



УДК 547.963.3

ИЗУЧЕНИЕ КОМПЛЕМЕНТАРНЫХ КОМПЛЕКСОВ,
ОБРАЗОВАННЫХ ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДАМИ
РАЗЛИЧНОЙ ДЛИНЫ*Долинная Н. Г., Громова Е. С., Ильина Е. В.,
Сергеева Н. Ф., Шабарова З. А., Прокофьев М. А.**Химический факультет и Межфакультетская лаборатория
биоорганической химии Московского государственного университета
им. М. В. Ломоносова*

Методами КД и УФ-спектроскопии впервые показано образование в нейтральных буферных растворах комплексов три(гекса)дезоксирибонуклеотидов, $d(pG-G-T)$, $d(pG-G-T)_2$ и $d(pA)_3$, с соответствующими комплементарными додекануклеотидами, $d(pA-C-C)_4$ и $d(pT)_{12}$. Охарактеризовано влияние общей нуклеотидной концентрации, состава буферных растворов, длины цепи компонентов комплексов и их природы на термическую устойчивость и структуру комплексов. На основании сопоставления кривых КД изученных олигомерных комплексов и кривых КД ДНК с высоким и низким содержанием G-C-пар высказано предположение о том, что короткие олигодезоксирибонуклеотиды образуют в солевом растворе виток спирали, геометрия которой близка к геометрии В-формы ДНК. Такие комплексы могут быть использованы в качестве моделей ДНК в различных биологических системах.

В последние годы разрабатываются химические методы сшивания коротких олигонуклеотидов на комплементарных матрицах [1—6]. Кажется весьма перспективным использовать для проведения матричных реакций синтетические олигодезоксирибонуклеотиды различной длины. Однако свойства олигомер-олигомерных комплексов дезокси-ряда практически не изучены [6, 7]; в последние годы появились лишь отрывочные сведения о комплексах олигодезоксирибонуклеотидов с одинаковым числом мономерных звеньев [8—15].

Настоящая работа посвящена изучению свойств и структуры комплексов, образованных три- и гексадезоксирибонуклеотидами с комплементарными додекануклеотидами, методами УФ-спектроскопии и КД; исследованные системы перечислены в таблице. При смешивании эквимольных (в расчете на мономерное звено) количеств $d(pG-G-T)$ или $d(pG-G-T)_2$ с $d(pA-C-C)_4$ и $d(pA)_3$ с $d(pT)_{12}$ (концентрация нуклеотидного материала в каждой пробе составляла 10^{-2} или 10^{-3} М) в нейтральных солевых растворах при 2° образуются спиральные олигомер-олигомерные комплексы. Существование комплементарных взаимодействий в смесях указанных олигодезоксирибонуклеотидов следует из несовпадения снятых при низкой температуре спектров КД смесей и суммарных спектров КД составляющих эти смеси компонентов (рис. 1 а, 2 и 3, кривые 1, 3). Повышение температуры вызывает резкое изменение спектров КД смесей, причем при 36° они совпадают с суммарными спектрами компонентов (рис. 1 а, 2 и 3, кривые 2 и 4). Изменение вида спектров КД комплексов при их диссоциации происхо-

**Некоторые характеристики комплексов, образованных
олигодезоксирибонуклеотидами разной длины**

Номер системы	Комплекс	Условия комплексообразования*		Определение т. пл.***			Гипохро-мия h, % (±0,5)
		буфер	c **, М	т. пл. ±1°	вид спектра	λ, нм	
(I)	d(pG-G-T)·d(pA-C-C) ₄	A	10 ⁻²	20	УФ	260	7,5
(II)	d(pG-G-T)·d(pA-C-C) ₄	A	10 ⁻³	24	КД	263	—
(III)	d(pG-G-T) ₂ ·d(pA-C-C) ₄	A	10 ⁻²	12	УФ	260	6,8
(IV)	d(pG-G-T) ₂ ·d(pA-C-C) ₄	A	10 ⁻³	27	КД	265	—
(V)	d(pA) ₃ ·d(pT) ₁₂	A	10 ⁻²	20	УФ	260	7,0
(VI)	d(pA) ₃ ·d(pT) ₁₂	A	10 ⁻³	19	КД	265	—
(VII)	d(pA) ₃ ·d(pT) ₁₂	A	10 ⁻²	17	КД	248	—
(VIII)	d(pA) ₃ ·d(pT) ₁₂	A	10 ⁻³	8	УФ	260	7,0
(IX)	d(pA) ₃ ·d(pT) ₁₂	B	10 ⁻²	9	КД	248	—

* Во всех случаях соотношение компонентов комплекса было эквимолекулярным (в расчете на мономерное звено).

** c — общая нуклеотидная концентрация (в расчете на мономерное звено).

*** Т: пл. определяли из кривых температурных зависимостей относительного изменения оптической плотности (УФ) или изменения циркулярно-дихроичного поглощения (КД) комплекса при указанной длине волны, обработанных по методике [18].

дит кооперативно, как это видно, например, из сравнения кривых 1, 5 и 2 на рис. 1 а. Образование комплексов гетерогенных олигодезоксирибонуклеотидов (см. таблицу, (I)—(IV)) сопровождается увеличением интенсивности положительной полосы в спектре КД при 260—280 нм и сдвигом точки нулевого перехода ~ 250 нм в коротковолновую область (рис. 1 и 2, кривые 1, 2). Такие изменения КД являются, по-видимому, наиболее характерными при образовании комплементарных комплексов нуклеотидной природы [16]. Спектры КД комплексов гомогенных олигодезоксирибонуклеотидов (системы (V)—(VII)) не подчиняются этой закономерности (рис. 3, кривые 1, 2). В отличие от изменений на спектрах КД, обусловленных разрушением спиральной структуры комплексов, для отдельных компонентов смесей при повышении температуры наблюдается лишь изменение амплитуды сложного эффекта Коттсена в интервале 220—300 нм при сохранении формы спектров и положения точек нулевого перехода (рис. 4). Исключение составляет гексануклеотид d(pG-G-T)₂, для которого повышение температуры влечет за собой сужение положительного максимума КД в области 255 нм (рис. 4 а). Этот эффект связан, по-видимому, с самоассоциацией гексануклеотида при низкой температуре.

Образование комплементарного комплекса между тринуклеотидами и олигомерными матрицами обнаружено нами впервые. Попытки Нейлора и Гилхама [1] получить комплекс d(pA)₃·d(pT)₁₂ не привели к успеху, вероятно, вследствие низкой концентрации компонентов смеси (~ 10⁻⁴ М).

Для характеристики термической устойчивости комплексов олигодезоксирибонуклеотидов в различных условиях (варьировали состав, ионную силу буферов и концентрацию нуклеотидного материала, см. таблицу) были изучены кривые плавления, отражающие зависимость оптической плотности КД ($\Delta D_t - \Delta D_p$, где индекс p означает расплавленное состояние) или относительного изменения поглощения ($[(D_p - D_t)/D_p] \cdot 100\%$, метод УФ-спектроскопии) от температуры. Для того чтобы оценить температуру плавления, экспериментальные кривые плавления были обработаны по методике, описанной в работе Уленбека и соавт. [17]. Температуры плавления комплексов суммированы в таблице. Устойчивость гетерогенных систем, в состав которых входят G·C-пары (I)—(IV), заметно выше, чем устойчивость A·T-содержащих комплексов (V), (VI). При взаимодействии олигодезоксирибонуклеотидов увеличение общей нуклеотидной концент-

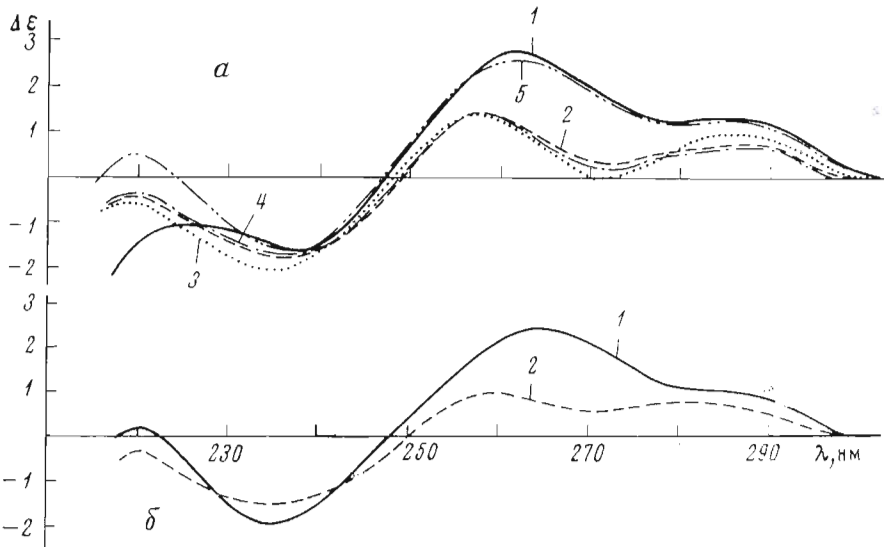


Рис. 1. Кривые КД комплекса $d(pG-G-T) \cdot d(pA-C-C)$ при $1,5^\circ$ (1), 18° (5), 36° (2); расчетные кривые КД суммы компонентов комплекса $d(pG-G-T) + d(pA-C-C)_4$ при 3° (3) и 36° (4). Условия: буфер А, общая нуклеотидная концентрация (на мономерное звено): а — 10^{-2} , б — 10^{-3} М

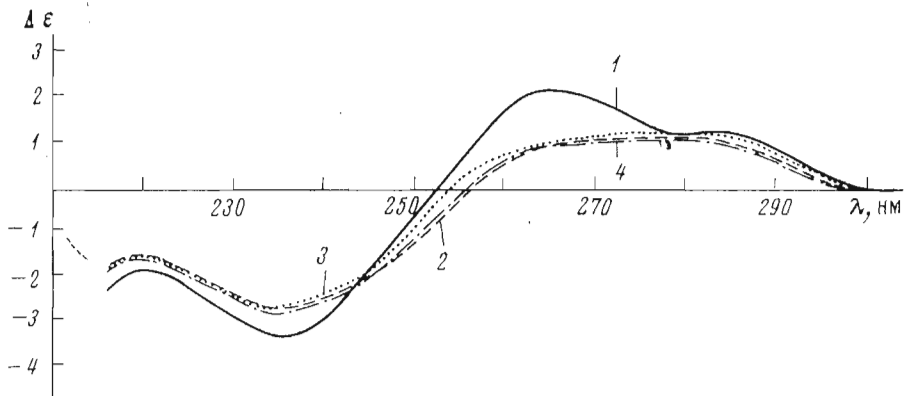


Рис. 2. Кривые КД комплекса $d(pG-G-T)_2 \cdot d(pA-C-C)_4$ при 2° (1) и 37° (2), расчетные кривые КД суммы компонентов комплекса $d(pG-G-T)_2 + d(pA-C-C)_4$ при 2° (3) и при 37° (4). Условия те же, что на рис. 1, а

рации (от 10^{-3} до 10^{-2} М) приводит к существенной стабилизации комплексов, причем этот эффект зависит от длины олигомера: если для системы $d(pG-G-T) \cdot d(pA-C-C)_4$ повышение температуры плавления составило $\sim 10^\circ$, то для системы $d(pG-G-T)_2 \cdot d(pA-C-C)_4$ эта величина уменьшается до 7° (см. таблицу). Подобная зависимость отмечалась и ранее для олигомер-полимерных комплексов [18]. Стабилизирующее действие на устойчивость комплексов оказывают ионы Mg^{2+} (ср. системы (V) и (VII)).

Введение ионов Mg^{2+} приводит к некоторому изменению профиля спектров КД $d(pA)_3 \cdot d(pT)_{12}$ (рис. 3, а, б, кривые 1), возможно, вследствие изменения геометрии спирального комплекса (например, за счет усиления «стэкинг»-взаимодействий оснований). С другой стороны, в отсутствие ионов Mg^{2+} различия между спектрами КД комплекса $d(pA)_3 \cdot d(pT)_{12}$ в спиральном и диссоциированном состоянии сглаживаются (рис. 3б, кривые 1 и 2). Поэтому в отсутствие ионов Mg^{2+} (система (VII)) нельзя исключить

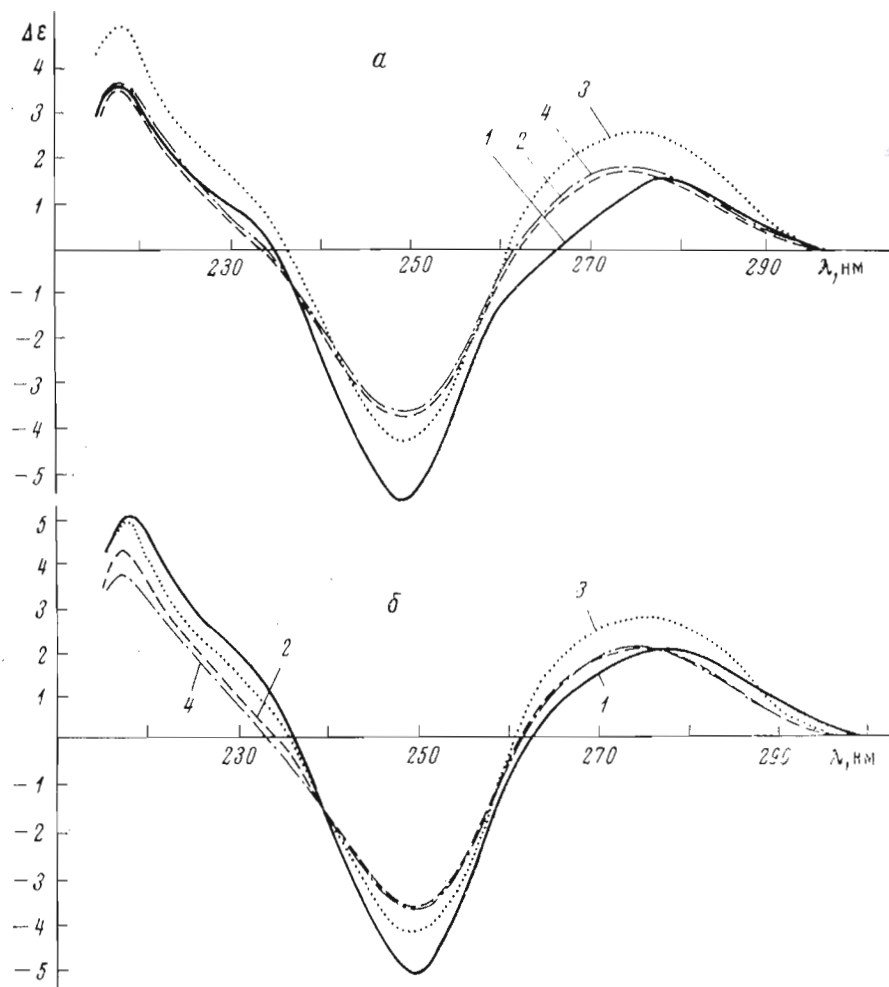


Рис. 3. Кривые КД комплекса $d(pA)_3 \cdot d(pT)_{12}$ при 2° (1) и 32° (2), расчетные кривые КД суммы компонентов комплекса $d(pA)_3 + d(pT)_{12}$ при 2° (3) и 32° (4). Условия: $c \cdot 10^{-2} \text{ M}$; а — буфер А; б — буфер Б

возможность неполного комплексообразования. По-видимому, наиболее полноценные комплексы образуются в растворах, содержащих ионы Mg^{2+} , и при концентрации компонентов 10^{-2} M (системы (I), (III), (V)).

Из кривых плавления (УФ) были определены значения гипохромии h ряда комплексов, рассчитанные по формуле

$$h = \frac{D_p - D_{2^\circ}}{D_p} \cdot 100.$$

Эти величины колеблются от 6,8 до 7,5% (таблица), т. е. не зависят существенно от нуклеотидного состава смесей, нуклеотидной концентрации и числа мономерных звеньев в том компоненте комплекса, который имеет меньшую длину цепи. По-видимому, фактором, определяющим величину гипохромии, является длина олигомерной матрицы, одинаковая для всех систем. Известно [13], что величина гипохромии может варьировать для комплексов, содержащих равное число нуклеотидных звеньев, но имеющих различия в структуре, например за счет некомплементарных включений. Тот факт, что наличие разрывов в одной из цепей изученных нами

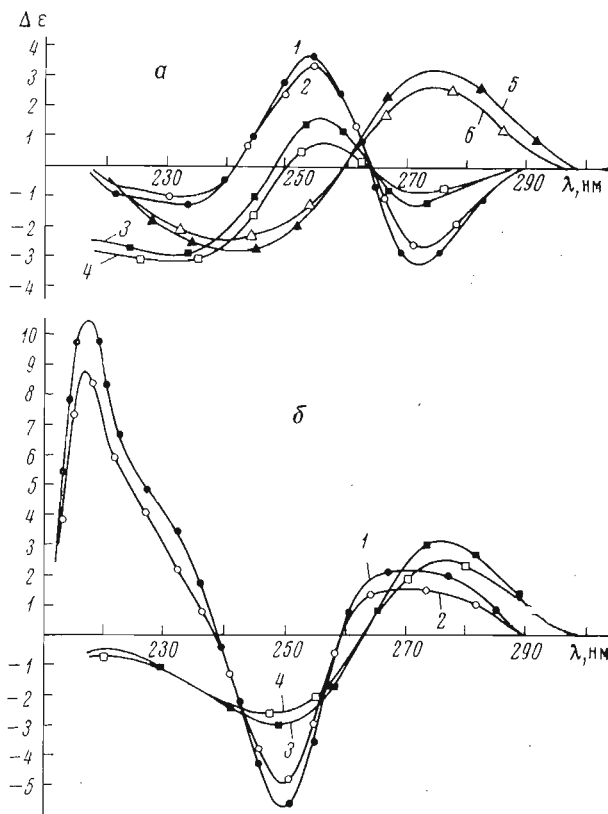


Рис. 4. Кривые КД олигодезоксирибонуклеотидов ($c 10^{-2}$ М) при различных температурах: *a* — $d(pG-G-T)$ при $1,5^\circ$ (1) и при 36° (2), $d(pG-G-T)_2$ при 2° (3) и при 37° (4), $d(pA-C-C)_4$ при $1,5^\circ$ (5) и при 37° (6) в буфере А; *b* — $d(pA)_3$ при 2° (1) и при 32° (2), $d(pT)_{12}$ при 2° (3) и при 32° (4) в буфере В

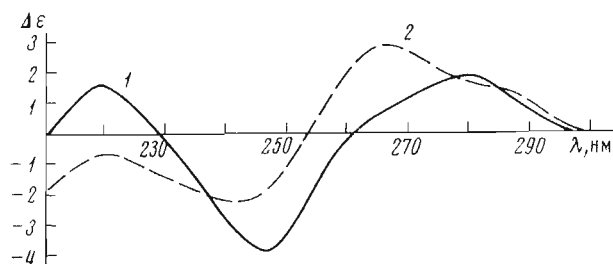


Рис. 5. Кривые КД ДНК из *Staphylococcus aureus*, 33% G + C (1) и ДНК из *Pseudomonas aeruginosa*, 64% G + C (2) в буфере А ($c 10^{-2}$ М, 20°)

комплексов не сказывается на их гипохромии, можно объяснить образованием полноценных псевдододекануклеотидов из три- и гексамеров. Длина нуклеотидной цепи одного из компонентов олигомерных комплексов все же оказывает влияние на их структуру, поскольку при переходе от системы $d(pG-G-T) \cdot d(pA-C-C)_4$ к системе $d(pG-G-T)_2 \cdot d(pA-C-C)_4$ наблюдается некоторое изменение профиля спектра КД и сдвиг в длинноволновую область точки нулевого перехода (рис. 1, *a* и 2, кривые 1).

При изучении КД комплексов олигодезоксирибонуклеотидов был обнаружен следующий интересный факт: спектры КД комплексов $d(pG-G-T) \cdot$

$\cdot d$ (pA-C-C)₄ и d (pG-G-T)₂· d (pA-C-C)₄ (рис. 1 и 2) имеют большое сходство с кривыми КД нативных ДНК из различных источников с высоким содержанием G·C-пар (до 70%), а кривые КД d (pA)₃· d (pT)₁₂ (рис. 3) похожи на кривые КД ДНК с содержанием G·C-пар ~ 30% [19, 20]. В последнем случае сходство проявляется еще более отчетливо при сравнении спектров КД системы d (pA)₃· d (pT)₁₂ с расчетным спектром КД, характерным для ДНК со 100%-ным содержанием A·T-пар [21] (расчетный спектр получен линейной экстраполяцией параметров КД ДНК с различным нуклеотидным составом). Мы исследовали КД ДНК с 33%-ным и 64%-ным содержанием G·C-пар в тех же буферных системах, которые были использованы для изучения комплексов олигодезоксирибонуклеотидов. Как видно из сравнения рис. 5 и рис. 1—3, спектры КД ДНК и олигомерных комплексов, снятые в одинаковых буферных системах, также качественно близки. На основании этих данных можно предположить, что короткие олигодезоксирибонуклеотиды образуют в солевом растворе виток спирали, геометрия которой близка к геометрии В-формы ДНК. Это предположение находится в соответствии с недавними данными Пателя и Тонели [15], которые, наблюдая при помощи ЯМР-спектроскопии взаимодействие актиномицина D с d (A-T-C-G-A-T), сделали вывод о том, что этот самокомплементарный гексадезоксирибонуклеотид образует в растворе двуспиральную структуру, аналогичную В-форме ДНК.

Следует отметить, что спектры КД двуспиральных гомополинуклеотидов [22] и полинуклеотидов с повторяющейся ди(три)нуклеотидной последовательностью [11, 22, 23], как правило, значительно отличаются от спектров КД ДНК, имеющих приблизительно тот же G·C состав [11, 21]. Это может быть связано с особыми оптическими свойствами регулярных полимерных структур, не характерными для ДНК; не исключены также некоторые отличия в пространственной организации синтетических полимерных комплексов. Комплексы олигодезоксирибонуклеотидов, по-видимому, лучше, чем полимерные системы, моделируют структуру и оптические свойства ДНК.

Экспериментальная часть

Синтез олигодезоксирибонуклеотидов описан в работе [24]. Использовали препараты ДНК из *Staphylococcus aureus* (33% G + C) и из *Pseudomonas aeruginosa* (64% G + C). Растворы комплексов олигомеров готовили в нейтральных буферных системах, содержащих, как правило, ионы Mg^{2+} : 0,004 M фосфатный буфер, pH 7,3, содержащий 0,2 M NaCl и 0,075 M $MgCl_2$ (А) и 0,05 M трис-НСl буфер, pH 7,0, содержащий 0,15 M NaCl (Б). Соотношение компонентов комплексов было эквимолярным, а концентрация составляла 10^{-2} или 10^{-3} M (в расчете на мономерное звено). Концентрацию нуклеотидного материала определяли спектрофотометрически; использовали молярные коэффициенты поглощения ϵ_{257} 11 340 для d (pA)₃ [24]; ϵ_{266} 8 660 для d (pT)₁₂ [25]; ϵ_{260} 10 150 для d (pG-G-T) и ϵ_{260} 8 250 для d (pA-C-C)₄ (определены путем гидролиза фосфодиэстеразой змеиного яда); ϵ_{260} 6 600 для ДНК из обоих источников; ϵ_{260} для d (pG-G-T)₂ принимали равным 9 500. Смеси комплементарных олигомеров выдерживали при 2° в течение 16 ч. Спектры (УФ и КД) и кривые плавления измеряли на спектрофотометре «Cary 15» (США), «Hitachi» 356 (Япония) и дихрографе «Joan» II (Франция) (чувствительность измерений на дихрографе $1 \cdot 10^{-5}$ ОЕ/мм). Плавление проводили в термостатируемых кварцевых кюветах с длиной оптического пути 0,1 и 0,01 см. Во избежание запотевания кювет при низких температурах в кюветное отделение продували сухой азот. Температуру повышали непрерывно со скоростью 10° в 1 ч, регистрируя изменения D (УФ) или ΔD (КД) при определенных длинах волны (см. таблицу) через каждые 1—2°. Температуру регистрировали с помощью медно-константановой термопары.

ЛИТЕРАТУРА

1. Naylor R., Gilham P. T. (1966) *Biochemistry*, **5**, 2722—2728.
2. Shabarova Z. A., Prokofiev M. A. (1970) *FEBS Lett.*, **11**, 237—240.
3. Бадашкева А. Г., Горбунов Н. П., Шамо́вский Г. Г., Шубина Г. Н. (1974) *Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим.*, **2**, 96—102.
4. Vesugi S., Ts'o P. O. P. (1974) *Biochemistry*, **13**, 3142—3152.
5. Недбай В. К., Соколова Н. И., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. (1974) *Докл. АН СССР*, **205**, 1114—1116.
6. Гатинская Л. Г., Соколова Н. И., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. (1974) *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, 221—223.
7. Gupta N. K., Ohtsuka E., Sgaramella V., Buchi H., Kumar A., Weber H., Khorana H. G. (1968) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **60**, 1339—1344.
8. Cross A. D., Crothers D. M. (1971) *Biochemistry*, **10**, 4015—4022.
9. Maurizot J. G., Blicharski J., Brahms J. (1971) *Biopolymers*, **10**, 1429—1454.
10. Agarwal K. L., Kumar A., Khorana H. G. (1972) *J. Mol. Biol.*, **72**, 351—373.
11. Gennis R. B., Cantor C. R. (1972) *J. Mol. Biol.*, **65**, 381—399.
12. Crothers D. M., Hilbers W., Schulman R. G. (1973) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 2899—2901.
13. Pohl F. M. (1973) *FEBS Lett.*, **38**, 202—204.
14. Pohl F. M. (1974) *Eur. J. Biochem.*, **42**, 495—504.
15. Patel D. J., Tonelli A. E. (1974) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 1945—1948.
16. Brahms J., Brahms S. (1970) in *Biological Macromolecules (Fasman, Timashchff)*, vol. 4, *Fine Structure of Nucleic Acids and Proteins*, p. 191.
17. Uhlenbeck O. C., Borer P. N., Dengler B., Tinoco I. Jr. (1973) *J. Mol. Biol.*, **73**, 483—496.
18. Соколова Н. И., Каграманова В. К., Долинная Н. Г. (1975) *Успехи химии*, XLIV, 104—133.
19. Zimmer C., Luck G. (1974) *Biochim. et biophys. acta*, **361**, 11—32.
20. Luck G., Zimmer C., Snatzke G., Söndgerath G. (1970) *Eur. J. Biochem.*, **17**, 514—522.
21. Gratzer W. B. (1970) *Eur. J. Biochem.*, **15**, 209—214.
22. Wells R. D., Larson J. E., Grant R. C., Shortle B. E., Cantor C. R. (1970) *J. Mol. Biol.*, **54**, 465—497.
23. Pohl F. M., Jorvin T. M. (1972) *J. Mol. Biol.*, **67**, 375—396.
24. Смирнов В. Д., Сергеева Н. Ф., Ильина Е. В., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. (1974) *Докл. АН СССР*, **218**, 722—725.
25. Cassani G. R., Bollum F. J. (1969) *Biochemistry*, **8**, 3928—3936.

Поступила в редакцию
21.I.1975

A STUDY OF COMPLEMENTARY COMPLEXES FORMED BY OLIGODEOXYRIBONUCLEOTIDES OF VARIOUS LENGTH

DOLINNAYA N. G., GROMOVA E. S., IL'INA E. V.,
SERGEEVA N. F., SHABAROVA Z. A., PROKOFIEV M. A.

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

Circular dichroism (CD) and UV spectroscopy have been used to demonstrate for the first time formation of complexes of tri(hexa) deoxyribonucleotides, $d(pG-G-T)$, $d(pG-G-T)_2$ and $d(pA)_3$, with the respective complementary dodecanucleotides, $d(pA-C-C)_4$ and $d(pT)_{12}$ in neutral buffer solutions. The effect of the total nucleotide concentration, of the composition of buffer solutions, of the chain length of the complex components and their nature on the thermal stability and the structure of the complexes has been studied. Comparative analysis of the CD curves of the oligomer complexes studied and those of DNA with high and low content of G·C pairs made it possible to suggest that in salt solutions short oligodeoxyribonucleotides form a turn of a helix whose geometry is close to that of the B form of DNA. Such complexes may be used as models of DNA in various biological systems.