



УДК 577.113.6.088.53:543.422.25

ПРИРОДА СТАБИЛИЗАЦИИ ТАНДЕМНОГО ДНК-ДУПЛЕКСА pTGGAGCTG · (pCAGC + (Phn-NH-(CH₂)₃-NH)pTCCA) ПО ДАННЫМ УФ-, КД- И ДВУМЕРНОЙ ЯМР-СПЕКТРОСКОПИИ

© 2000 г. А. Ю. Денисов, Д. В. Пышный, Е. М. Иванова[#]

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

Поступила в редакцию 24.06.99 г. Принята к печати 30.11.99 г.

Спектрофотометрическими методами и методом двумерной ¹H-ЯМР-спектроскопии (COSY, NOESY) исследованы свойства и пространственное строение в водном растворе tandemного ДНК-комплекса pTGGAGCTG · (pCAGC+(PhnL)pTCCA), где L – аминоклинкер, Phn – остаток *N*-(2-гидроксиэтил)феназиния. Показано, что при tandemном комплексообразовании с участием олигонуклеотида, несущего остаток Phn, ароматическая система красителя интеркалирует в двойную спираль дуплекса в точке одноцепочечного разрыва и участвует в двух стэкинг-взаимодействиях: сильном (3.5–4 Å) – с T⁵ · A¹²-парой оснований собственного дуплексного участка и слабом (4–5 Å) – с парой C⁴ · G¹³ прилегающего дуплекса (в основном с основанием нуклеотида C⁴). Такое расположение остатка красителя, обеспечивающее перекрестное взаимодействие феназиниевой группировки с парами оснований дуплексных структур, примыкающих встык, вызывает стабилизацию tandemного комплекса в целом.

Ключевые слова: олигонуклеотидные дуплексы; интеркаляция; *N*-(2-гидроксиэтил)феназиний; стэкинг-гибридизация; термическая стабильность; КД индуцированный; двумерный ЯМР; молекулярное моделирование.

ВВЕДЕНИЕ

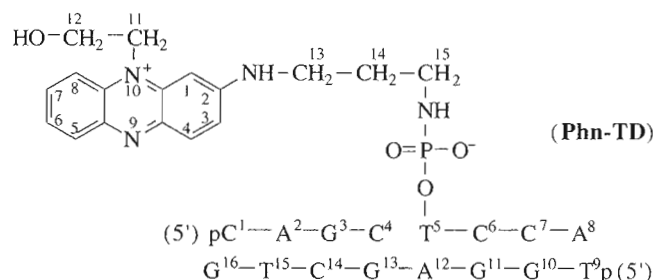
Стэкинг-гибридизация, или гибридизация олигонуклеотидов встык, в последнее время привлекает все большее внимание исследователей при изучении формирования вторичных структур НК [1], при использовании олигонуклеотидов для конструирования искусственных рибозимов [2], в связи с повышением эффективности обратной гибридизации на подложке (“чиповая” технология) [3], для секвенирования [4, 5] и модификации ДНК [6, 7]. Интерес к этому эффекту вызван тем, что при гибридизации олигонуклеотидов встык в результате кооперативного контакта, возникающего между прилегающими парами оснований соседних олигомерных дуплексов, происходит возрастание термостабильности двойной спирали.

Ранее нами было показано, что введение по концевому фосфату одного из олигонуклеотидов в точку контакта двух соседних дуплексных участков полициклического красителя *N*-(2-гидроксиэтил)феназиния приводит к еще большему повышению температуры плавления как дуплекса Phn-конъюгата олигонуклеотида, так и соседнего

дуплекса [8]. Известно, что повышенная стабильность двухкомпонентного комплекса, образованного ДНК-мишенью и феназиниевым конъюгатом олигонуклеотида, обусловлена стэкинг-взаимодействием ароматической системы красителя с концевой парой оснований дуплекса, возникающим в результате планарного расположения ароматических систем оснований и красителя [9–12].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе были исследованы особенности строения tandemного дуплекса pTGGAGCTG · (pCAGC+(PhnL)pTCCA) (**Phn-TD**), содержащего остаток *N*-(2-гидроксиэтил)феназиния (Phn), который присоединен к одному из тетра-нуклеотидов в месте их состыковки:



Показано, что остаток красителя стабилизирует комплекс, интеркалируя между парами основа-

Сокращения: Phn – *N*-(2-гидроксиэтил)феназиний; НК – нуклеиновые кислоты; префикс “d” в аббревиатуре олигодезоксирибонуклеотидов опущен.

[#] Автор для переписки (тел.: (383-2) 39-62-75; e-mail: pyshnyi@niboch.nsc.ru).

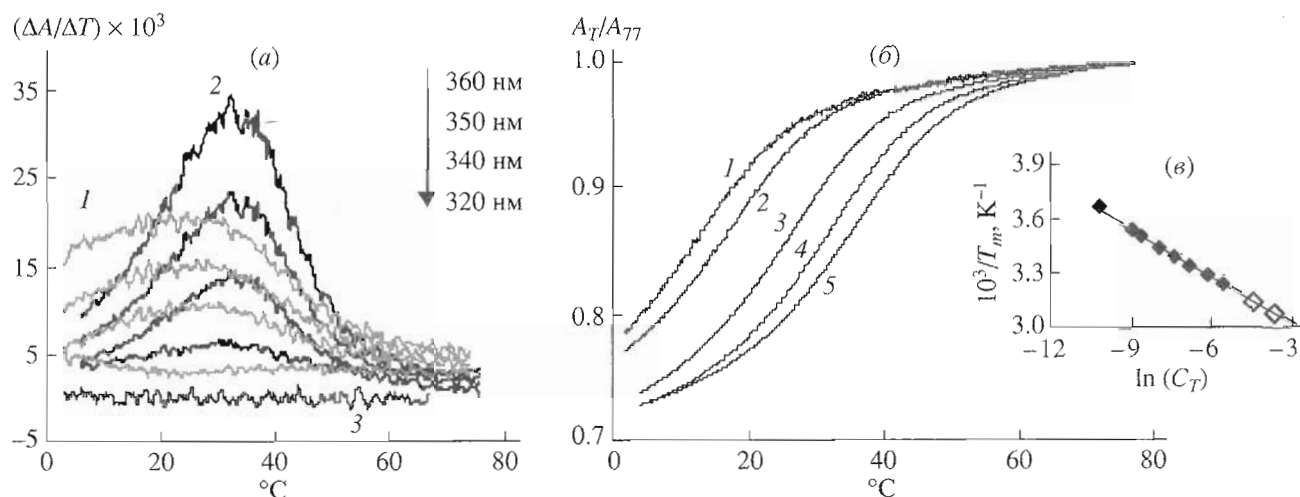


Рис. 1. Термическая денатурация дуплексов по данным УФ-спектроскопии.

(а) Дифференциальные кривые плавления комплексов $r\text{TGGAGCTG} \cdot (\text{PhnL})p\text{TCCA}$ (**Phn-DD**, кривые 1), $r\text{TGGAGCTG} \cdot (p\text{CAGC} + (\text{PhnL})p\text{TCCA})$ (**Phn-TD**, кривые 2) на длинах волн 320, 340, 350 и 360 нм, $r\text{TGGAGCTG} \cdot (p\text{CAGC} + p\text{TCCA})$ (**TD**, кривая 3) на длине волны λ 360 нм при концентрации каждого компонента 7.28×10^{-4} М. (б) Нормированные (77 $^{\circ}\text{C}$) интегральные кривые плавления комплекса **Phn-TD** (λ 360 нм); C_T 0.18 (1), 0.36 (2), 1.09 (3), 2.18 (4) и 3.93 (5) мМ. (в) Зависимость обратной температуры плавления комплекса **Phn-TD** от $\ln(C_T)$ (пустыми значками отмечены рассчитанные величины при концентрациях компонентов 4 и 8 мМ).

ний прилегающих тетрануклеотидных дуплексов. Для сравнения также изучались дуплексы $r\text{TGGAGCTG} \cdot p\text{CAGC}$ (**DD**), $r\text{TGGAGCTG} \cdot (\text{PhnL})p\text{TCCA}$ (**Phn-DD**) и немодифицированный тандемный дуплекс $r\text{TGGAGCTG} \cdot (p\text{CAGC} + p\text{TCCA})$ (**TD**).

ТЕРМИЧЕСКАЯ СТАБИЛЬНОСТЬ

Сначала исследовали влияние остатка *N*-(2-гидроксиэтил)феназиния, присоединенного к тетрануклеотиду, на стабильность тандемного комплекса **Phn-TD** в целом.

Тетрануклеотиды обладают крайне низкими комплексообразующими свойствами и даже при их гибридизации встык не удается зарегистрировать методами УФ-спектрофотометрии образование комплексов с ДНК-матрицей в диапазоне концентраций 1×10^{-5} – 1×10^{-4} М. Температура плавления комплекса **TD**, определенная по данным спектров ЯМР при существенно более высоких концентрациях олигонуклеотидных компонентов (8 мМ), составляет для дуплексных участков $r\text{TGGAGCTG} \cdot p\text{CAGC}$ и $r\text{TGGAGCTG} \cdot p\text{GCTG}$ 24 и 20 $^{\circ}\text{C}$ соответственно [13].

Ранее нами показано, что денатурация дуплекса $r\text{TGTTTGGT} \cdot (\text{PhnL})p\text{CCAAACA}$, стабилизированного остатком *N*-(2-гидроксиэтил)феназиния, вследствие стэкинг-взаимодействия Phn-группировки с концевой парой оснований дуплекса сопровождается изменением оптического поглощения не только в диапазоне поглощения олигонуклеотидов (260–280 нм), но и в области поглощения

остатка красителя (300–360 нм) [14]. Поэтому термическую денатурацию феназинийсодержащих комплексов – исследуемого тандемного **Phn-TD** и контрольного двухкомпонентного **Phn-DD** – проводили, регистрируя изменение оптического поглощения растворов на нескольких длинах волн в диапазоне 300–360 нм при концентрации каждого олигонуклеотида от 1.3×10^{-5} до 1.3×10^{-3} М.

Как видно из рис. 1а, дифференциальные кривые плавления контрольного дуплекса $r\text{TGGAGCTG} \cdot (\text{PhnL})p\text{TCCA}$ (кривые 1) и такого же дуплексного участка в составе комплекса $r\text{TGGAGCTG} \cdot (p\text{CAGC} + (\text{PhnL})p\text{TCCA})$ (кривые 2), зарегистрированные на длинах волн в области поглощения Phn-группировки (320–360 нм), резко различаются во всем температурном интервале, что говорит об участии остатка красителя в организации тандемного дуплекса. Температура плавления контрольного дуплекса **Phn-DD** при концентрации каждого компонента 7.28×10^{-4} М составляет 25 $^{\circ}\text{C}$, что на 6 $^{\circ}\text{C}$ меньше, чем в присутствии дополнительного тетрануклеотида $p\text{CAGC}$.

Форма дифференциальных и интегральных кривых плавления (рис. 1а, б) феназинийсодержащего дуплексного участка в составе **Phn-TD**, сохраняющаяся в широком диапазоне концентраций, свидетельствует о монофазном характере плавления исследуемого комплекса. Таким образом, денатурация тандемного дуплекса протекает кооперативно и регистрируемая температура плавления феназинийсодержащего дуплексного участка соответствует температуре плавления

тандемного комплекса в целом. Монофазный характер плавления трехкомпонентного тандемного комплекса, а также линейная зависимость величины, обратной температуре плавления, от логарифма суммарной концентрации компонентов ($R^2 = 0.9983$, где R – коэффициент корреляции) (рис. 1в) позволяют определить термодинамические параметры образования тандемного дуплекса ($\Delta H^\circ 45.17$ ккал/моль и $\Delta S^\circ 117.3$ кал/(моль К)) по формуле, предложенной в работе [15] для многокомпонентных кооперативных систем:

$$\frac{1}{T_m} = \frac{(n-1)R}{\Delta H^\circ} \ln C_T + \frac{[\Delta S^\circ - (n-1)R \ln 2n]}{\Delta H^\circ},$$

где T_m – температура плавления комплекса, R – газовая постоянная, ΔH° и ΔS° – изменения энтальпии и энтропии при образовании многокомпонентного комплекса, n – число компонентов комплекса и C_T – суммарная концентрация олигонуклеотидных компонентов комплекса.

При сравнении температуры плавления комплекса **TD** (24 и 20°C), определенной по данным ЯМР в работе [13], и комплекса **Phn-TD** (~50°C), рассчитанной при той же концентрации компонентов (8 мМ), видно, что остаток феназиния приводит к существенной стабилизации тандемного дуплекса, причем температуры плавления обоих тетрауклеотидных участков в нем очень близки.

СПЕКТРЫ КРУГОВОГО ДИХРОИЗМА

Стабилизация тандемного комплекса остатком феназиния может происходить вследствие взаимодействия красителя с элементами дуплексной структуры при его локализации в одной из бороздок двойной спирали либо путем встраивания (интеркаляции) в двойную спираль.

Известно, что связывание ахирального лиганда с ДНК приводит к появлению индуцированной оптической активности, которая регистрируется в спектре кругового дихроизма (КД) в длинноволновой области поглощения комплекса [16]. Укладка лиганда вдоль оси спирали, т.е. при расположении молекулы в одной из бороздок, сопровождается появлением в спектре КД интенсивного ($\Delta\epsilon \sim 10\text{--}100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) положительного сигнала, в то время как интеркаляция лиганда, т.е. перпендикулярная ориентация плоскости молекулы относительно главной оси спирали ДНК, приводит к возникновению индуцированного сигнала КД низкой интенсивности ($|\Delta\epsilon| \leq 10 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [17].

Для определения ориентации феназиниевого остатка в структуре исследуемого комплекса **Phn-TD** были записаны КД-спектры в условиях, обеспечивающих полную ассоциацию комплекса, т.е. при 5°C и концентрации каждого олигонуклеотидного компонента $7.28 \times 10^{-4} \text{ M}$ (рис. 2).

В спектре КД комплекса **Phn-TD** (рис. 2а, кривая 1) наряду с сигналами в области поглощения оснований дуплекса, свидетельствующими о В-форме спирали ДНК (отрицательный и положительный сигналы равной интенсивности при

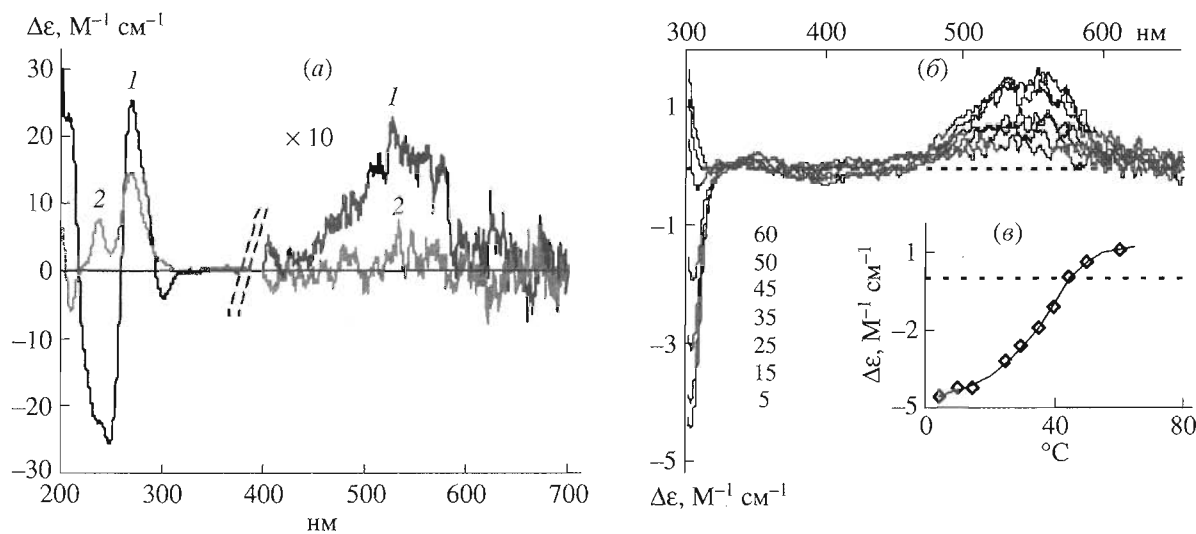


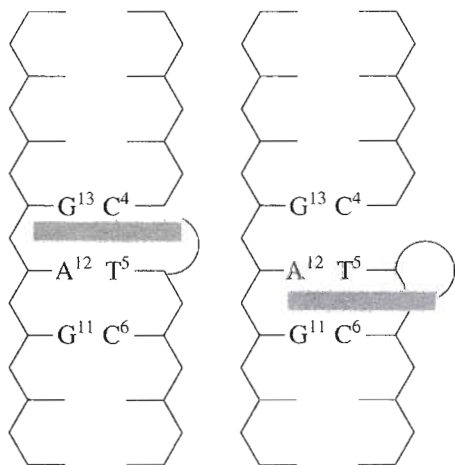
Рис. 2. Индуцированная оптическая активность феназиниевого остатка в составе тандемного комплекса **Phn-TD** по данным спектров КД.

(а) Спектры КД тандемного компонента **Phn-TD** (кривая 1) и свободного конъюгата (PhnL)pTCCA (кривая 2) при 5°C (концентрация каждого компонента $7.28 \times 10^{-4} \text{ M}$). (б) Спектры индуцированного КД комплекса **Phn-TD** при разных температурах (°C). (в) Зависимость интенсивности сигнала КД комплекса **Phn-TD** при 302 нм от температуры (концентрация каждого компонента $1.31 \times 10^{-3} \text{ M}$).

248 и 267 нм соответственно) [18], регистрируются ДНК-индуцируемые сигналы в области 300 нм (отрицательный) и 500–550 нм (положительный). Эти сигналы отсутствуют в спектре свободного феназинийсодержащего тетрануклеотида (PhnL)pTCCA (рис. 2а, кривая 2), не формирующего дуплексную структуру. Низкая интенсивность этих сигналов ($\Delta\epsilon_{302} -4.6$ и $\Delta\epsilon_{550} 1.4 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$) в спектре Phn-TD свидетельствует в пользу того, что остаток красителя интеркалирует в двойную спираль.

Повышение температуры, приводящее к денатурации Phn-TD, вызывает уменьшение интенсивности индуцированных сигналов в спектре КД при 302 нм (рис. 2б). Кривые зависимости интенсивности сигналов от температуры имеют монофазный характер с точкой перегиба в диапазоне 40–45°C (рис. 2в). Таким образом, температурная зависимость КД-спектров, тонко отражающих изменения пространственного окружения хромофора в комплексе [19], подтверждает кооперативный характер плавления Phn-TD. Также совпадает и величина температуры плавления комплекса с полученной путем регистрации оптического поглощения.

Хотя спектры КД комплекса Phn-TD позволяют заключить, что остаток феназиния интеркалирует в двойную спираль, они не дают информации о сайте связывания молекулы красителя. На основании литературных данных по структурным исследованиям комплексов конъюгатов олигонуклеотидов с акридином методами КД- и ЯМР-спектроскопии [20, 21] можно предположить две наиболее вероятные структуры tandemного комплекса, стабилизированного интеркалирующей группировкой. Остаток красителя может интеркалировать между парами оснований или в месте состыковки тетрануклеотидов (между парами $\text{C}^4 \cdot \text{G}^{13}$ и $\text{T}^5 \cdot \text{A}^{12}$) или в положении “назад” относительно 5'-конца тетрануклеотидного конъюгата (между парами $\text{T}^5 \cdot \text{A}^{12}$ и $\text{C}^6 \cdot \text{G}^{11}$):



Для определения локализации остатка феназиния в tandemном дуплексе были проведены ис-

следования с помощью двумерной ЯМР-спектроскопии. Данные, полученные при термической денатурации комплекса, свидетельствуют о том, что в области концентраций (4.0 мМ каждого компонента), необходимых для исследований методом ЯМР, температура плавления tandemного комплекса Phn-TD находится вблизи 45°C.

ЯМР-СПЕКТРОСКОПИЯ

Изучение строения Phn-TD проводили с использованием широко известной методологии, описанной в работах [9–13]. Пространственная структура немодифицированного аналога изучаемого tandemного дуплекса TD была определена нами ранее [13].

Отнесение сигналов необмениваемых протонов олигонуклеотидов в NOESY-спектрах дуплекса (рис. 3) осуществляли по обычной, ранее использованной нами в работах [10–13], методике последовательного отнесения сигналов протонов для правозакрученных форм ДНК, используя путь $(\text{H}1')_i - (\text{H}6/8)_i - (\text{H}1')_{i-1}$ (i – номер нуклеотида) и аналогичные пути для протонов $\text{H}2'$, $\text{H}2''$, $\text{H}3'$, $\text{H}4'$. Отнесение сигналов протонов дезоксирибозных циклов подтверждено с использованием DQF-COSY-спектров дуплекса. Сигналы $\text{H}2(\text{A})$ в спектрах ЯМР были идентифицированы с помощью одномерных экспериментов по инверсии-восстановлению [11, 13] и с помощью $\text{H}2-\text{H}1'(\text{A}^8)$ кросс-пика NOESY. Значения химических сдвигов протонов представлены в табл. 1.

В отличие от спектров немодифицированного комплекса pTGGAGCTG · (pCAGC + pTCCA), пространственная структура которого близка к структуре целостной [13, 22] октануклеотидной двойной спирали, в спектрах NOESY феназинийсодержащего tandemного дуплекса pTGGAGCTG · (pCAGC⁴ + (PhnL)pT⁵CCA) отсутствуют кросс-пики между сигналами протонов нуклеотидов C^4 и T^5 , принадлежащих разным тетрамерам. Это свидетельствует о том, что в дуплексе $\text{pN}_8 \cdot (\text{pCAGC}^4 + (\text{PhnL})\text{pT}^5\text{CCA})$ остаток красителя препятствует прямому контакту между тетрамерами одной цепи.

Кроме того, сигналы протонов $\text{H}2(\text{A}^{12})$, а также $\text{H}5(\text{C}^4)$ и $\text{H}6(\text{C}^4)$, т.е. протонов оснований, находящихся вблизи феназиниевой группировки, существенно уширены при комнатной температуре. Помимо этого сигнал протона $\text{H}2(\text{A}^{12})$ октануклеотидной цепи смещен на 0.3 м.д. в сильное поле относительно сигнала аналогичного протона в немодифицированном дуплексе.

Отнесение сигналов протонов остатка N-(2-гидроксиэтил)феназиния проводили на основании NOESY-спектров tandemного комплекса Phn-TD (рис. 3) с привлечением данных работ [10, 11], в которых были исследованы комплексы, содержащие феназиниевую группировку на конце дуплекса.

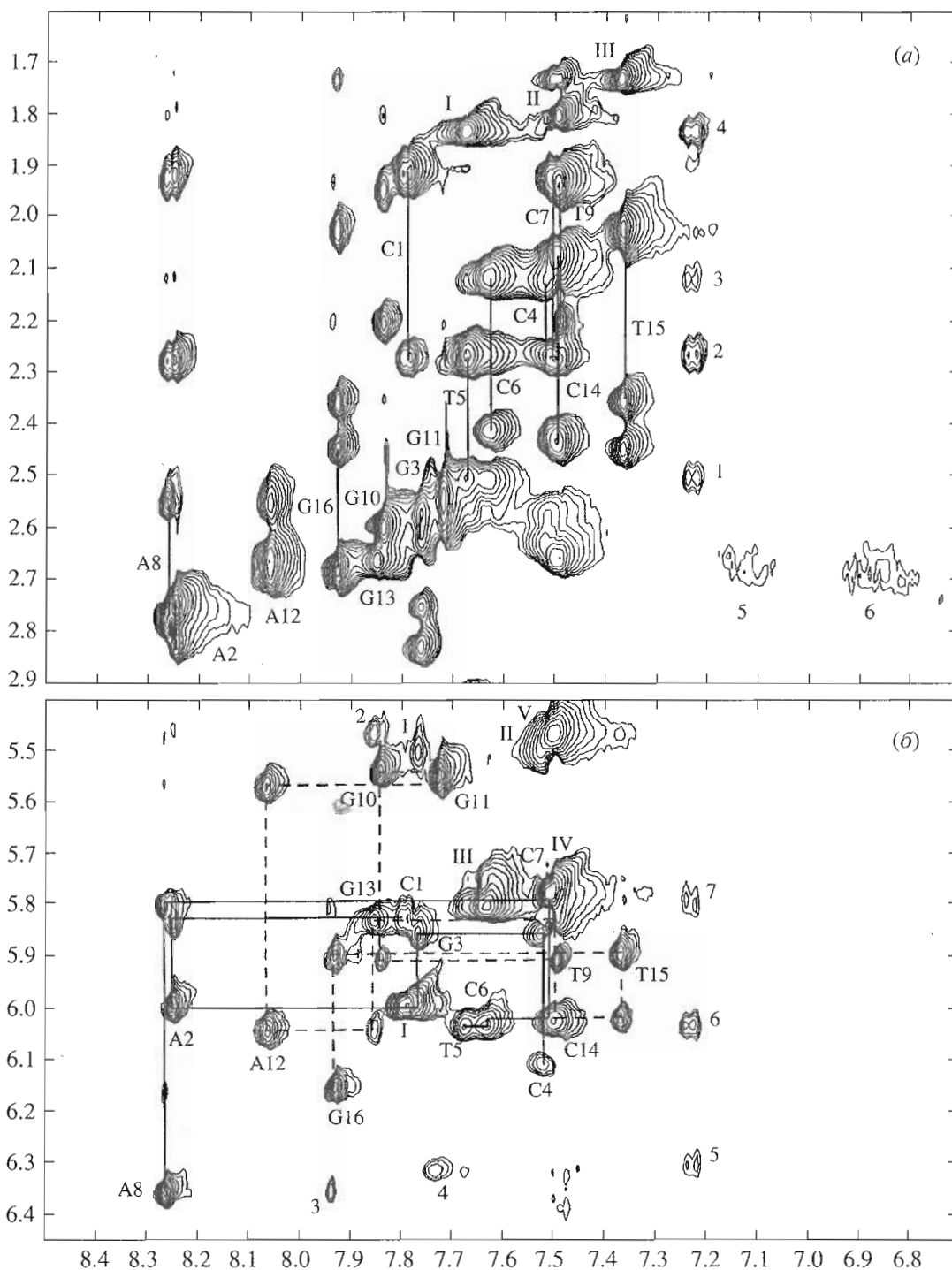


Рис. 3. Фрагменты спектра NOESY (500 МГц, t_m 300 мс, δ -шкала, м. д.) феназинийсодержащего дуплекса **Phn-TD** при 32°C. В нижней части рисунка показаны пути отнесения сигналов $(H1')_i$ - $(H6/8)_i$ - $(H1')_{i-1}$ для обоих тетрануклеотидов (сплошные линии) и октануклеотида (штриховая линия); внутринуклеотидные кросс-пики отмечены буквой и номером нуклеотида; римскими цифрами I-V обозначены кросс-пики H5-H6 в C¹, C⁴, C⁶, C⁷ и C¹⁴ соответственно; номерами обозначены кросс-пики: 1 – H8(G³)-H5(C⁴), 2 – H8(G¹³)-H5(C¹⁴), 3 – H2-H1'(A⁸), 4 – H1-H8(PhnL)*, 5 – H1-H3(PhnL), 6 – H1'(T⁵)-H3(PhnL), 7 – H5(C⁶)-H3(PhnL)* (здесь и далее звездочкой отмечены пики с вероятно большим вкладом эффектов спиновой диффузии). В верхней части рисунка сплошными линиями соединены внутринуклеотидные кросс-пики H2',H2''-H6/8; римскими цифрами I-III отмечены кросс-пики H6-Me в T⁵, T⁹ и T¹⁵ соответственно; номерами обозначены кросс-пики: 1 – H3(PhnL)-H2''(T⁵)*, 2 – H3(PhnL)-H2''(C⁴)/H2'(T⁵)*, 3 – H3(PhnL)-H2'(C⁴), 4 – H3(PhnL)-Me(T⁵), 5 – H5(PhnL)-H2', H2''(A¹²)*, 6 – H6(PhnL)-H2', H2''(A¹²).

Таблица 1. Химические сдвиги (м. д.) протонов нуклеотидов феназинийсодержащего тандемного дуплекса **Phn-TD** при 32°C

Нуклеотид	H6/H8	H5/H2/Me	H1'	H2'	H2''	H3'	H4'	H5'/5''
C ¹	7.79	5.99	5.82	1.91	2.27	4.80	4.18	3.84
A ²	8.24	7.88	6.00	2.75	2.83	5.02	4.36	3.97/4.10
G ³	7.76		5.86	2.57	2.62	4.98	4.38	4.20
C ⁴	7.52	5.49	6.11	2.12	2.26	4.53	4.08	4.09/4.22
T ⁵	7.67	1.83	6.04	2.26	2.50	4.88	4.33	4.01/4.06
C ⁶	7.63	5.79	6.03	2.11	2.40	4.79	4.22	4.12/4.14
C ⁷	7.50	5.77	5.78	1.92	2.26	4.76	4.04	4.01
A ⁸	8.26	7.93	6.36	2.77	2.54	4.73	4.22	4.08
T ⁹	7.49	1.80	5.90	1.96	2.20	4.76	4.17	3.80
G ¹⁰	7.83		5.54	2.60	2.60	4.92	4.28	3.95/4.05
G ¹¹	7.72		5.56	2.55	2.55	4.97	4.32	4.10
A ¹²	8.06	7.50	6.04	2.67	2.67	5.06	4.41	4.19
G ¹³	7.85		5.93	2.66	2.66	4.98	4.43	4.21
C ¹⁴	7.49	5.46	6.03	2.07	2.45	4.78	4.23	4.15
T ¹⁵	7.36	1.73	5.89	2.02	2.35	4.83	4.13	4.04/4.09
G ¹⁶	7.93		6.16	2.67	2.45	4.70	4.19	4.09

Значения химических сдвигов протонов остатка феназиния представлены в табл. 2.

В спектрах исследуемого тандемного комплекса наблюдаются NOE-кросс-пики между протонами H3-H4, H1-H11, H1-H12, H8-H11, H8-H12, H1-H13, H13-H14 и H14-H15 остатка феназиния, что позволяет легко идентифицировать их сигна-

Таблица 2. Химические сдвиги (м. д.) протонов остатка феназиния в составе тетрануклеотидного конъюгата (PhnL)₄TCCA, находящегося в дуплексной (**Phn-TD**) и свободной формах* при 32°C

Протон	Дуплексная	Свободная
H1	6.31 (6.58)	6.58 (6.77)
H3	7.23 (7.37)	7.40 (7.52)
H4	7.49	7.71
H5	7.12	7.88
H6	6.87	7.62
H7	7.46	7.93
H8	7.73	8.05
H11	4.70 (4.55)	4.95
H12	4.01 (3.96)	4.20
H13a, b	3.30, 3.22	3.55, 3.50
H14	1.89	2.00
H15	2.94	3.00

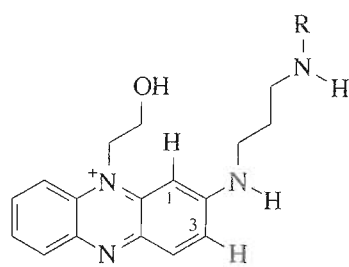
* В скобках представлены химические сдвиги протонов минорной формы феназиниевого остатка.

лы. Сигналы ароматических протонов феназиния H5, H6 и H7 существенно уширены при температуре ниже 30°C. Подобное явление ранее наблюдалось при образовании акридинсодержащих ДНК-дуплексов [21, 23]. Положение сигнала H7(PhnL) было определено по его кросс-пику с H11(PhnL), возникающему вследствие эффекта спиновой диффузии через протон H8(PhnL). Для идентификации сигналов феназиниевых протонов H5 и H6 использовали метод двойного протонного резонанса при высоких температурах в условиях диссоциации комплекса (50–70°C), что позволило определить их смещение при пониженных температурах.

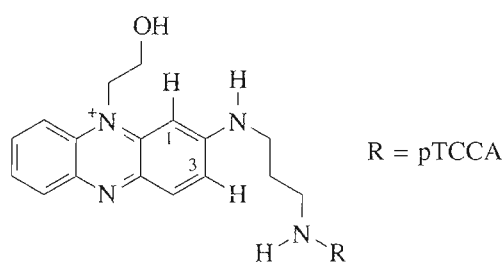
В спектрах ЯМР комплекса **Phn-TD** наблюдается также ряд дополнительных сигналов низкой интенсивности (15% от основных сигналов при 32°C) при 6.58, 7.37, 4.55 и 3.96 м.д. Наличие обменных кросс-пиков в NOESY-спектре комплекса между этими сигналами и основными сигналами протонов феназиния позволяет отнести их к протонам H1(PhnL), H3(PhnL), H11(PhnL) и H12(PhnL) соответственно. При повышении температуры, приводящей к диссоциации комплекса, в спектрах регистрируется уширение сигналов этих протонов, сближение основных и дополнительных пиков, а также перераспределение интенсивности пиков в пользу основных сигналов. Это может свидетельствовать о существовании двух форм феназинийсодержащего тандемного комплекса, находящихся в медленном обмене в шкале времени ЯМР при 20–25°C.

Основная и минорная формы комплексов могут различаться либо расположением остатка красителя в структуре комплекса (т.е. могут быть присущи именно структуре комплекса), либо конфигурацией самой феназиниевой группировки. При наличии двух конфигураций красителя дополнительные сигналы протонов феназиния должны присутствовать и в случае одноцепочечного состояния феназинийсодержащего тетра-нуклеотида, т.е. в отсутствие комплементарного олигонуклеотида. Поэтому был записан спектр свободного конъюгата (PhnL)pTCCA, в котором, как оказалось, регистрируется два набора сигналов протонов феназиниевого остатка (табл. 2). К основной и минорной формам удалось отнести сигналы протонов феназиния H1(PhnL) (6.58 и 6.77 м. д. соответственно) и H3(PhnL) (7.40 и 7.52 м. д. соответственно). Относительное содержание форм феназиниевого остатка для свободного и связанного в тандемном комплексе тетра-нуклеотидного производного при одинаковой температуре практически совпадает. На основании этих данных можно заключить, что две формы комплекса Phn-TD обусловлены возможностью существования двух состояний самого остатка красителя. Следует отметить, что наличие второго, минорного, набора сигналов отмечалось в спектрах двухкомпонентных комплексов, содержащих остаток феназиния на конце дуплексной структуры, хотя их природа и не была установлена [10, 11].

Причиной образования двух конформаций феназинийсодержащих комплексов может быть заторможенное вращение вокруг C–N-связи для фрагмента C1–C2–NH–C13 (*син*- и *анти*-изомерия)



син-изомер



анти-изомер

При этом как в свободном конъюгате, так и в комплексе Phn-TD, преобладает *син*-изомер феназиниевого фрагмента C1–C2–NH–C13, о чем свидетельствуют существенно более сильные кросс-пики протонов остатка феназиния H1–H13(PhnL) по сравнению с H3–H13(PhnL). Такая же преимущественная конформация аминогруппы во фрагменте феназиниевого остатка была определена по наличию NOE-контакта между протонами феназиния – ароматическим H3 и экзоциклической аминогруппы – в случае дуплекса с фланкирующим остатком красителя [11, 12]. Понижение температуры приводит к возрастанию относительного содержания минорной формы, а происходящее при этом уширение сигналов протонов феназиния свидетельствует об ограничении подвижности остатка красителя, интеркалированного в двойную спираль комплекса.

Взаимодействие протонов красителя с протонами олигонуклеотидов. Интеркаляция остатка феназиния в двойную спираль должна отражаться в спектрах ЯМР в виде кросс-пиков между протонами красителя и пространственно сближенными с ними протонами олигонуклеотидов.

В NOESY-спектрах основной формы дуплекса регистрируется ряд кросс-пиков сигналов протонов феназиниевого остатка с протонами нуклеотида T⁵: H1(PhnL)-Me(T⁵), H3(PhnL)-Me(T⁵), H3(PhnL)-H6(T⁵), H3(PhnL)-H1'(T⁵), H13(PhnL)-Me(T⁵), H15(PhnL)-H6(T⁵), H15(PhnL)-Me(T⁵). Протоны феназиния H5 и H6(PhnL) имеют кросс-пики с протонами H2', H2''(A¹²) комплементарной цепи, а протон H3(PhnL) – с протонами соседнего тетра-нуклеотида H2', H2''(C⁴) (рис. 3).

Отнести сигналы протонов олигонуклеотидов и феназиния в минорной форме дуплекса не удастся из-за ее низкого содержания и наложения этих сигналов на сигналы основной формой комплекса.

Таким образом, по данным спектров ЯМР, остаток феназиния находится в непосредственном взаимодействии с нуклеотидами T⁵ (к которому присоединен краситель), C⁴ прилегающего тетра-нуклеотида и A¹² комплементарной последовательности, т.е. интеркалирует в месте одноцепочечного разрыва цепи.

Отнесение сигналов имино-протонов олигонуклеотидов в спектре ЯМР тандемного дуплекса (рис. 4) осуществляли с привлечением литературных данных [10, 11, 13]. Значения химических сдвигов имино-протонов нуклеотидов, отстоящих от одноцепочечного разрыва, 14.34 (T¹⁵), 13.03 (T⁹, G¹⁰, G¹⁶), 12.72 и 12.60 (G³/G¹¹), близки к полученным нами ранее для исходного тандемного комплекса [13].

Для имино-протонов T⁵ и G¹³, находящихся в составе комплементарных пар в точке одноцепочечного разрыва, регистрируется два набора сигнала

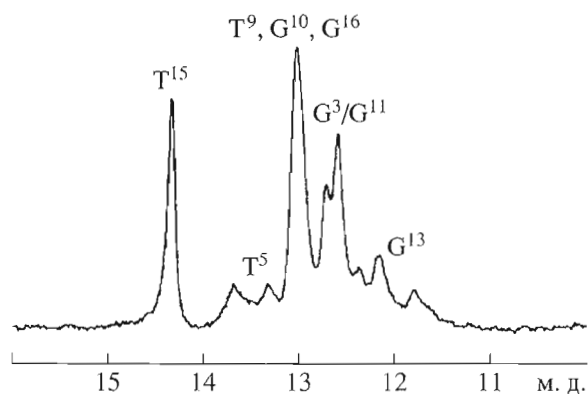


Рис. 4. Фрагмент спектра ^1H -ЯМР (400 МГц) области имино-протонов оснований нуклеотидов фенозиний-содержащего дуплекса **Phn-TD** при 0°C (растворитель – $\text{H}_2\text{O} : \text{D}_2\text{O} - 9 : 1$).

лов: T^5 (13.69 и 13.31 м. д.) и G^{13} (12.18 и 11.81 м. д.), соответствующие, вероятно, основной и минорной (25–30% при 0°C) формам дуплекса с остатком красителя PhnL в различной конфигурации, и смещенные в область сильного поля (для основной формы $\Delta\delta = -0.40$ и -0.62 м. д. соответственно). Такое смещение сигналов имино-протонов является, вероятно, следствием анизотропного влияния ароматической системы остатка фенозиния при его планарном расположении над плоскостью пары оснований [11, 12]. Поэтому синхронное и однонаправленное изменение положения сигналов имино-протонов T^5 и G^{13} соседних пар оснований может быть вызвано только встраиванием остатка фенозиния между парами $\text{C}^4 \cdot \text{G}^{13}$ и $\text{T}^5 \cdot \text{A}^{12}$, т.е. его интеркаляцией в спираль в месте состыковки тетра-нуклеотидов.

Определение констант спин-спиновой взаимодействия протонов дезоксирибозы нуклеотидных остатков дуплекса проводили по данным спе-

ктров DQF-COSY из анализа сечений соответствующих кросс-пиков вдоль f_2 -оси [11, 13, 24]. В целом значения полученных констант близки к измеренным для исходного дуплекса [13] и поэтому в данной работе не приводятся. Сумма измеренных вицинальных констант $J_{\text{H}1, \text{H}2}$ и $J_{\text{H}1, \text{H}2'}$ для всех нуклеотидов комплекса находится в пределах 14.5–16.0 Гц, что свидетельствует о преимущественном (более 80%) *S*-типе конформации углеводных циклов [25], свойственной *B*-форме ДНК [26].

Температурные зависимости спектров ^1H -ЯМР. Исследование термической денатурации фенозиний-содержащего тандемного комплекса **Phn-TD** с помощью УФ-спектроскопии позволило определить его (в целом) температуру плавления. В то же время по изменению положения сигналов протонов в спектрах ЯМР, записанных при разных температурах, можно определить температуру плавления отдельных дуплексных участков.

Была изучена зависимость химических сдвигов ароматических протонов и протонов метильных групп от температуры в диапазоне 20 – 70°C (рис. 5) при концентрации каждого олигонуклеотидного компонента 4.0 мМ. За температуру плавления (T_m) принимали точку перегиба кривой зависимости величины химического сдвига от температуры аналогично определению температур плавления для немодифицированного дуплекса **TD** [13].

Повышение температуры от 20°C , когда комплекс полностью ассоциирован, до 70°C (полная денатурация) приводит к смещению практически всех сигналов протонов в область слабого поля. Наибольший диапазон изменения химических сдвигов регистрируется для ароматических протонов фенозиния $\text{H}5$, $\text{H}6$ (PhnL) (около 1.0 м. д.), $\text{H}7$ (PhnL) (более 0.6 м. д.), а также для нуклеотид-

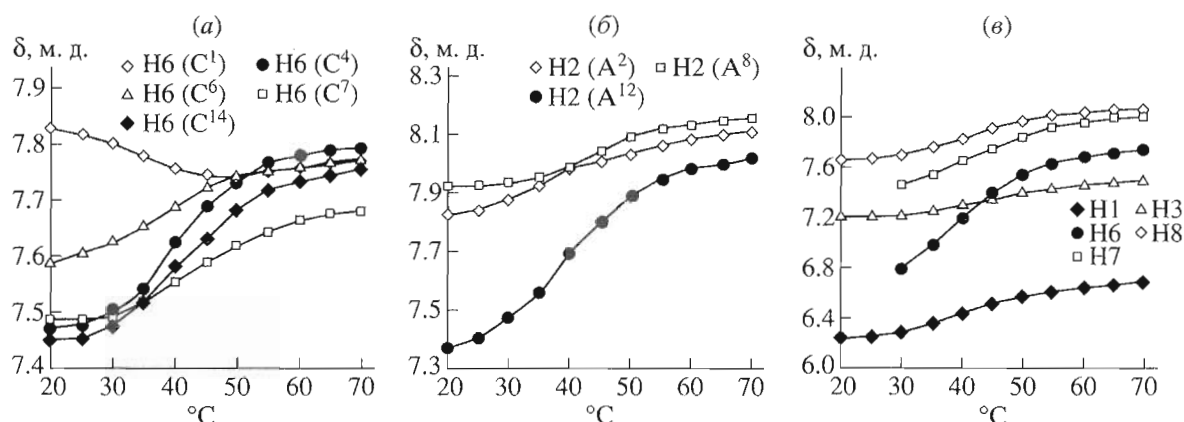


Рис. 5. Изменение величин химических сдвигов необмениваемых ароматических протонов при термической денатурации тандемного дуплекса **Phn-TD**: (а) протонов $\text{H}6$ (C^1 , C^4 , C^6 , C^7 и C^{14}); (б) протонов $\text{H}2$ (A^2 , A^8 и A^{12}); (в) протонов фенозиниевого остатка $\text{H}1$, $\text{H}3$, $\text{H}6$, $\text{H}7$ и $\text{H}8$.

Таблица 3. Температуры (T_m , °C) перехода дуплекс-мономер для феназинийсодержащего тандемного дуплекса (**Phn-TD**) и его немодифицированного аналога (**TD**) [13] по данным ЯМР-спектров*

T_m		Протоны комплементарных пар			T_m	
Phn-TD	TD				Phn-TD	TD
–	–	H5	C ¹ · G ¹⁶	H8	–	–
–	17	H6				
38	23	H2	A ² · T ¹⁵	Me	42	30
–	25	H8		H6	42	34
38	25	H8	G ³ · C ¹⁴	H5	40	33
				H6	41	35
40	27	H5	C ⁴ · G ¹³	H8	–	28
41	30	H6				
42		H1	Phn			
43		H3				
42		H8				
–	21	Me	T ⁵ · A ¹²	H2	39	30
39	–	H6		H8	–	–
38	18	H5	C ⁶ · G ¹¹	H8	–	–
38	20	H6				
40	18	H5	C ⁷ · G ¹⁰	H8	–	25
41	24	H6				
42	23	H2	A ⁸ · T ⁹	Me	41	25
–	20	H8		H6	–	–

* Прочерк в таблице обозначает, что диапазон изменения химического сдвига в интервале температур 20–70°C был недостаточен для измерения T_m с точностью выше ±3°C.

ных протонов H2(A¹²), H5(C⁴) и H5(C¹⁴) (около 0.6 м. д.).

Значения T_m , определенные для нуклеотидов феназинийсодержащего **Phn-TD** и немодифицированного тандемного дуплекса **TD** (по данным работы [13]), представлены в табл. 3. Видно, что температуры плавления как феназинийсодержащего дуплекса рTGGAGCTG · (PhnL)рTCCA, так и дуплекса рTGGAGCTG · рCAGC по усредненным значениям близки и равны 40 ± 3°C. В то же время для немодифицированного комплекса тетра-нуклеотидные дуплексные участки имеют различные более низкие температуры плавления – 20°C для рTGGAGCTG · рTCCA и 24°C для рTGGAGCTG · рCAGC при концентрации каждого компонента 8 мМ [13].

Таким образом, остаток *N*-(2-гидрокси-этил)феназиния в **Phn-TD** приводит к стабилизации как дуплекса тетра-нуклеотида, несущего остаток красителя, так и прилегающего дуплекса, что совпадает с данными, полученными в этой работе и в литературе [8, 27, 28] с помощью методов спектроскопии.

Особенности структуры феназинийсодержащего тандемного комплекса по данным ЯМР-спек-

роскопии. Тандемный комплекс **Phn-TD**, стабилизированный феназиниевой группировкой, имеет *B*-форму двойной спирали с локальными нарушениями в центральной части дуплекса.

Остаток феназиния в комплексе разрушает стэкинг-взаимодействие между соседними нуклеотидами (C⁴ и T⁵) двух состыкованных тетра-нуклеотидов и ослабляет контакт между комплементарными им нуклеотидами A¹² и G¹³ противоположной октануклеотидной цепи. Это выражается в отсутствии межнуклеотидных кросс-пиков между сигналами протонов нуклеотидов C⁴ и T⁵ и снижении интенсивности кросс-пиков между протонами нуклеотидов A¹² и G¹³, наиболее выраженном при низких температурах.

Остаток красителя располагается внутри двойной спирали между парами оснований тандемного комплекса C⁴ · G¹³, T⁵ · A¹² (смещение сигналов протона H2(A¹²), имино-протонов G¹³, T⁵ и всех ароматических протонов феназиния в область сильного поля вследствие анизотропных эффектов). При этом образуется набор состояний интеркаляционного сайта, по-видимому, за счет возможности горизонтальных перемещений феназиниевой группировки, замедляющихся при

понижении температуры (уширение сигналов протонов оснований Н2(A¹²), Н5(C⁴) и Н6(C⁴), имино-протонов G¹³ и T⁵ и ароматических протонов феназиния Н5, Н6 и Н7(PhnL)).

Наличие широкой сети строго локализованных NOE-контактов протонов феназиниевого остатка с протонами олигонуклеотидного дуплекса и характерное изменение химических сдвигов однозначно указывает на то, что феназиниевая группировка интеркалирует в точке одноцепочечного разрыва между парами оснований C⁴ · G¹³ и T⁵ · A¹², примыкающими друг к другу при образовании тетрануклеотидами tandemного дуплекса.

Гидроксиэтильная группировка красителя ориентирована в сторону большой бороздки дуплекса, как и в случае фланкирующего остатка феназиния [11] (в NOESY-спектрах не регистрируются кросс-пики между сигналами протонов Н7, Н8, Н11, Н12(PhnL) с протонами нуклеотидов, Н3(PhnL) имеет NOE-кросс-пики с Me, Н6 и Н1(T⁵), а Н1(PhnL) – только с Me(T⁵)). При этом гидроксильная группа направлена, скорее всего, в сторону T⁵ · A¹² пары (в NOESY-спектрах не регистрируются контакты Н12(PhnL) с протонами Н5 и Н6(C⁴) для соседней C⁴ · G¹³ пары оснований, но возможен контакт Н12(PhnL) с Me(T⁵), однако этот кросс-пик налагается на внутринуклеотидный Н5'-Me(T⁵) кросс-пик).

УТОЧНЕНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ ФЕАЗИНИЙСОДЕРЖАЩЕГО ТАНДЕМНОГО ДУПЛЕКСА МЕТОДОМ МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

Полученные качественные выводы о строении феназинийсодержащего tandemного дуплекса Phn-TD были проверены с помощью моделирования его структуры методами ЯМР-ограниченной молекулярной механики и динамики.

В качестве стартовой структуры в расчетах использовали каноническую В-форму ДНК-дуплекса, в котором трициклическая система N-(2-гидроксиэтил)феназиния интеркалирована между парами оснований C⁴ · G¹³ и T⁵ · A¹², а гидроксильный фрагмент ориентирован в сторону большой бороздки. Для образования полости между парами оснований C⁴ · G¹³ и T⁵ · A¹², в которую был затем направлен интеркалирующий остаток, структура олигонуклеотидной части была несколько модифицирована путем изменения торсионных углов α(G¹³) на 20° и ζ(A¹²) на 10°.

Оптимизацию геометрии проводили в три этапа: первичная минимизация методом молекулярной механики, ЯМР-ограниченная молекулярная динамика и последующая окончательная минимизация структуры методом ЯМР-ограниченной молекулярной механики. Энергию штрафа за отклонение расчетных расстояний от эксперимен-

тально измеренных величин (см. "Эксперимент. часть") учитывали аналогично работе [24]:

$$E_r = C_r(r_{ij} - r_{ij}^0)^2,$$

где значения коэффициентов C_r были равны 25, 13, 7 и 3 ккал/(моль Å²) для измеренных межатомных расстояний r_{ij}⁰ в диапазонах менее 2.5, 2.5–3.5, 3.5–4.5 и более 4.5 Å соответственно. Торсионные углы β, γ и ε в ходе моделирования специально не ограничивали (за исключением ε(A¹²) на этапе молекулярной динамики), однако контролировали их соответствие разрешенным диапазонам (см. "Эксперимент. часть") по завершении расчетов структуры. Фактический минимум функционала, являющегося суммой потенциальной энергии молекулы и энергии геометрического штрафа, достигался уже в течение первых 5 пс молекулярной динамики при 300 К. Дальнейшее моделирование приводило лишь к изменениям полной и потенциальной энергии молекулы в пределах погрешности расчетов (–630 ± 5 ккал/моль) и изменениям межпротонных расстояний в пределах погрешности эксперимента (±10%).

Среднеквадратичное отклонение величин межатомных расстояний в окончательной рассчитанной структуре от расстояний, измеренных экспериментально, имеет удовлетворительно низкое значение [29] и составляет 0.17 Å, при этом максимальное отклонение не превышает 0.5 Å. Торсионные углы сахарофосфатного скелета находятся в диапазонах, характерных для В-формы ДНК [26]. Так, диапазон углов α в финальной структуре составляет: –69...–80°, β: 169–192°, γ: 48–79°, ε: 179–196° и ζ: –79...–129°. Фазовые углы псевдовращения ρ [26] для дезоксирибозных циклов составляют 140–165°, что соответствует S-конформации углеводных остатков. Кроме того, из расчетов структуры следует, что гидроксильная группа гидроксильного фрагмента феназиния, находясь в большой бороздке tandemного дуплекса, вероятно, способна образовывать водородную связь с атомом кислорода O4 основания T⁵ (рассчитанное расстояние между этими атомами составляет 1.8 Å).

Уточненная с помощью проведенных расчетов окончательная структура tandemного дуплекса с интеркалирующим остатком N-(2-гидроксиэтил)феназиния представлена на рис. 6. Она соответствует усредненной конформации основной формы tandemного комплекса при температуре 32°C при степени связывания компонентов комплекса не менее 80%.

Остаток красителя, внедряясь в двойную спираль в точке одноцепочечного разрыва, располагается планарно относительно плоскости пары оснований T⁵ · A¹² (r 3.5–4 Å) дуплекса, вытесняя при этом пару C⁴ · G¹³ прилегающего дуплекса, как это видно при сравнении структур централь-

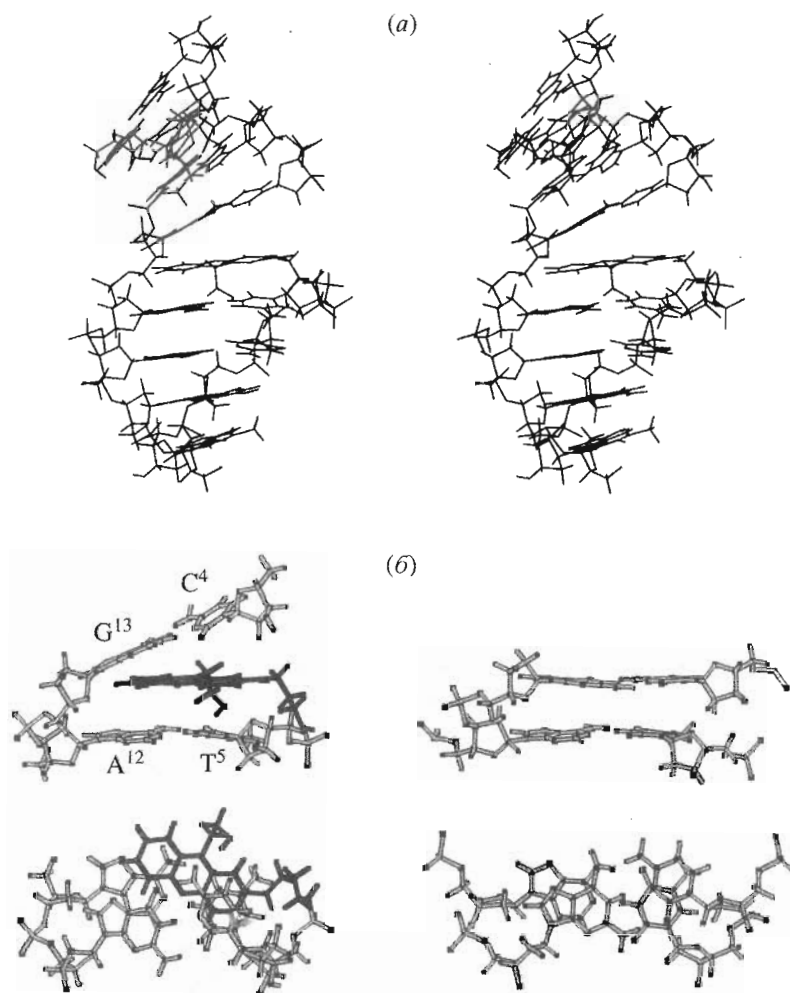


Рис. 6. Стереопара (а) и центральные фрагменты (б) конформации tandemного дуплекса **Phn-TD**, содержащего остаток феназина (б, слева), и немодифицированного дуплекса **TD** [13] (б, справа) и полученные с помощью молекулярного моделирования с учетом ограничений из данных ЯМР. Ключевые расстояния в структуре феназинсодержащего дуплекса (в скобках приведены величины, использованные в качестве ЯМР-ограничений): Н6(PhnL)-Н2'(A¹²) 4.4 Å, Н6(PhnL)-Н2''(A¹²) 4.8 Å (Н6(PhnL)-С2'(A¹²) 5.0 Å); Н3(PhnL)-Н2'(С⁴) 4.9 Å, Н3(PhnL)-Н2''(С⁴) 4.2 Å (Н3(PhnL)-С2'(С⁴) 4.5 Å); Н1(PhnL)-Ме(T⁵) 4.2 Å (4.4 Å); Н3(PhnL)-Ме(T⁵) 5.0 Å (4.5 Å); Н3(PhnL)-Н6(T⁵) 4.0 Å (4.2 Å); Н3(PhnL)-Н1'(T⁵) 3.8 Å (4.0 Å); С13(PhnL)-Ме(T⁵) 4.3 Å (4.0 Å); С15(PhnL)-Н6(T⁵) 3.4 Å (3.5 Å); С15(PhnL)-Ме(T⁵) 3.8 Å (3.5 Å).

ного участка немодифицированного и феназинсодержащего комплекса. Длинная псевдоось трициклической системы красителя находится под острым углом к псевдоосям этих пар. Ароматическая система остатка красителя перекрывается с пиримидиновыми основаниями T⁵ и C⁴ тетрамеров, в меньшей степени – с пуриновым основанием A¹² и практически не контактирует с основанием G¹³ цепи октамера. При этом основания T⁵ и C⁴ оказываются стянутыми в вертикальную стопку с большим перекрыванием их π-систем с π-системой остатка феназина; плоскости оснований противоположной цепи A¹² и G¹³ смещены относительно друг друга по сравнению с их расположением в структуре немодифицированного комплекса.

Очевидно, что именно такое расположение остатка красителя, обеспечивающее перекрестное взаимодействие феназиниевой группировки с парами оснований примыкающих встык дуплексных структур, и должно вызывать стабилизацию tandemного комплекса в целом, в большей степени влияя на стабильность Phn-содержащей тетра-нуклеотидной дуплексной структуры и в несколько меньшей – на стабильность прилегающего к ней немодифицированного красителем дуплекса.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Олигонуклеотиды pCAGC, pTCCA и pTGGAGCTG синтезировали фосфотриэфирным методом в растворе согласно работе [30]. Произ-

водное тетра nukлеотида (PhnL)pTCCA получали по методу, описанному в работе [31].

Концентрацию олигонуклеотидов и феназиниевого производного (PhnL)pTCCA рассчитывали на основании измерения оптической плотности их водных растворов на спектрофотометре Shimadzu 2100. Величины молярных коэффициентов поглощения (ϵ_{260}) олигонуклеотидов на длине волны 260 нм рассчитывали, используя величины ϵ_{260} моно- и динуклеотидов по данным [32]; величину ϵ_{260} производного (PhnL)pTCCA рассчитывали как сумму ϵ_{260} тетра nukлеотида и *N*-(2-гидроксиэтил)феназиниевого остатка ($1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [31]).

Оптические кривые плавления регистрировали как описано в работе [14] на специальной установке, созданной на базе спектрофотометрического УФ-детектора жидкостного хроматографа "Милихром". Каждая кривая плавления состояла из набора не менее чем 600 значений оптической плотности с частотой 10 точек/°C. 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. Для определения температуры плавления комплексов индивидуальные кривые плавления обрабатывали по методу, описанному нами ранее [14].

Спектры КД комплексов регистрировали на спектрополяриметре Jasco 600, используя термостатируемую кювету с длиной оптического пути 0.01 см. Представленные в работе спектры являются результатом усреднения четырех индивидуальных спектральных кривых и нормированы на моль олигонуклеотидного компонента комплекса.

Оптические исследования проводили в буфере 10 mM NaH_2PO_4 (pH 7.2), содержащем 0.1 M NaCl и 10 мкМ EDTA. Температуру в кювете поддерживали с точностью $\pm 0.1^\circ\text{C}$, прокачивая через кюветодержатель водный теплоноситель, и контролировали с помощью термпары.

Спектры ^1H -ЯМР записаны на спектрометрах Bruker AM-400 и DRX-500 с рабочими частотами по протонам 400.13 и 500.13 МГц соответственно. Используются стандартные программы накопления фазочувствительных NOESY- ($t_m = 75, 150, 300 \text{ ms}$) и DQF-COSY-спектров (двумерные спектры записывали при температурах 25–40°C). Ширина спектров составляла 5000 Гц, размер матрицы данных ($t_1 \times t_2$) для накопления двумерных спектров – 512 \times 4K, количество накоплений – 64–128, задержка на релаксацию между накоплениями – 2.5 с. Размер двумерных спектров ЯМР после Фурье-преобразования ($f_1 \times f_2$) составлял 2K \times 2K для NOESY- и 1K \times 8K для COSY-спектров. Инте-

грирование объемов кросс-пиков проводили с помощью стандартной процедуры базовой программы XWINNMR (Bruker).

Химические сдвиги протонов измерены относительно сигнала внутреннего стандарта 1 mM 4,4-диметил-4-силапентансульфоната натрия (DSS, δ_{H} 0.015 м.д.). Химические сдвиги ^{31}P рассчитаны относительно внешнего стандарта (85% H_3PO_4).

Образцы дуплекса **Phn-TD** и производного тетра nukлеотида (PhnL)pTCCA для записи спектров ЯМР готовили по методике, описанной ранее [13]. Концентрация дуплекса в D_2O (степень чистоты 99.96%) или в смеси $\text{H}_2\text{O} : \text{D}_2\text{O}$ (9 : 1) составляла 4.0 mM; буферный раствор содержал 0.1 M NaCl, 10 mM NaH_2PO_4 (pH 7.2), 10 мкМ EDTA.

Пространственную структуру дуплекса Phn-TD уточняли с помощью программы ограниченной молекулярной механики и динамики Amber 4.0 (любезно предоставлена П. Коллманом, Университет Калифорнии, Сан-Франциско) [33].

Параметры силового поля и заряды на атомах взяты из работы [11].

ЯМР-ограничения на межпротонные расстояния были получены в двухспиновом приближении из NOESY-спектров путем интегрирования объемов отдельных кросс-пиков. Объемы кросс-пиков интегрировали в NOESY-спектрах, записанных при разных временах смешивания (t_m). Кривые зависимости объемов кросс-пиков от времени смешивания аппроксимировали аналогично работе [29] к линейному участку при близких к нулю t_m для определения относительных скоростей кросс-релаксации. Измеренные скорости кросс-релаксации сопоставляли с базисными для H5-H6 в цитидинах (r 2.5 Å) или H6-H(Me) в тимидинах (r 2.7 Å) с учетом обратно пропорциональной зависимости скорости NOE-кросс-релаксации от шестой степени расстояния между протонами [24, 34]. Полученные таким способом и использованные в дальнейшем ограничения на межпротонные расстояния обязательно включали внутринуклеотидные расстояния H6/8-H1', H6/8-H2', H1'-H4' (расстояние H1'-H4' крайне важно для сохранения S-типа конформации дезоксирибозы [26]), а также межнуклеотидные расстояния (H1') $_{i-1}$ -(H6/8) $_i$ и (H2'') $_{i-1}$ -(H6/H8) $_i$. Кроме того, были использованы ограничения, полученные из NOESY-кросс-пиков для ключевых расстояний между протонами остатка феназиния и нуклеотидов C⁴, T⁵, A¹². В общей сложности для построения структуры дуплекса использовали более 80 экспериментально определенных межпротонных расстояний. Значения ключевых ограничений на межатомные расстояния приведены в подписи к рис. 6.

Ограничения на торсионные углы. Ограничения на торсионные углы β , γ и ϵ сахарофосфатно-

го скелета определяли по аналогии с работами [11, 13, 35].

Значения углов β ограничивали интервалом $180 \pm 75^\circ$, поскольку ширина кросс-пиков внутринуклеотидных протонов H6/8-H5'/H5'' в NOESY-спектрах не превышала 28 Гц [35]. Значения торсионных углов γ ограничивали диапазоном $60 \pm 40^\circ$, поскольку ширина кросс-пиков внутринуклеотидных протонов H6/8-H4' в исследуемом дуплексе составляет 11–14 Гц для всех нуклеотидов [35].

Значения торсионных углов ϵ ограничивали интервалом $130\text{--}200^\circ$ на основании диапазона величин химических сдвигов ^{31}P для межнуклеотидных фосфатных групп тандемного комплекса, характерном для B_1 -типа конформации рибозофосфатного остова [36]. Сигналы фосфора межнуклеотидных фосфатных групп в спектрах ^{31}P -ЯМР регистрировались между -0.3 и -0.7 м. д. Для атомов фосфора 5'-концевых фосфатных групп наблюдались типичные значения химических сдвигов ^{31}P [37]: 4.3 м. д. (C^1 , T^9) и 9.3 м. д. (T^5) при 30°C .

Значение торсионного угла C1–C2–NH–C13(PhnL) принимали равным 0° в соответствии с син-расположением углерода C13 по отношению к углероду C1 в основной форме феназиниевого красителя.

Детали проведения расчетов представлены выше в соответствующей части статьи. Визуализация структур и вращение относительно химических связей осуществлено с помощью программы HyperChem (HyperCube). Все расчеты производили на персональном компьютере класса Pentium.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа осуществлена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 99-04-49736), программы “Новейшие методы биоинженерии” и при индивидуальной поддержке Д.В. Пышного грантом Программы научных проектов молодых ученых СО РАН. Авторы также признательны В.В. Ковалю за техническое содействие при проведении расчетов пространственной структуры.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Walter A.E., Turner D.H., Kim J., Lyttle M.H., Muller P., Mathews D.H., Zuker M.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. P. 9218–9222.
2. *Goodchild J.* // Nucl. Acids Res. 1992. V. 20. P. 4607–4612.
3. *Parinov S., Barsky V., Yershov G., Kirillov E., Timofeev E., Belgovskiy A., Mirzabekov A.* // Nucl. Acids Res. 1996. V. 24. P. 2998–3004.
4. *Kieleczawa J., Dunn J.J., Studier F.W.* // Science. 1992. V. 258. P. 1787–1791.
5. *Кнорре Д.Г., Пышный Д.В., Иванова Е.М., Бондарь А.А., Морозов И.В., Мертвецов Н.П., Зарытова В.Ф.* // Докл. РАН. 1996. Т. 350. С. 119–121.
6. *Добриков М.И., Гайдамаков С.А., Кошкин А.А., Власов В.В.* // Докл. РАН. 1996. Т. 351. С. 687–691.
7. *Kutyavin I.V., Podymnugin M.A., Vazhina Yu.N., Fedorova O.S., Knorre D.G., Levina A.S., Matayev S.V., Zarytova V.F.* // FEBS Lett. 1988. V. 238. P. 35–38.
8. *Пышный Д.В., Лохов С.Г., Иванова Е.М., Зарытова В.Ф.* // Биоорган. химия. 1998. Т. 24. С. 201–210.
9. *Биченкова Е.В., Гореништейн Л.А., Воробьев Ю.Н., Тенне Е.Ю., Зарытова В.Ф., Иванова Е.М., Мальцева Т.В., Лебедев А.В.* // Биоорган. химия. 1992. Т. 18. С. 901–907.
10. *Биченкова Е.В., Зарытова В.Ф., Иванова Е.М., Мальцева Т.В., Сальников Г.Е., Лебедев А.В.* // Биоорган. химия. 1992. Т. 18. С. 398–412.
11. *Maltseva T., Sandstrom A., Ivanova E.M., Sergeev D.S., Zarytova V.F., Chattopadhyaya J.* // J. Biochem. Biophys. Methods. 1993. V. 26. P. 173–236.
12. *Maltseva T.V., Agback P., Repkova M.N., Venyaminova A.G., Ivanova E.M., Sandstrom A., Zarytova V.F., Chattopadhyaya J.* // Nucl. Acids Res. 1994. V. 22. P. 5590–5599.
13. *Denisov A.Yu., Sandstrom A., Maltseva T.V., Pyshnyi D.V., Ivanova E.M., Zarytova V.F., Chattopadhyaya J.* // J. Biomol. Struct. Dyn. 1997. V. 15. P. 499–516.
14. *Пышный Д.В., Лохов С.Г., Иванова Е.М., Зарытова В.Ф.* // Биоорган. химия. 1999. Т. 25. С. 40–55.
15. *Marky L.A., Breslauer K.J.* // Biopolymers. 1987. V. 26. P. 1601–1620.
16. *Lyng R., Hard T., Norden B.* // Biopolymers. 1987. V. 26. P. 1327–1345.
17. *Lyng R., Rodger A., Norden B.* // Biopolymers. 1992. V. 32. P. 1201–1214.
18. *Williams A.L., Jr., Cheong C., Tinoco I., Jr., Clark L.B.* // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. P. 6649–6659.
19. *Pilch D.S., Kirolos M.A., Liu X., Plum G.E., Breslauer K.J.* // Biochemistry. 1995. V. 34. P. 9962–9976.
20. *Durand M., Maurizot J.C., Asseline U., Thuong N.T., Helene C.* // Bioconjug. Chem. 1993. V. 4. P. 206–211.
21. *Lancelot G., Guesnet J.-L., Asseline U., Thuong N.T.* // Biochemistry. 1988. V. 27. P. 1265–1273.
22. *Roll C., Ketterle C., Faibis V., Fazakerley G.V., Boulard Y.* // Biochemistry. 1998. V. 37. P. 4059–4070.
23. *Lancelot G., Thuong N.T.* // Biochemistry. 1986. V. 25. P. 5357–5363.
24. *Денисов А.Ю., Пышный Д.В., Пышная И.А., Васильев В.В., Иванова Е.М., Зарытова В.Ф.* // Биоорган. химия. 1996. Т. 22. С. 117–125.
25. *Rinkel L.J., Altona C.* // J. Biomol. Struct. Dyn. 1987. V. 4. P. 621–649.
26. *Зенгер В.* Принципы структурной организации нуклеиновых кислот. М.: Мир, 1987.
27. *Лохов С.Г., Кошкин А.А., Кутявин И.В., Митякин М.П., Подымногин М.А., Лебедев А.В.* // Биоорган. химия. 1995. Т. 21. С. 197–205.

28. Пышный Д.В., Пышная И.А., Лохов С.Г., Иванова Е.М., Зарытова В.Ф. // Биоорган. химия. 1995. Т. 21. С. 709–716.
29. Bostock-Smith C.E., Laughton C.A., Searle M.S. // Nucl. Acids Res. 1998. V. 26. P. 1660–1667.
30. Зарытова В.Ф., Иванова Е.М., Романенко В.П. // Биоорган. химия. 1983. Т. 9. С. 516–521.
31. Likhov S.G., Podyminogin M.A., Sergeev D.S., Silnikov V.N., Kutuyavin I.V., Shishkin G.V., Zarytova V.F. // Bioconjug. Chem. 1992. V. 3. P. 414–419.
32. Cantor C.R., Tinoco I. // J. Mol. Biol. 1965. V. 13. P. 65–72.
33. Weiner S.J., Kollman P.A., Case D.A., Singh U.C., Ghio C., Alagona G., Profeta S., Weiner P. // J. Amer. Chem. Soc. 1984. V. 106. P. 765–784.
34. Neuhaus D., Williamson M.P. Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis. N. Y.: VCH, 1989.
35. Kim S.G., Lin L.J., Reid B.R. // Biochemistry. 1992. V. 31. P. 3564–3574.
36. Roongta V.K., Jones C.R., Gorenstein D.G. // Biochemistry. 1990. V. 29. P. 5245–5258.
37. Lebedev A.V., Rezvukhin A.I. // Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. P. 5547–5566.

The Nature of Stabilization of the Tandem DNA Duplex pTGGAGCTG · (pCAGC + (Phn-NH-(CH₂)₃-NH)pTCCA) Basing on the UV, CD, and Two-Dimensional NMR Spectroscopy Data

A. Yu. Denisov, D. V. Pyshnyi, and E. M. Ivanova[#]

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

Properties and three-dimensional structure of the tandem DNA duplex pTGGAGCTG · (pCAGC+(PhnL)pTCCA) in aqueous solution, where L is an amino linker and Phn is an *N*-(2-hydroxyethyl)phenazinium residue, were studied spectrophotometrically and by two-dimensional ¹H NMR spectroscopy (COSY and NOESY). When a tandem complex involving a Phn residue-bearing oligonucleotide is formed, the dye aromatic system intercalates into the double helix at the nick site and takes part in two stacking interactions: a strong one (3.5–4 Å) with the T⁵-A¹² base pair of its own duplex moiety and a weak one (4–5 Å) with the C⁴-G¹³ pair of the adjoining duplex (mainly with the C⁴ base). This arrangement of the dye residue, providing a cross-interaction of the phenazinium moiety with the base pairs of the adjacent duplex structures, results in the stabilization of the whole tandem complex.

Key words: induced CD, intercalation, molecular modeling, N-(2-hydroxyethyl)phenazinium, oligonucleotide duplexes, stacking-hybridization, thermal stability, two-dimensional NMR

[#] To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (3832) 39-6275; e-mail: pyshnyi@niboch.nsc.ru.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 5. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.