ароматических систем перекрываются, а их ориен-

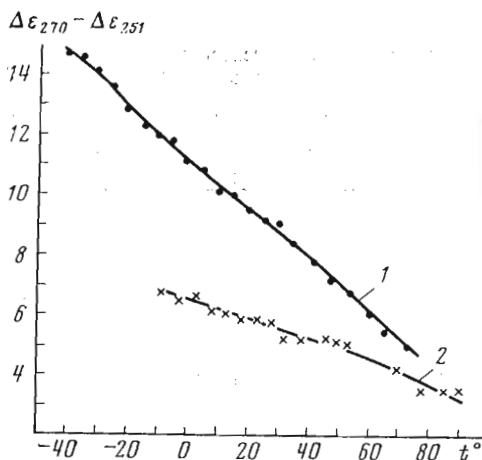


Рис. 2. Зависимость от температуры амплитуды двойного эффекта Коттона ($\Delta\epsilon_{270} - \Delta\epsilon_{251}$) $d(pA)_2$ (I) и $Phe-d(pA)_2$ (III) (2). Растворитель 5 M LiCl, концентрация $1 \cdot 10^{-4}$ M

Относительные квантовые выходы флуоресценции (ϕ) и длины волн максимумов излучения ($\lambda_{\text{макс}}$) триптофановых производных

Соединения ¹	ϕ	$\lambda_{\text{макс}}$, нм	Соединения ²	ϕ	$\lambda_{\text{макс}}$, нм
Трп	100	362	Трп-pOMe	130	364
Трп-pOMe *	73	364			
Трп-pA **	14	364	Трп-d(pA) ₃ (X)	25	364
Трп-dpA ***	14	364			
Трп-d(pA) ₂ (V)	14	364	Трп-d(pA) ₃ ·2poly (U)	32	364
Трп-d(pA) ₃ (X)	14	364			

* Метилловый эфир N-(метилфосфо)-триптофана. ** Метилловый эфир аденилил-(5'-N)-триптофана. *** Метилловый эфир дезоксиаденилил-(5'-N)-триптофана.

¹ 0,02 М фосфатный буфер (рН 7,5), 22°, концентрация $1,9 \cdot 10^{-5}$ М (по Трп), λ возбуждения 285 нм. * 0,004 М фосфатный буфер (рН 7,5), 0,2 М NaCl, 0,075 М MgCl₂, 2°, концентрация $8 \cdot 10^{-3}$ М (на остаток нуклеотида), λ возбуждения 285 нм.

Таблица 2

Химические сдвиги (δ) сигналов от протонов отдельных групп d(pA)₂, Phe-d(pA)₂ (III) и Phe-pOMe в D₂O (28°)

Соединение	Концентрация, М	δ *, м.д.						протоны бензольного кольца **
		8-Н (5')	8-Н (3')	2-Н (5')	2-Н (3')	1'-Н (5')	1'-Н (3')	
d(pA) ₂	$1,0 \cdot 10^{-2}$	8,47	8,44	8,11	7,99	6,34	6,22	—
Phe-d(pA) ₂ (III)	$8,9 \cdot 10^{-3}$	8,35	8,21	8,10	7,96	6,26 **	6,26 **	7,04
Phe-pOMe	$1,1 \cdot 10^{-2}$	—	—	—	—	—	—	7,41

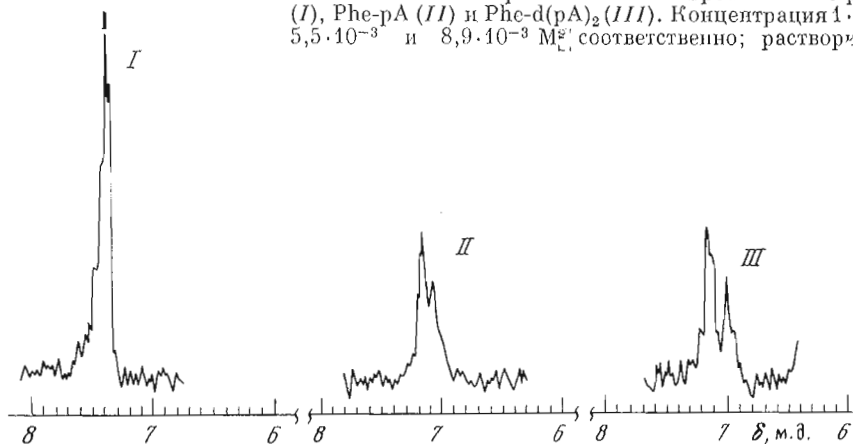
* Отнесение сигналов от 8-Н-протонов проводили путем избирательного дейтерирования [8]. Отнесение сигналов от протонов оснований к 5'- и 3'-связанным остаткам аденозина носит предположительный характер.

** Измерены по центру мультиплета.

тация, возможно, такая же, как в соответствующих аминокислотных производных мононуклеотидов [9]. Следующие экспериментальные факты подтверждают это предположение: 1) квантовые выходы флуоресценции остатка Трп в Трп-dpA, Трп-d(pA)₂ (V) и Трп-d(pA)₃ (X) одинаковы (табл. 1); 2) как видно из рис. 3, в спектрах ПМР Phe-d(pA)₂ (II) и метилового эфира аденилил-(5'-N)-фенилаланина (Phe-pA) имеется характерное раздвоенное резонанса бензольных протонов (ср. с Phe-pOMe), т. е. в обоих случаях на эти протоны действует одинаковый градиент магнитного поля.

Взаимодействие радикала аминокислотного компонента с концевым гетероциклом не приводит к заметному изменению геометрии стэкинга, характерного для ди-, три- и тетрамеров, поскольку кривые КД амидов d(pA)_n (соединения (IV), (IX) и (XI), рис. 1) как бы повторяют кривые КД соответствующих олигомеров d(pA)₂, d(pA)₃ и d(pA)₄ (с учетом, конечно, изменений оптических свойств, обусловленных аминокислотным компонентом). Относительное расположение и эффективность взаимодействия ароматических радикалов и 5'-концевого аденина, по-видимому, не зависят от длины цепи d(pA)_n. Так, сравнивая кривые КД амидов d(pA)₂ (рис. 1, а) и d(pA)₃ (рис. 1, б), можно обнаружить определенное сходство в характере изменений КД d(pA)₂ и d(pA)₃, вносимых заместителями одинаковой природы. С ростом длины цепи различия в КД между замещенными и свободными d(pA)_n сглаживаются (соединения (IV), (IX) и (XI), рис. 1), так как отно-

Рис. 3. ЯМР-спектры бензольных протонов Phe-pOMe (I), Phe-pA (II) и Phe-d(pA)₂ (III). Концентрация $1 \cdot 10^{-2}$; $5,5 \cdot 10^{-3}$ и $8,9 \cdot 10^{-3}$ M², соответственно; растворитель



сительный вклад взаимодействия остатка аминокислоты с основанием в КД всей молекулы уменьшается.

Комплексообразование d(pA)_n и их амидов с poly(U) фиксировали с помощью метода КД. О наличии комплекса судили по существенному отклонению кривой КД смеси компонентов при низкой температуре (рис. 4, 1) от кривой КД смеси при высокой температуре (рис. 4, 2) и от аддитивной расчетной кривой при низкой (рис. 4, 3) и высокой (рис. 4, 4) температурах. Как было показано ранее [4], в условиях, использованных для комплексообразования (табл. 3), образуются, как правило, трехспиральные комплексы, в которых одна из спиралей состоит из олигодезоксиаденилатных звеньев. Температуры плавления всех изученных комплексов (табл. 3) были определены на основании исследования зависимости циркулярно-дихроичного поглощения при 260 нм ($\Delta\epsilon_{260}$) от температуры. По величине температуры плавления судили о термической устойчивости комплексов.

Сравнение кривых КД большого набора комплексов d(pA)_n или их амидов с poly(U), полученных в условиях, указанных в табл. 3, показало, что независимо от наличия заместителя в 5'-положении d(pA)_n и его природы, длины олигонуклеотидной цепи, состава и ионной силы буфера, концентрации нуклеотидного материала кривые КД комплексов, как правило, идентичны и имеют вид, представленный на рис. 4, 1. Вид кривых КД комплекса не изменяется также при использовании в качестве матрицы фрагментированной poly(U) (M 19 000—20 000) и в качестве олигонуклеотидного компонента эквимолекулярной смеси Phe-d(pA)₃ и d(ApApA). Ввиду идентичности спектров КД геометрические параметры спирали должны быть близки для всех указанных комплексов. В связи с этим можно предположить, что радикалы аминокислотных остатков удалены из внутренней части спирали и не мешают перекрыванию плоскостей гетероциклических оснований в местах разрыва псевдополидезоксиаденилатного тяжа, несмотря на то что в амидах олигодезоксиаденилатов ароматические радикалы аминокислотных остатков обладают средством к гетероциклам, обуславливающим особую конформацию этих соединений вне комплекса (см. выше). Аналогичный вывод о расположении бензилиденовых остатков вне трехцепочечной спирали был сделан при изучении комплексов 2',3'-бензилиденовых производных олигоаденилатов с poly(U) [13].

Несмотря на идентичность спектров КД, термическая устойчивость комплексов амидов d(pA)_n и poly(U) меньше, чем устойчивость комплексов немодифицированных олигомеров (с той же длиной цепи) и poly(U) (ср. в табл. 3 системы 4 и 6; 7 и 10—12, 16; 9 и 13; 18 и 19). Это соответствует данным, полученным ранее в нашей лаборатории [4]. Термическая устойчивость является функцией структуры радикала аминокислотного компонента и длины

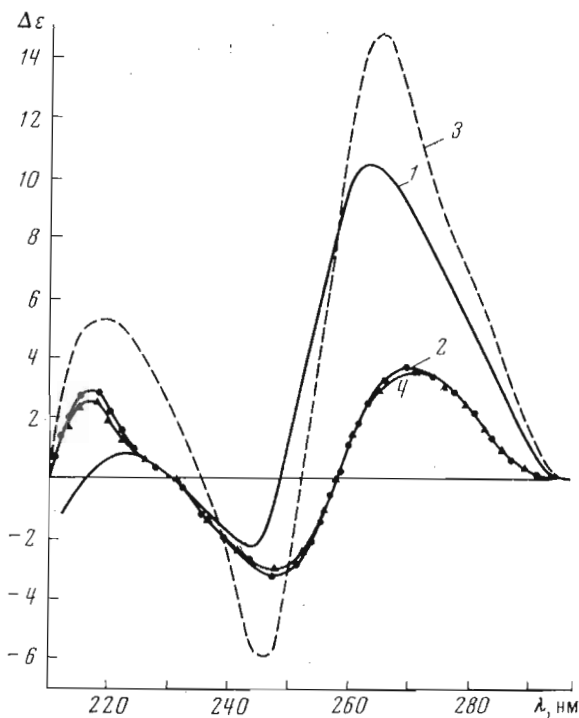


Рис. 4. Кривые КД комплекса $d(pA)_3 \cdot 2poly(U)$ при 3° (1) и 35° (2), расчетные кривые КД для смеси компонентов комплекса $d(pA)_3 + 2poly(U)$ при 3° (3) и 35° (4). Условия: $0,05$ М трис-НСI-буфер (рН 7,5), $0,1$ М NaCl и $0,01$ М $MgCl_2$, общая нуклеотидная концентрация $1 \cdot 10^{-4}$ М

олигонуклеотидной цепи амида $d(pA)_n$. Дестабилизирующее действие радикала аминоконпонента тем больше, чем существеннее изменения, вносимые в КД олигомера 5'-заместителем. Например, в системах 7, 10, 11 и 12 (табл. 3) понижение температуры плавления коррелирует с уменьшением амплитуды отрицательного максимума $d(pA)_3$ и соединений (VI), (VII) и (IX) (рис. 1, б). Далее, при переходе от комплекса $d(pA)_2 \cdot 2 poly(U)$ (табл. 3, система 4) к комплексу $Phe-d(pA)_2 \cdot 2 poly(U)$ (табл. 3, система 6) температура плавления уменьшается на 13° , а при переходе от $d(pA)_4 \cdot 2 poly(U)$ (табл. 3, система 18) к $Phe-d(pA)_4 \cdot 2 poly(U)$ (табл. 3, система 19) — только на 5° . Соответственно различия в КД $d(pA)_2$ и $Phe-d(pA)_2$ существенны (рис. 1, а), а в случае $d(pA)_4$ и $Phe-d(pA)_4$ они менее выражены (рис. 1, в).

Метод КД не выявил эффекта включения амидных радикалов в комплекс с заполнением мест связывания на матрице $poly(U)$ или путем интеркалирования. Однако результаты исследования с помощью этого метода не позволяют дать однозначный отрицательный ответ на вопрос об отсутствии интеркалирования, так как, согласно данным Габбея и соавт. [14], интеркалирование ароматических радикалов в спирали нуклеиновых кислот может практически не сказываться на спектрах КД. Для более детального изучения вопроса о характере расположения амидного радикала в комплексе и выяснения причин дестабилизирующего влияния его на комплекс нами был использован флуоресцентный метод. Были изучены флуоресцентные свойства комплекса $Trp-d(pA)_3 \cdot 2 poly(U)$ (табл. 3, система 16), содержащего флуоресцирующий радикал — остаток триптофана. Квантовый выход флуоресценции (ϕ) комплекса больше, чем ϕ $Trp-d(pA)_3$ (X), но существенно меньше, чем ϕ $Trp-pOMe$ (табл. 1), т. е.

Температура плавления комплексов олигодезоксиаденилатов и их амидов с poly (U) в различных условиях

Состав буферных растворов — система 1—13: 0,004 М фосфат, 0,2 М NaCl, 0,075 М MgCl₂, pH 7,3; система 14: 0,1 М NaCl, 0,01 М MgCl₂, 0,05 М трис-HCl, pH 7,25; система 15: 1 М NaCl, 0,05 М трис-HCl, pH 7,2; система 16—19: 0,004 М фосфат, 0,2 М NaCl, 0,075 М MgCl₂, pH 7,3. Соотношение компонентов (U:A) при смешении 2:1; в системах 2,4 и 6—1:1

№ системы	Олигомерный компонент комплекса	Общая нуклеотидная концентрация, М	Т.пл., °C (±1°)
1	d(pA) ₂	10 ⁻⁴	2
2	»	10 ⁻⁴	9
3	»	10 ⁻²	—
4	»	10 ⁻²	34
5	Phe-d(pA) ₂ (IV)	10 ⁻²	15
6	»	10 ⁻²	21
7	d(pA) ₃	10 ⁻⁴	20
8*	»	10 ⁻⁴	19
9	»	10 ⁻²	40
10	NH ₂ -d(pA) ₃ (VI)	10 ⁻⁴	20
11	C ₃ H ₇ NH-d(pA) ₃ (VII)	10 ⁻⁴	16
12	Phe-d(pA) ₃ (IX)	10 ^{-4*}	14
13	»	10 ⁻²	36
14	»	10 ⁻²	24
15	»	10 ⁻²	27
16	Trp-d(pA) ₃ (X)	10 ⁻⁴	12
17	Phe-d(pA) ₃ (IX) + +d(ApApA)	10 ⁻²	54
18	d(pA) ₄	10 ⁻⁴	31
19	Phe-d(pA) ₄ (XI)	10 ⁻⁴	26

* Фрагментированная poly(U), M 19 000—20 000.

флуоресценция в комплексе частично потушена и, следовательно, индольное кольцо остатка триптофана каким-то образом взаимодействует со спиралью. Однако это взаимодействие не сопровождается внедрением индольного кольца между гетероциклическими основаниями (интеркалированием). Интеркалирование должно было привести к полному тушению флуоресценции [10]. Как видно из рис. 5, образование комплекса, наоборот, сопровождается повышением интенсивности флуоресценции, причем этот процесс происходит кооперативно (рис. 5, б). Отсутствие интеркалирования также подтверждается тем фактом, что остатки триптофана в комплексе доступны йодид-анионам. Как следует из рис. 6, йодид калия тушит флуоресценцию триптофана как в полностью образованном (рис. 6, 1), так и в диссоциированном комплексе (рис. 6, 2). Тушение уменьшается при образовании комплекса, так как, по-видимому, триптофан частично экранирован отрицательно заряженными фосфатными группами, но остается достаточно выраженным. Интеркалирование, например, в случае взаимодействия красителей и ДНК [15] делает молекулы красителей недоступными для йодид-анионов.

Изучение молекулярной модели комплекса Trp-d(pA)₃·2 poly(U) показало, что остаток триптофана может располагаться в малой бороздке тройной спирали (большая бороздка «занята» вторым тяжем poly(U) [16]). Здесь возможно взаимодействие индольного кольца и N³-участка аденинового кольца, приводящее к фиксации остатка триптофана относительно

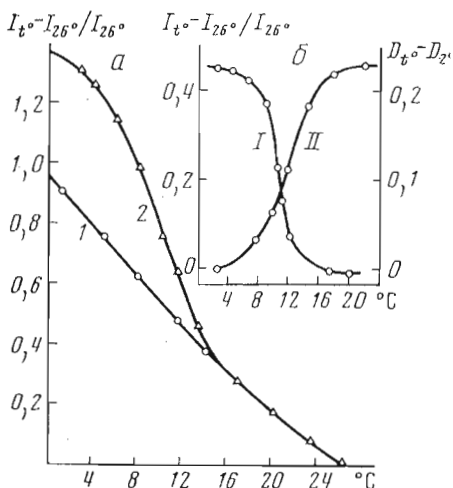


Рис. 5

Рис. 5а. Температурная зависимость относительного прироста интенсивности флуоресценции $\text{Trp-d(pA)}_3(\text{X})$ (1) и $\text{Trp-d(pA)}_3 \cdot 2 \text{ poly(U)}$ (2). Условия: 0,004 М фосфатный буфер (рН 7,5), 0,2 М NaCl и 0,075 М MgCl_2 ; общая нуклеотидная концентрация $8 \cdot 10^{-5}$ М, λ возбуждения 285 нм, λ флуоресценции 365 нм. б. I — разностная кривая для кривых 2 и I, II — кривая плавления комплекса (по поглощению при 260 нм); условия — см. а

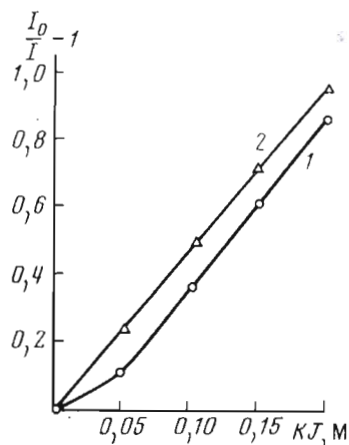


Рис. 6

Рис. 6. Кривые тушения флуоресценции $\text{Trp-d(pA)}_3 \cdot 2 \text{ poly(U)}$ йодидом калия при 2° (1) и 25° (2). Условия: 0,004 М фосфатный буфер (рН 7,5), 0,075 М MgCl_2 , 0,2 М (NaCl + KI). I_0 и I — интенсивности флуоресценции при нулевой и указанной на рисунке концентрации KI. Общая нуклеотидная концентрация $8 \cdot 10^{-5}$ М. λ возбуждения 285 нм, λ флуоресценции 365 нм

спирали. Аналогичное расположение в спирали комплекса вероятно и для радикалов аминокомпонентов другой структуры.

Фиксация остатка триптофана в области малой бороздки спирали приводит к тому, что взаимодействие его с гетероциклическими основаниями в комплексе $\text{Trp-d(pA)}_3 \cdot 2 \text{ poly(U)}$ меньше, чем в Trp-d(pA)_3 , о чем свидетельствует больший квантовый выход флуоресценции комплекса (табл. 1). В связи с этим переход от спирализованного состояния комплекса к расплавленному энергетически более выгоден в случае комплекса $\text{Trp-d(pA)}_3 \cdot 2 \text{ poly(U)}$, чем в случае комплекса с участием немодифицированного d(pA)_3 . Последнее объясняет понижение температуры плавления комплекса $\text{Trp-d(pA)}_3 \cdot 2 \text{ poly(U)}$ по сравнению с температурой плавления комплекса $\text{d(pA)}_3 \cdot 2 \text{ poly(U)}$, а также дестабилизирующее действие других амидных радикалов. Становится понятной и зависимость величины дестабилизации от структуры амидного радикала (см. выше): чем больше его взаимодействие с соседним основанием в модифицированном олигонуклеотиде, тем значительнее уменьшение этого взаимодействия при образовании комплекса и тем больше дестабилизация комплекса.

Поскольку введение заместителя в 5'-положение d(pA)_n понижает прочность комплексов этих олигомеров с poly(U) , необходимо рассмотреть возможности их стабилизации. Анализ данных, приведенных в табл. 3, показывает, что увеличение общей нуклеотидной концентрации в 100 раз (ср. системы 7 и 9, 12 и 13) приводит к повышению температуры плавления приблизительно на одинаковую величину (20—22°) для комплексов с участием замещенных и свободных олигонуклеотидов. При уменьшении длины d(pA)_n температура плавления комплексов существенно понижается (ср. табл. 3, системы 2, 7 и 18, 5 и 13, 12 и 19). Поэтому комплекс $\text{Phe-d(pA)}_2 \cdot 2 \text{ poly(U)}$ (табл. 3, системы 5 и 6) удалось получить только при

10^{-2} М концентрации. Для системы $d(pA)_2 - poly(U)$ комплекс был обнаружен при эквимолекулярном соотношении компонентов и 10^{-4} М концентрации (табл. 3, система 2), тогда как повышение концентрации в 100 раз (табл. 3, системы 3 и 4) затрудняло комплексообразование из-за агрегации и образования нуклеотидного геля, что, возможно, связано с большой ионной силой использованного буфера. В системе 1 (табл. 3) образования полноценных комплексов, как это следовало из вида кривых КД, не происходило. Изучение влияния состава буферных смесей на устойчивость комплексов (табл. 3, системы 13—15) показало, что наиболее резкое повышение температуры плавления вызывает увеличение концентрации ионов Mg^{2+} (система 13).

Таким образом, резюмируя результаты проведенной работы, можно отметить, что способность ароматических радикалов аминокислот (аминов) взаимодействовать с гетероциклическими основаниями в ковалентно-связанных нуклеотидил-(5'-N)-аминокислотах [5] сохраняется в том случае, когда основания уложены в стопку — в амидах $d(pA)_n$. В отличие от амидов динуклеотидов со слабым стэкингом оснований, как, например, Phe-pGpU [5], взаимодействие ароматического радикала с аденином 5'-концевого нуклеотида не нарушает стэкинг-взаимодействий как в $d(pA)_2$, так и в других $d(pA)_n$.

Присутствие заместителя в 5'-положении $d(pA)_n$ не сказывается на стехиометрии комплексов, образуемых ими с $poly(U)$, и на геометрических параметрах спиралей, но приводит к дестабилизации комплексов. Все эти моменты необходимо учитывать при проведении матричных реакций. Тестом на получение комплекса правильной структуры является определенный профиль кривой КД.

Заслуживает внимания отсутствие интеркалирования боковых радикалов фенилаланина и триптофана в полинуклеотидную спираль. Этот факт впервые обнаружен в настоящей работе при изучении модельных систем, предполагающих пространственное сближение ароматических аминокислот и нуклеиновых оснований, уложенных в спираль. Он показывает возможность определенного разнообразия контактов ароматических систем, встречающихся в белках и нуклеиновых кислотах.

Экспериментальная часть

Амиды $d(pA)_2$ (соединения (I) — (IV)), $d(pA)_3$ (соединения (VI) — (IX)) и $d(pA)_4$ (соединение (XI)) были синтезированы ранее в нашей лаборатории [4]; Trp- $d(pA)_2$ (соединение (V) и Trp- $d(pA)_3$ (соединение (X)) получены по методике [17], Trp-pOMe и Phe-pOMe — по методике [18]. При синтезе соединений (IV), (V), (IX) — (XI) использовали метиловые эфиры L-фенилаланина и DL-триптофана. Poly(U) (M 600 000—700 000, производство СКТБ БАВ Главмикробиопрома, Новосибирск) очищали от примесей белка и низкомолекулярных фрагментов по методике, описанной для poly(A) [19].

Коэффициенты молярного поглощения в расчете на мономерное звено: $\epsilon_{d(pA)_2}$ 12 450 (λ 258 нм), $\epsilon_{d(pA)_3}$ 11 340 (λ 257 нм) и $\epsilon_{d(pA)_4}$ 11 000 (λ 257 нм) [20]; ϵ амидов $d(pA)_n$ при указанных выше длинах волн принимали равными ϵ незамещенных олигонуклеотидов; $\epsilon_{poly(U)}$ 9900 (λ 260 нм) [21].

Растворы $d(pA)_n$ и их амидов для измерения КД готовили в 0,01 М фосфатном буфере (рН 7,3), нуклеотидная концентрация составляла 10^{-4} М. (Здесь и далее концентрация нуклеотидного материала выражается в расчете на мономерное звено.) Изучение температурной зависимости КД $d(pA)_2$ и Phe- $d(pA)_2$ проводили в 5 М LiCl.

Измерение флуоресценции триптофановых производных моно- и олигонуклеотидов проводили в нейтральных буферных растворах (табл. 1) при 10^{-4} М концентрации нуклеотидного материала.

Растворы комплексов готовили в нейтральных буферных системах различной ионной силы, как правило содержащих ионы Mg^{+2} (табл. 3). Соотношение компонентов комплексов 1А : 2 U или 1А : 1U в расчете на моонуклеотидное звено. Общая нуклеотидная концентрация составляла 10^{-2} и 10^{-4} М. Перед оптическими измерениями смеси выдерживали 15—18 ч при 2° .

Измерения КД выполняли в дихрографе «Jouan-II» (Франция) в кварцевых кюветах (1 и 0,01 см), которые помещали в термостатированное кюветное отделение. Чувствительность измерений составляла $1 \cdot 10^{-5}$ ОЕ/мм. Ошибка в определении циркулярно-дихроичного поглощения в области 230—320 нм не превышала 5%. Температуру в кюветном отделении регистрировали с помощью медно-константановой термопары.

Флуоресценцию измеряли в спектрофлуориметре «Aminco-Bowman» (США) в термостатированных кварцевых кюветах (1 см) под углом 90° к направлению возбуждающего света. Квантовые выходы флуоресценции (ϕ) рассчитывали относительно ϕ триптофана, принятого за 100 [22]. Поправку на экранирующий эффект нуклеотидов рассчитывали как предложено ранее [23]. Ошибка в определении ϕ не более 20%, в определении $\lambda_{\text{макс}}$ флуоресценции ± 3 нм.

Спектры ПМР были записаны на установке XL-100 «Varian» (США). В качестве растворителя использовали D_2O (99,6%). Внутренним стандартом служил *трет*-бутиловый спирт. Точность измерения химических сдвигов составляла $\pm 0,3$ Гц. Концентрация веществ $\sim 10^{-2}$ М, температура измерений 28° .

Авторы выражают глубокую благодарность Б. В. Тяглову и С. В. Зенину за предоставление спектров ПМР дидезоксиаденилата и его фенилаланинового производного и д-ру В. Гушльбауэру за обсуждение результатов работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Shabarova Z. A., Prokofiev M. A. (1970) FEBS Lett., **11**, 237—240.
2. Недбай В. К., Соколова Н. И., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. (1972) Докл. АН СССР, **205**, 1114—1116.
3. Гатинская Л. Г., Соколова Н. И., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. (1974) Изв. АН СССР. Сер. хим., 221—223.
4. Гатинская Л. Г., Смирнов В. В., Соколова Н. И., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. (1973) Докл. АН СССР, **212**, 363—366.
5. Gromova E. S., Tjaglov B. V., Shabarova Z. A. (1971) Biochim. et biophys. acta, **240**, 1—11.
6. Гринева Н. И., Зарытова В. Ф., Кабашева Г. Н., Кнорре Д. Г., Козоровицкий А. Я. (1971) Докл. АН СССР, **198**, 582—584.
7. Grineva N. J., Kozorovitsky A. Ja., Lomakina T. S. (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun., **46**, 1603—1606.
8. Bullock R. J., Jardetzky O. (1964) J. Org. Chem., **29**, 1988—1990.
9. Громова Е. С., Зенин С. В., Сергеев Г. Б., Тяглов Б. В., Шабарова З. А. (1974) Структура и функции нуклеиновых кислот и нуклеопротеидов (материалы симпозиума, посвященного памяти академика А. Н. Белозерского), стр. 222, изд. МГУ, М.
10. Helene C., Dimicoli J.-L. (1972) FEBS Lett., **26**, 6—10.
11. Leng M., Drocourt J.-L., Helene C., Ramstein J. (1974) Biochimie, **56**, 887—891.
12. Miller P. S., Fang K. N., Kondo N. S., Ts'o P. O. P. (1971) J. Amer. Chem. Soc., **93**, 6657—6664.
13. Барам Г. И., Будкер В. Г., Гринева Н. И., Кнорре Д. Г., Козоровицкий А. Я., Шамовский Г. Г. (1971) Докл. АН СССР, **201**, 95—98.
14. Gabbay E. J., Sarford R., Baxter C. S. (1972) Biochemistry, **11**, 3429—3435.
15. Корсунский В. И., Наберухин Ю. И. (1972) Молекулярн. биология, **6**, 737—746.
16. Arnott S., Bond P. J. (1973) Nature New Biol., **244**, 99—101.
17. Соколова Н. И., Гатинская Л. Г., Недбай В. К., Рухляда Н. Н., Смирнов В. Д., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. (1971) Докл. АН СССР, **196**, 613—616.
18. Moffat J. G., Khorana H. G. (1961) J. Amer. Chem. Soc., **83**, 649—658.
19. Прессман А. С., Шамовский Г. Г. (1971) Молекулярн. биология, **5**, 375—383.
20. Cassani G. R., Bollum F. J. (1969) Biochemistry, **8**, 3928—3936.

21. Thrierr J. C., Leng M. (1972) *Biochim. et biophys. acta*, 272, 238—351.
22. Parker C. A., Rees W. T. (1960) *Analyst*, 85, 587—600.
23. Rigler R., Cronvall E., Hirsch R., Pachmann U., Zachau H. G. (1970) *FEBS Lett.* 11, 320—323.

Поступила в редакцию
24.IV.1975

CONFORMATION OF AMIDATES OF OLIGODEOXYADENYLIC ACIDS AND THE PROPERTIES OF THEIR COMPLEXES WITH POLYURIDYLIC ACID

GROMOVA E. S., DOLINNAYA N. G., SMIRNOV V. V.,
SHABAROVA Z. A., PROKOFIEV M. A.

*Department of Chemistry and Laboratory of Bioorganic Chemistry,
M. V. Lomonosov State University, Moscow*

With the help of CD, fluorescence and PMP spectroscopy techniques peculiarities of the solution conformation were studied for a series of amidates of oligodeoxyadenylates and their complexes with poly(U). In amidates $d(pA)_n$ the aromatic substituents were shown to interact with 5'-terminal adenine without intercalating between the bases and without disturbing the geometry of adenine stacking. The interaction between the aromatic systems does not depend on the length of oligonucleotide chain. The localization of aromatic radicals with respect to the nearest adenine is probably the same as with the amidates of 5'-adenylic acid. The amidates $d(pA)_n$ form with poly(U) triple-stranded helical complexes (1A : 2U) whose geometrical parameters coincide with those of complexes $d(pA)_n \cdot 2poly(U)$ and do not depend on the amino component, the length of oligonucleotide chain, the composition and ionic strength of buffer and the concentration of nucleotide material. The thermal stability of amidate $d(pA)_n \cdot 2poly(U)$ complexes is lower than that of $d(pA)_n \cdot 2 poly(U)$ complexes; the most destabilizing are the residues of aromatic amino acids. It is suggested that the aromatic radicals are not intercalated in the helix and are fixed in the small groove of the helix at the expense of their interaction with the N³ part of the adenine cycle.
