

УДК 547.963.3

КОМПЛЕМЕНТАЦИОННЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ  
ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ*Н. Г. Долинная, Е. С. Громдва*

Обобщены результаты исследования методами ЯМР- и УФ-спектроскопии, КД и рентгеноструктурного анализа комплексов комплементарных олигонуклеотидов, содержащих от 2 до 15 мономерных звеньев. Рассмотрена структура комплексов в растворе и в кристаллическом состоянии, термодинамика (с привлечением различных теоретических моделей) и кинетика их образования. Обсуждается влияние нуклеотидного состава, последовательности и длины олигомеров на строение и свойства комплексов, а также биологическая значимость этих систем. Уделено внимание вопросу об устойчивости отдельных нуклеотидных пар комплексов в зависимости от их природы и положения в олигомерной цепи.

Библиография — 124 ссылки.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение	138
II. Типы изученных олигомерных комплексов	139
III. Термодинамическое описание комплексообразования комплементарных олигонуклеотидов	140
IV. Особенности термодинамики комплексообразования гетерогенных олигонуклеотидов	148
V. Кинетика образования и диссоциации олигомерных комплексов	152
VI. Комплементационные взаимодействия динуклеотидов	153
VII. Изучение структуры олигомерных комплексов	154

## I. ВВЕДЕНИЕ

Комплементарные комплексы синтетических поли(олиго)нуклеотидов широко используются в качестве моделей фрагментов нуклеиновых кислот (НК) для решения ряда проблем молекулярной биологии. С их помощью изучают термодинамические и кинетические аспекты образования комплементарных пар, необходимые для понимания любых процессов, включающих разрушение и образование двойных спиралей. Возрастает роль нуклеотидных комплексов в изучении белково-нуклеиновых взаимодействий, исследовании механизма действия ферментов нуклеинового обмена и т. д. Недавно комплексы олигодезоксирибонуклеотидов, содержащие последовательности, расщепляемые ферментами рестрикции, стали применяться в новом аспекте — для конструирования рекомбинатных молекул ДНК. Они служат линкерами при присоединении природной или синтетической молекулы ДНК к вектору клонирования или адапторам, с помощью которых в рекомбинатные молекулы встраивают дополнительные сайты рестрикции, а также другие фрагменты ДНК, например иницирующий и терминирующий кодоны, последовательность Шайн — Дальгарно и т. п.

Ранее роль моделей НК выполняли главным образом гомополинуклеотиды и полимеры с повторяющейся ди(три)нуклеотидной последовательностью. В последние годы в связи со значительными успехами синтетической нуклеотидной химии и развитием методов геной инженерии стали доступны комплексы олиго(поли)нуклеотидов гетерогенной последовательности. Особенно широко используются комплексы коротких олигонуклеотидов. Они дают возможность целенаправленно изменять длину двухспиральных участков и варьировать нуклеотидную последовательность. Поскольку короткие олигонуклеотидные комплексы легко диссоциируют в водных буферных растворах при умеренных температурах, с их помощью удобно изучать любые свойства, связанные с разру-

шением двухспиральных структур, а термодинамическое описание таких систем может быть основано на более простых моделях. Олигомерные системы позволяют изучать влияние длины двухспиральных участков и нуклеотидной последовательности на термодинамические и кинетические параметры комплексообразования, а также на оптические свойства двойных спиралей. Олигомерные системы являются наиболее удобными объектами для выяснения кинетики образования комплементарных комплексов и влияния «ошибочных» оснований на стабильность и структуру двойных спиралей.

Вопросам взаимодействия комплементарных олигонуклеотидов посвящено несколько обзоров, являющихся главами монографий и учебников на английском языке [1—4]. В обзоре Рёмера и Риснера [1] обсуждаются в основном теоретические аспекты комплексообразования и теория образования «шпильчатых» структур. Обзор Тсо (1974 г.) [2] посвящен главным образом рассмотрению комплексов с неканоническими парами оснований — самоассоциаты  $\text{oligo(A)}$  [U, C или G]. В обзоре Кантора и Шиммеля [3] рассматриваются статистическая термодинамика и кинетика образования дуплексов олигорибонуклеотидами (включая главным образом шпильчатые и петлеобразные структуры) и использование этих данных для предсказания вторичной структуры РНК, а также кинетики денатурации и ренатурации ДНК. В обзоре Симэна [4] обсуждаются результаты кристаллографического исследования коротких олигомерных дуплексов. Кроме того, комплексы олигонуклеотидов упоминаются в обзорах на другие темы: по взаимодействию моно(олиго)нуклеотидов с полинуклеотидами [5]; по структуре РНК [6]; по исследованию полинуклеотидов [7] и одноцепочечных олигонуклеотидов [8] методом спектроскопии ЯМР. Предлагаемый обзор охватывает практически все аспекты комплексообразования олигонуклеотидов, содержащих от 2 до 15 мономерных звеньев (включая работы по 1981 г.). Особое внимание уделено полученным в последние годы результатам исследования взаимодействия олигонуклеотидов с помощью метода ЯМР-спектроскопии и данным по структуре олигомерных дуплексов. В обзоре не обсуждаются подробно работы, в которых рассматривается образование «шпильчатых» структур и комплексов олигонуклеотидов, содержащих некомплементарные основания.

## II. ТИПЫ ИЗУЧЕННЫХ ОЛИГОМЕРНЫХ КОМПЛЕКСОВ

Олигомерные комплексы могут быть образованы олигонуклеотидами одинаковой или различной длины с комплементарными последовательностями, либо самокомплементарными олигонуклеотидами. В зависимости от нуклеотидной последовательности и длины цепи в этих системах отмечено образование нескольких типов комплексов.

Наиболее полно исследованы комплексы легко доступных синтетических олигорибонуклеотидов гомогенного состава —  $\text{oligo(A)} \cdot \text{oligo(U)}$  [9—11] (комплексы  $\text{oligo(G)} \cdot \text{oligo(C)}$  до сих пор не изучались). Олигомеры гомогенной последовательности склонны к образованию трехцепочечных спиралей, способных слипаться в более высокомолекулярные агрегаты «конкатемерного» типа (см. ниже) [9, 11]. При взаимодействии коротких олигомеров адениловой и уридиловой кислот стехиометрия комплексов независимо от выбранных условий остается  $1A \cdot 2U$  [9]. Автор работы [11] определил, что длина цепи олигомеров, т. е. число мономерных звеньев, участвующих в комплементационных взаимодействиях ( $N$ ), выше которой возможно образование двойных спиралей, равно 7. Системы, включающие олигодезоксирибонуклеотиды, образуют, как правило, двухцепочечные спирали [12]. Так, гибридный олигомерный комплекс  $d(pT)_8 \cdot r[A(pA)_7]$  в нейтральном буфере, содержащем 1 M NaCl, имеет стехиометрию  $1T \cdot 1A$  [13]. Для комплекса олигодезоксирибонуклеотидов разной длины —  $d(pT)_{12} \cdot d(pA)_8$  [14], также характерно двухспиральное строение.

Олигомеры с чередующейся самокомплементарной нуклеотидной последовательностью обычно образуют либо межмолекулярные двухспиральные комплексы, как, например,  $\text{oligo}[\text{d}(\text{pGG}-\text{C})]$ , с длиной цепи от 4 до 7 мономерных остатков [15], либо внутримолекулярные комплексы за счет складывания вдвое олигомерной цепи —  $\text{d}(\text{A}-\text{T})_n$  ( $n > 7$ ) [16]. То или иное строение комплекса определяется, по-видимому, длиной олигомера. При комплексообразовании олигонуклеотидов разной длины с чередующимися некомплементарными основаниями —  $\text{oligo} \cdot [\text{d}(\text{C}-\text{A})] \cdot \text{oligo}[\text{d}(\text{T}-\text{G})]$  [17], а также тринуклеотидов и олигомеров, содержащих повторяющиеся тринуклеотидные последовательности —  $\text{d}(\text{pG}-\text{G}-\text{T}) \cdot \text{d}(\text{pA}-\text{C}-\text{C})_{2-4}$  и др. [18], выгодно образование двухспиральных структур с непрерывным заполнением матрицы более короткими олигомерами.

Детальное исследование структурных особенностей комплексов самокомплементарных блоксополимеров  $(\text{Ar})_m \text{ArU}(\text{pU})_n$  [19] выявило зависимость структуры комплексов от соотношения A/U в олигомерной цепи. При  $m \geq n$  образуется двухцепочечная спираль, если  $m < n$  — более крупные агрегаты, содержащие трехцепочечные участки.

Взаимодействие олигонуклеотидов с гетерогенной нуклеотидной последовательностью, если оно не осложнено самоагрегацией компонентов, как в случае комплекса  $\text{G}-\text{G}-\text{C} \cdot \text{G}-\text{C}-\text{C}$  [20], приводит к образованию коротких двухспиральных дуплексов с фиксированным положением одной нуклеотидной цепи относительно другой [21–26]. Недавно было обнаружено, что гибридный рибо-дезоксирибодуплекс  $\text{r}(\text{C}-\text{U}_5-\text{G}) \cdot \text{d}(\text{C}-\text{A}_5-\text{G})$  имеет трехспиральное (2:1) строение [27].

Если первичная структура гетерогенных олигомеров допускает образование дуплексов с «липкими» концами, например  $\text{d} \cdot (\text{G}-\text{A}-\text{T}-\text{C}-\text{C}-\text{G}-\text{A}-\text{A}-\text{T}-\text{T}-\text{C}-\text{G})$  [28],  $\text{d}(\text{T}-\text{G}-\text{C}-\text{A}-\text{C}-\text{A}-\text{T}-\text{G})$  [29],  $\text{d}(\text{T}-\text{G}-\text{G}-\text{C}-\text{C}-\text{A}-\text{A}-\text{G}-\text{C}-\text{Tp})$  [30, 31],  $\text{d}(\text{A}-\text{T})_3(\text{C}-\text{G})_3$  [32] и др. [33], то при самоассоциации таких олигомеров образуются двойные спирали «конкатемерного» типа. Конкатемеры — двухспиральные комплексы, содержащие повторяющиеся нуклеотидные последовательности. Структура конкатемеров, образованных перечисленными выше олигонуклеотидами, подобна структуре полимерных комплексов, но отличается от последней наличием несовпадающих разрывов в комплементарных цепях.

### III. ТЕРМОДИНАМИЧЕСКОЕ ОПИСАНИЕ КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ КОМПЛЕМЕНТАРНЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

#### 1. Общие принципы кооперативного взаимодействия олигомеров

Согласно современным представлениям, особенности поведения двух(трех)спиральных нуклеотидных структур в растворе определяются взаимодействием между гетероциклическими основаниями, влиянием растворителя и электростатическими эффектами фосфатных групп. Теоретическое рассмотрение природы сил, принимающих участие в комплексообразовании, дано в монографии [34]. В комплементарном комплексе изменение состояния каждого ковалентно связанного мономерного звена не происходит независимо от соседних звеньев, что обуславливает кооперативный характер образования и диссоциации двух(трех)спиральных систем. В процессе диссоциации комплекса резко нарушается компактная упаковка гетероциклических оснований двойной спирали, что находит свое отражение в кооперативном изменении ряда физико-химических характеристик системы [5] — спектров поглощения в УФ- и ИК-областях, параметров КД, ДОВ, сигналов ЯМР, а также гидродинамических параметров и т. д. Кривые зависимости этих параметров от температуры называются кривыми плавления и дают возможность оценить долю спаренных оснований ( $f$ ) при

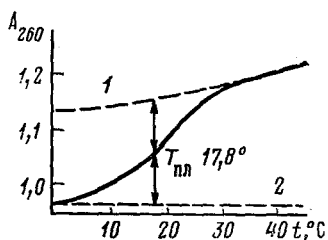
данной температуре. Например, [19]:

$$f(T) = \frac{A_s(T) - A(T)}{A_s(T) - A_d(T)}$$

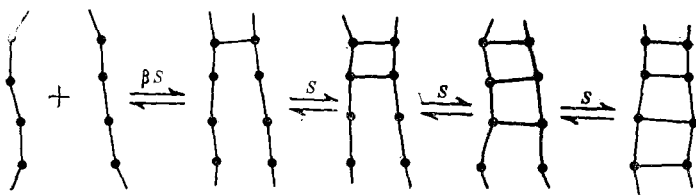
где  $A_s(T)$  и  $A_d(T)$  — УФ-поглощение при данной температуре денатурированного и нативного комплекса соответственно;  $A(T)$  — наблюдаемое при данной температуре УФ-поглощение раствора (точка на кривой плавления, рис. 1).  $T_{пл}$  определяется как температура, при которой  $f=1/2$ .

Статистическая теория перехода спираль — клубок, основанная на модифицированной одномерной модели Изинга [35], в настоящее время достаточно хорошо разработана [36] и используется для получения

Рис. 1. Температурная зависимость оптической плотности межмолекулярного комплекса, образованного  $(Ap)_4ApU(pU)_4$  (1 M NaCl, pH 7,4); 1 —  $A_s(T)$ , 2 —  $A_d(T)$  [19]



термодинамических параметров комплексообразования из анализа экспериментальных кривых плавления. В рамках этой теории кооперативные свойства комплементарных олигомерных комплексов, включающих один тип пар оснований, могут быть описаны простой моделью с тремя параметрами:  $\beta$  — параметр нуклеации двойной спирали ( $\beta \ll 1$ );  $S$  — константа равновесия образования нуклеотидной пары рядом с уже сформированной двухспиральной последовательностью ( $S > 1$ );  $N$  — число пар оснований в дуплексе. Согласно [37], образование спирали для тетрамера можно представить следующей схемой:



где  $\beta S$  — константа образования изолированной пары оснований (определяет процесс зарождения спирали). Сущность теории состоит в том, что пары оснований, находящиеся внутри структуры, гораздо более устойчивы, чем концевые пары, поэтому зарождение двойной спирали приводит к быстрому комплементарному спариванию оснований всей нуклеотидной цепи. Для достаточно длинных нуклеотидных последовательностей, однако, выигрыш в свободной энергии обуславливающий удлинение двойной спирали, компенсируется энтропийной выгодностью не полностью связанных структур. Статистический вес таких структур резко увеличивается с ростом длины цепи. Действительно, в то время как для образования совершенного двухспирального комплекса или полностью диссоциированного клубка существует только один способ, можно представить себе множество интермедиатных структур, содержащих половину теоретически возможных нуклеотидных пар. Конкуренция между двумя указанными факторами приводит к конечной средней длине спиральных сегментов —  $L$ , в районе перехода спираль — клубок, чередующихся с расплавленными участками;  $L$  составляет  $\sim 20$ – $100$  нуклеотидных остатков [1]. В случае достаточно коротких олигомерных последовательностей, при  $N \ll L$  процесс комплексообразования можно описать с помощью модели «все или ничего» (модель двух состояний), пренебрегая количеством олигонуклеотидов, у которых в составе комплекса связаны не все основания.

## 2. Модель двух состояний

Комплексообразование по принципу «все или ничего» имеет место при достаточно больших значениях константы роста спирали,  $S > 10$  [11] ( $\beta \ll 1$ ). В рамках этой модели предполагается, что в интервале перехода спираль — клубок короткие олигонуклеотиды существуют только в двух состояниях — полностью двухспиральном или свободном. Константу равновесия ( $K$ ) комплексообразования олигонуклеотидов, содержащих в своем составе  $N$  мономерных звеньев можно записать как произведение констант отдельных ступеней реакции [15]:

$$K = \beta S^N$$

Константу равновесия можно также выразить через  $f$  [23]:  
 $K = f/2(1-f)^2c$  (взаимодействие самокомплементарных цепей)  
 $K = 2f/(1-f)^2c$  (взаимодействие неидентичных комплементарных последовательностей одинаковой длины)

где  $c$  — общая нуклеотидная концентрация олигомерных компонентов.

Недавно выведена константа равновесия процесса взаимодействия тринуклеотидов с комплементарными олигомерными матрицами, содержащими повторяющиеся тринуклеотидные последовательности [18], а также процесса образования конкатемеров с симметрично перекрывающимися блоками [29]. Доля спаренных оснований может быть определена непосредственно с помощью осмометрических экспериментов. Более удобный способ определения  $f$  заключается в анализе кривых плавления.

Обычно термодинамическое описание процесса комплексообразования включает в себя расчет  $\Delta H^0$ ,  $\Delta S^0$ ,  $\beta$  и  $S$ .

В рамках модели двух состояний энтальпия реакции может быть определена следующим образом.

1. На основании температурной зависимости константы равновесия (по Вант-Гоффу):

$$\ln K = -\Delta H^0/RT + \Delta S^0/R$$

2. Из концентрационной зависимости  $T_{пл}$  [15, 19]:

$$1/T'_{пл} = 1/T''_{пл} + R/\Delta H^0 \cdot \ln c'/c''$$

Отметим, что этот способ применим только для описания межмолекулярных реакций, поскольку внутримолекулярное комплексообразование не зависит от концентрации.

3. Из наклона кривой плавления в точке, соответствующей  $T_{пл}$  [21]:

$$(\partial f/\partial T)_{пл} = \Delta H^0/6RT_{пл}^2$$

Если кривая плавления представлена в дифференциальной форме, выражение, связывающее энтальпию реакции с полушириной перехода ( $T_1 - T_2$ ), представляется следующим образом [38]:

$$\Delta H^0 = -5,106 \cdot R \cdot T_1 \cdot T_2 / (T_2 - T_1)$$

где  $T_1$  и  $T_2$  — температуры в К, при которых  $(\partial f/\partial T^{-1}) = 0,5(\partial f/\partial T^{-1})_{\max}$ . Энтальпия комплексообразования, определенная вторым способом, хорошо согласуется с  $\Delta H^0$ , полученной прямым калориметрическим методом (показано для дуплексов  $d(G-C)_3$  [39] (табл. 1, система 9) и  $A_7U_7$  [40]).

Определение теплового эффекта образования олигомерных дуплексов с разным количеством пар оснований дает возможность оценить изменение энтальпии в расчете на нуклеотидную пару [15]:

$$\Delta H^0 = \Delta H^0_{\beta S} + (N - 1) \Delta H^0_S$$

где индексы  $\beta S$  и  $S$  обозначают соответственно термодинамические параметры образования первой и последующих нуклеотидных пар. Если принять, что устойчивость олигомерного дуплекса пропорциональна ко-

личеству мономерных звеньев, то  $\Delta H^0 = N\Delta H_1^0$  и  $\Delta S^0 = N\Delta S_1^0$ , где  $\Delta H_1^0$  и  $\Delta S_1^0$  — термодинамические параметры образования нуклеотидной пары в предположении, что все пары оснований идентичны [19].

Поскольку  $T_{пл}$  дуплекса измеряется обычно более точно, чем  $\Delta H^0$  и  $\Delta S^0$ , целесообразно рассмотреть зависимость  $T_{пл}$  от длины олигомерного дуплекса. В работе [37] предсказана прямая пропорциональная зависимость между  $1/T_{пл}$  и  $1/N$ :

$$1/T_{пл} = 1/T_{пл}^\infty + R \cdot \ln(\beta c) / N\Delta H_1^0$$

где  $T_{пл}^\infty$  — температура плавления соответствующего полимерного комплекса,  $c$  — концентрация олигомерных компонентов. Наклон прямой в координатах  $1/T_{пл}$ — $1/N$  и отрезок, отсекаемый на оси ординат, дают возможность определить параметр нуклеации и  $T_{пл}$  соответственно при условии, что  $\Delta H_1^0$  известно. При этом предполагается, что значения  $\Delta H_1^0$  и  $\beta$  постоянны. В реальных нуклеотидных системах зависимость  $1/T_{пл}$  от  $1/N$  часто отклоняется от линейной [13, 15], что свидетельствует об изменении  $\beta$  с температурой. Если это справедливо, то энтальпии инициации ( $\Delta H_{\beta S}^0$ ) и роста ( $\Delta H_s^0$ ) спирали должны отличаться. Температурную зависимость  $\beta$  учитывают, вводя стэкинг-фактор ( $\chi$ ), который определяет относительный вклад межплоскостных взаимодействий в энтальпию роста двойной спирали [41]:  $\Delta H_{\beta S}^0 = -\chi \Delta H_s^0$ . Модифицированное уравнение Апплеквиста и Дамла выглядит следующим образом [1]:

$$1/T_{пл} = 1/T_{пл}^\infty + 1/N - \chi \cdot R \cdot \ln(\beta S^z c) / \Delta H_s^0$$

Уравнение включает два предельных случая: энтальпия инициации равна энтальпии роста спирали ( $\chi=0$ ) и энтальпия инициации равна 0 ( $\chi=1$ ). Для комплексов  $oligo(A) \cdot oligo(U)$  наилучшее соответствие с экспериментальными данными получается при  $\chi=0,7$  [11], для  $d(pG-C)_n$  [15] и гибридных комплексов  $d(pT)_8 \cdot rA(pA)_7$  [13] — при  $\chi=1$ , для двойных спиралей  $oligo(A)$  в кислой среде — при  $\chi=0$  [41].

Модель двух состояний является хорошим приближением для расчета термодинамических параметров комплексообразования олигомеров небольшой длины. Однако в каждом конкретном случае полезно оценить справедливость применения этой модели. Условия корректности модели двух состояний приведены в обзоре [1].

### 3. Модель, учитывающая набор состояний (модель «застегивающейся молнии») <sup>1</sup>

При расчете термодинамических параметров комплексообразования достаточно длинных олигомеров ( $N \approx L$ ) уже нельзя пренебрегать концентрацией олигонуклеотидов, у которых в составе комплекса связаны не все основания. Для описания термодинамики таких систем Апплеквистом и Дамлом [37] предложена модель, учитывающая набор частично связанных структур. Учитывая константы равновесия для каждого состояния,  $\beta S^z$  ( $z$  — число спаренных оснований), можно вывести общую константу равновесия комплексообразования:

$$K_z = \beta \chi(z, N) S^z$$

где  $\chi(z, N)$  — число возможных состояний комплекса с  $z$  нуклеотидными парами. Предложенная модель позволяет дать количественную оценку заселенности различных состояний (подробнее теорию см. в [37]). С помощью этой модели проведено термодинамическое описание образования двойной спирали  $oligo(A)$  в кислой среде [41], а также комплексообразования  $d(A-T)_n$  [16],  $oligo(A) + oligo(U)$  [11] и широкого набора гетерогенных олигорибонуклеотидов [22] (табл. 1). В олигомерных комплексах сравнительно небольшой длины (до 10 мономерных звеньев) экспериментальные кривые плавления, как указы-

<sup>1</sup> От английского *staggering zipper model*.

### ТАБЛИЦА

№	Олигомерные системы	Условия комплексообразования	Температурный интервал плавления или $T_{пл}$ , °C	$\beta$ , л/моль	$S$	$\Delta H^0$ , ккал/моль	$\Delta S^0$ , э. е.	$\Delta H_S^0$ , ккал/моль	$\Delta S_S^0$ , э. е.	Ссылки
1	$A(pA)_n + U(pU)_n$ , $N=7-17$	0,5 М какодилатный буфер, pH 6,9	10—35	$5 \cdot 10^{-4} \div 10^{-3}$	7,9(0°)	—	—	—10,9	—30	[11]
2	$d(pT)_7 + rA(pA)_6$ $d(pT)_8 + rA(pA)_7$ $d(pT)_9 + rA(pA)_8$	0,1 М какодилатный буфер, pH 7,0 1 М NaCl	5—30 5—30 5—30	$10^{-4} \div 5 \cdot 10^{-4}$ $10^{-4} \div 5 \cdot 10^{-4}$ $10^{-4} \div 5 \cdot 10^{-4}$	21(0°) 21(0°) 21(0°)	—73,5 —84 —90	—218 —253 —264	—11,2 —11,2 —11,2	—30,7 —30,7 —30,7	[13]
3	GpGpGpC + GpCpCpC	0,1 М фосфатный буфер, pH 7,2	20—40	$10^{-3}$	$\sim 100$ (22—39°)	—21,6	—50	—6 ÷ —7	—12,5	[21]
4	$(Ap)_3ApU(pU)_3$ $(Ap)_4ApU(pU)_4$ $(Ap)_5ApU(pU)_5$ $(Ap)_6ApU(pU)_6$	0,01 М фосфатный буфер, pH 7,0, 1 М NaCl, $10^{-4}$ М ЭДТА; $c \cdot 10^{-4}$ М	12 23 32 40	$1,4 \cdot 10^{-4}$ $1,4 \cdot 10^{-4}$ $1,4 \cdot 10^{-4}$ $1,4 \cdot 10^{-4}$	— — — —	—54(—46) —72(—53) —85(—56) —107(—72)	— — — —	—6,4(—5,8) —7,2(—5,3) —7,1(—4,8) —7,6(—5,1)	—19,8 —19,8 —19,8 —19,8	[19]
5	$(Ap)_3CpG(pU)_3$ $(Ap)_4CpG(pU)_4$	0,01 М фосфатный буфер, pH 7,0, 1 М NaCl, $10^{-4}$ М ЭДТА; $c \cdot 10^{-4}$ М	35,3 42,5	$2,2 \cdot 10^{-4}$ $2,2 \cdot 10^{-4}$	— —	—65 —76	— —	—7,6 —7,6	— —	[49]
	$N=6$ $A_4CG + CGU_4$ $U_2CGA_2$ $A_2CGU_2$ $A_4G_2 + C_2U_4$ $A_2CGU_2$	0,01 М фосфатный буфер, pH 7,0, 1 М NaCl, $10^{-4}$ М ЭДТА; $c \cdot 10^{-4}$ М (спираль A+A) и $2 \cdot 10^{-4}$ (спираль A+B)	—1,3 11,3 22,1 22,8 28,3	— — — — —	— — — — —	—26 —37 —34 —44 —46	—75,8 —112 —96,9 —129 —134	см. табл. 2	см. табл. 2	[23]
6	$A_3CU_3 + A_3GU_3$ $N=8$ $A_4U_4$ $A_4CU_3 + A_3GU_4$ $A_3CGU_3$ $A_3GCU_3$	то же » » » »	16,4 11,5 22,1 35,1 42,3	— — — — —	— — — — —	—41 —51 —52 —66 —53	—122 —160 —156 —196 —150	то же » » » »	то же » » » »	[23] [23]
	$N=9$ $A_4CU_4 + A_4GU_4$ $N=10$ $A_5U_5$ $A_4UAU_4$	» » » » »	26,0 24,3 27,7	— — — — —	— — — — —	—58 —67 —72	—174 —207 —221	» » » » »	» » » » »	[23] [23]

7**	$A_5CU_4 + A_4GU_5$	»	32,6	—	—	—63	—187			
	$A_4CGU_4$		41,9	—	—	—76	—223			
	$A_4GCU_4$		46,8	—	—	—78	—225			
	$N=11$		35,4	—	—	—89	—269	»	»	[23]
	$A_5CU_5 + A_5GU_5$	»		—	—	—84	—257	»	»	[23]
	$N=12$	»	31,5	—	—	—107	—324	»	»	[23]
	$A_6U_6$	»	39,3	—	—	—72	—215	(—14)—15	—38,0	
	$A_7U_7$		8	$5 \cdot 10^{-4}$	170	—92	—268	(—12)—15	—36,8	
	$A_2GCU_2$	0,05 M какодилатный бу-	20	$5 \cdot 10^{-4}$	200	—111	—326	(—12)—15	—37,7	
	$A_3GCU_3$	фер pH 7,0; с $10^{-5}$ M	25	$5 \cdot 10^{-4}$	140	—95	—289	(—15)—15	—41,2	
	$A_4GCU_4$	(A+A) и $2 \cdot 10^{-5}$ M	7	$10^{-3}$	67	—102	—304	(—9)—14	—38,0	[22]
	$A_6CG + CGU_6$	(A+B)	16	$10^{-3}$	53	—76	—233	(—16)—15	—39,5	
	$A_8CG + CGU_8$		1	$10^{-3}$	110	—87	—265	(—16)—17	—47,1	
	$A_4G_2 + C_2U_4$		6	$10^{-3}$	150	—76	—216	(—11)—11	—25,2	
	$A_5G_2 + C_2U_5$		22	$10^{-3}$	108	—88	—254	(—11)—11	—27,3	
	$A_4G_3 + C_3U_4$		24	$10^{-3}$	86					
	$A_5G_3 + C_3U_5$		17,7	—	—	—24,4 (—39,1)	—	—	—	[50]
	GpApGpC + GpCpUpC	0,01 M фосфатный буфер,	16,0	—	—	—24,4 (—30,7)	—	—	—	
	GpApGpC + ApGpCpUpC	pH 7,0, 0,1 M NaCl,	6,0	—	—	—29,3 (—25,9)	—	—	—	
	ApGpCpU pC	$10^{-4}$ M ЭДТА; с $10^{-4}$ M								
8*		(A+A) и $2 \cdot 10^{-4}$ M								
		(A+B)								
9	oligo d (pG—C)	0,045 M фосфатный бу-	10—70	$1,6 \cdot 10^{-4}$	$104 \pm 5$	—28,8 (N=4)	—	—11,1 ± 0,5	—27,9 ± 1	[15]
	$N=4-7$	фер pH 7,2, 1 M NaCl,			(25°)	—38,5 (N=5)				
		$2 \cdot 10^{-3}$ ЭДТА				—50,7 (N=6)				
						—60,2 (N=7)				
	d(G—C) <sub>3</sub> *	0,045 M какодилатный	50	—	—	—56,9 (—59,6)	—	—	—	[39]
		буфер, pH 7,0; 1 M								
		NaCl; с $2,9 \cdot 10^{-5}$ M				—62,7 (—65,8)	—	—	—	[39]
	d(G—C) <sub>3</sub> *	0,045 M какодилатный	—	—	—					
		буфер, pD 7,3, 1 M				—34	—	—	—	[51]
		NaCl (D <sub>2</sub> O)								
10	d(A—T—G—C—A—T)	какодилатный буфер, pD	20—40	—	—	—34	—	—	—	[24]
		7,0 (D <sub>2</sub> O)								
11	d(T—T—G—T—T) +	0,1 M фосфатный буфер,	0—30	—	—					
	+ d(A—A—C—A—A)	pD 7,0, 0,15 M NaCl								
		(D <sub>2</sub> O)								



№	Олигомерные системы	Условия комплексообразования	Температурный интервал плавления или $T_{пл}$ , °C	$V$ , л/моль	$[S]$	$\Delta H^0$ , ккал/моль	$\Delta S^0$ , э. е.	$\Delta H_S^0$ , ккал/моль	$\Delta S_S^0$ , э. е.	Ссылки
12	$d(G-G-A-A-T-T-C-C)$	0,01 М фосфатный буфер, pH 6,85, $10^{-3}$ М ЭДТА, 0,1 М NaCl; $c$ $5,3 \cdot 10^{-3}$ М	$46 \pm 3$	—	—	—51,8	—151	—	—	[52]
13	$dC(pA)_{sp}G + dC(pT)_{sp}G$ $rC(pA)_5G + dC(pT)_{sp}G$ $rC(pA)_{sp}G + rC(pU)_{sp}G$ $dC(pA)_{sp}G + rC(pU)_{sp}G$	0,01 М фосфатный буфер, pH 7, $10^{-4}$ М ЭДТА, 0,2 М NaCl; $c$ $2 \cdot 10^{-4}$ М	27,5 22,9 19,1 < 0	— — — —	— — — —	—41 $\pm$ 4 —48,4 —44 $\pm$ 4 —	— — — —	— — — —	— — — —	[53]
14***	$d(pA-C-C)_2 +$ $+ d(pG-G-T)$ $d(pA-C-C)_3 +$ $+ d(pG-G-T)$ $d(pA-C-C)_4 +$ $+ d(pG-G-T)$ $d(pA-C-C)_2 +$ $+ d(pT-G-G)$ $d(pA-C-C)_3 +$ $+ d(pT-G-G)$ $d(pA-C-C)_4 +$ $+ d(pT-G-G)$ $d(pC-C-A)_2 +$ $+ d(pG-G-T)$ $d(pG-C-A)_2 +$ $+ d(pT-G-G)$ $d(pT-G-G)_2 +$ $+ d(pC-C-A)$ $d(pA-C-C)_2 +$ $+ d(pT-G-G)_2$	0,004 М фосфатный буфер, pH 7,3, 0,2 М NaCl, 0,075 М $MgCl_2$ ; $c$ $0,8 \cdot 10^{-2}$ М	11(9) 18(18) 22(23) 9(9) 18(18) 21(22) 9(9) 8(9) 3(2) 13(15)	$0,5 \cdot 10^{-3}$ $0,5 \cdot 10^{-3}$ $0,5 \cdot 10^{-3}$ $0,5 \cdot 10^{-3}$ $0,5 \cdot 10^{-3}$ $0,5 \cdot 10^{-3}$ $0,5 \cdot 10^{-3}$ $0,5 \cdot 10^{-3}$ $0,5 \cdot 10^{-3}$ $0,5 \cdot 10^{-3}$	35(10°) 20(16°) 19(23°) — 32(16°) 23(22°) 59(9°) — — —	—65 (—54) —98 (—87) —122 (—119) — (—47) — (—78) — (—106) —64 (—58) — (—60) — (—65) — (—53)	—197 (—163) —288 (—262) —355 (—343) — (—138) — (—226) — (302) —198 (—176) — (—183) — (—204) — (—169)	—10,4 —10,4 —10,4 —10,4 —10,4 —10,4 —10,4 —10,4 —10,4 —10,4	—30,6 —30,6 —30,6 —30,6 —30,6 —30,6 —30,6 —30,6 —30,6 —30,6	[18]
15***	$d(T-G-C-A-C-A-T-G)$	0,004 М фосфатный буфер, pH 7,3, 0,2 М NaCl, 0,075 М $MgCl_2$ ; $c$ $10^{-3}$ М	20	—	—	—74,0 $\pm$ 2,4	—216 $\pm$ 8	—9,2 $\pm$ 0,3	—27 $\pm$ 1	[29]

Примечания: В системах 1, 2 и 8 расчет термодинамических параметров выполнен с учетом разрушения стэкинг-конформации одноцепочечных компонентов. При расчете использована модель двух состояний (системы 2-6 и 8-15), модель учитывающая набор состояний (система 1) или обе модели (система 7; в скобках значения  $\Delta H^0$ , рассчитанные по модели двух состояний); сокращения обозначений олигонуклеотидов взяты из оригинальных статей.

\* Приведены значения  $\Delta H^0$  и  $\Delta H_S^0$ , вычисленные разными способами. \*\* Значения  $S^0$ ,  $\Delta H_S^0$  и  $\Delta S_S^0$  относятся к образованию G-C-пар. \*\*\* Приведены значения  $T_{пл}$ ,  $\Delta H^0$  и  $\Delta S^0$ , вычисленные из температурных зависимостей параметров КД, в скобках — значения, вычисленные из температурных зависимостей УФ-поглощения.

валось выше, хорошо описываются более простой моделью двух состояний, и термодинамические параметры реакции, полученные с помощью обеих моделей, очень близки [22]. Поскольку прямое применение модели «застегивающейся молнии» при обработке экспериментальных данных достаточно сложно, обычно для получения термодинамических параметров в качестве первого приближения используют модель «все или ничего». Затем проводят коррекцию полученных результатов на основе анализа заселенности промежуточных состояний.

#### 4. Введение поправок при расчете термодинамических параметров

Очевидно, что в температурном интервале плавления олигомерных дуплексов (обычно при сравнительно низких температурах) имеется равновесие между двухспиральным комплексом и одноцепочечными компонентами, в которых лишь частично нарушены межплоскостные взаимодействия. Собственная вторичная структура олигомерных тяжей обусловлена стэкинг-взаимодействиями оснований, которые ослабляются с ростом температуры [42, 43]. Таким образом, в олигомерных системах на переход спираль — клубок накладывается некооперативный процесс разрушения стэкинг-конформации одноцепочечных компонентов. Для того чтобы сравнивать термодинамические параметры комплексообразования в разных системах, необходимо исключить стэкинг-взаимодействия олигомеров, т. е. вести отсчет от полностью разрушенного состояния.

Вклад в свободную энергию перехода спираль — клубок, обусловленный разрушением стэкинг-конформации одноцепочечных олигонуклеотидов, можно представить следующим образом [11, 22]:

$$\Delta G_{\text{стэкинг}}^0 = RT \ln (1 + e^{\Delta G_A^0/RT}) (1 + e^{\Delta G_B^0/RT})$$

где  $\Delta G_A^0$  и  $\Delta G_B^0$  — свободная энергия стэкинг-взаимодействия соседних оснований в комплементарных олигомерных цепях (A и B). Рассчитать величины  $\Delta G_A^0$  и  $\Delta G_B^0$  достаточно трудно. Для этого необходимо рассмотреть переход каждого взаимодействующего олигомера из упорядоченного в неупорядоченное состояние и рассчитать энтальпию и энтропию этого процесса. Более простым подходом является использование термодинамических параметров стэкинг-взаимодействия динуклеозидфосфатов [13, 22]. Такого рода коррекция термодинамических данных была проведена для ряда олигорибонуклеотидных систем [11, 13, 22] (табл. 1). Из данных таблицы следует, что значения энтальпии и энтропии комплексообразования олигорибонуклеотидов, вычисленные с учетом и без учета разрушения стэкинг-конформации одноцепочечных компонентов, значительно различаются. Это свидетельствует о том, что при температуре плавления комплекса собственная вторичная структура олигорибонуклеотидных цепей нарушена незначительно. Поскольку термическая устойчивость стэкинг-конформации в олигодезоксирибонуклеотидах гораздо ниже, чем в олигорибонуклеотидах [44, 45], соответствующий энергетический вклад не является существенным при расчете термодинамических параметров комплексообразования ДНК-олигомеров [15]. Интересно отметить, что доля стэкинг-конформации одноцепочечных компонентов уменьшается при добавлении в водные растворы до 10% спиртов, мочевины и др. [46].

Статистическая теория, развитая в работе [47], предсказывает, что стэкинг-конформация одноцепочечных олигомеров является важнейшим из трех факторов, определяющих разницу в поведении коротких двойных спиралей и полимерных систем. Два других фактора — влияние концевых нуклеотидных пар и эффекты соседних пар оснований, характерные для гетерогенных олигомерных дуплексов.

Электростатические взаимодействия также влияют на изменение свободной энергии комплексообразования. Теоретическое рассмотрение

взаимодействия отрицательных зарядов фосфатных групп комплементарных нуклеотидных цепей с противоионами предсказывает для полимерных систем линейное увеличение  $T_{пл}$  с увеличением логарифма концентрации одновалентных ионов [38, 48]. В случае олигомерных комплексов наблюдается некоторое отклонение от линейной зависимости (например, в системе  $oligo(rA) \cdot oligo(dT)$  [13]. Было отмечено также влияние длины цепи олигомерного комплекса на зависимость  $T_{пл}$  от  $\lg I$  ( $I$  — ионная сила раствора) [14, 15].

Вклад электростатических взаимодействий в свободную энергию перехода спираль — клубок обычно описывается следующим уравнением [11, 13, 48]:

$$\Delta G_{\text{электр}}^0 = RT (C_1 - C_2 \lg I)$$

где  $C_1$  и  $C_2$  — эмпирические константы. По данным авторов работы [13], константа  $C_2$  для олигомерных комплексов может быть оценена из зависимости константы устойчивости двойной спирали от ионной силы раствора.

Таким образом, изменение свободной энергии в результате увеличения длины двойной спирали на одну нуклеотидную пару ( $\Delta G_s^0$ ) с учетом стэкинг-взаимодействия в одноцепочечных олигомерах и электростатических взаимодействий, выражается следующим образом [11, 13]:

$$\Delta G_s^0 = \Delta G_{12}^0 + \Delta G_{\text{стэкинг}}^0 + \Delta G_{\text{электр}}^0$$

где  $\Delta G_{12}^0$  — свободная энергия образования дополнительной нуклеотидной пары из статистического клубка с незаряженными фосфатными группами.

Тогда константа роста цепи  $S = e^{\Delta G_s^0/RT}$ . Разрушение стэкинг-конформации одноцепочечных олигомеров и электростатические взаимодействия оказывают влияние также на процесс зарождения двойной спирали [11].

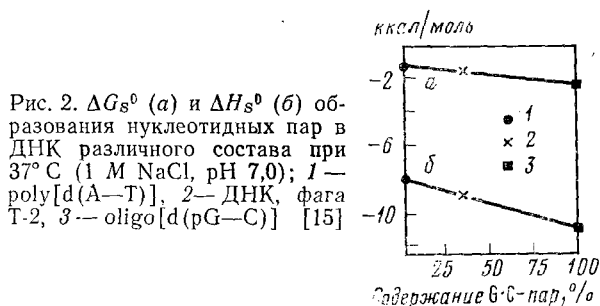
Термодинамические параметры образования олигомерных комплексов разнообразного состава и длины, вычисленные с привлечением различных моделей, суммированы в табл. 1. Первые детальные термодинамические исследования комплексообразования олигорибонуклеотидов были приняты в работе [11] [ $oligo(A) \cdot oligo(U)$ ] и работах [19, 49] — [ $(Ap)_n ApU(pU)_n$  и  $(Ap)_n CpG(pU)_n$ ]. В дальнейшем были изучены олигомерные дуплексы более разнообразного состава и нуклеотидной последовательности. В работе [23] сообщаются термодинамические параметры 19 РНК-дуплексов, содержащих от 6 до 14 нуклеотидных пар. Была изучена также термодинамика образования ДНК-дуплексов: самокомплементарных олигомеров с повторяющейся динуклеотидной последовательностью —  $d(A-T)_n$  [16] и  $d(pG-C)_n$  [15], с гетерогенной последовательностью —  $d(A-T-G-C-A-T)$  [51],  $d(G-G-A-A-T-T-C-C)$  [52] и др. (табл. 1). Недавно осуществлено термодинамическое описание образования двухспиральных олигодезоксирибонуклеотидных комплексов с разрывами в цепи фосфодиэфирных связей, включая комплексы конкатемерного типа [18, 29, 30].

#### IV. ОСОБЕННОСТИ ТЕРМОДИНАМИКИ КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ ГЕТЕРОГЕННЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

##### 1. Устойчивость А·U(Т)- и G·C-пар

Повышение термической устойчивости природных ДНК и синтетических двухспиральных полинуклеотидов при увеличении относительного содержания G·C-пар — хорошо известный экспериментальный факт [54]. Корреляция между содержанием G·C-пар и устойчивостью

спиралей была продемонстрирована и на уровне олигомерных комплексов. Так, в работе [49] при изучении устойчивости комплексов блоксополимеров  $(Ap)_n ApU(pU)_n$ ,  $(Ap)_n CpG(pU)_n$  и  $(Ap)_n G(pU)_n \cdot (Ap)_n C(pU)_n$  было показано, что  $T_{пл}$  двойных спиралей увеличивается прямо пропорционально процентному содержанию G·C-пар; при увеличении содержания G·C-пар на 1%  $T_{пл}$  комплексов возрастает в среднем на 0,9°. Для природных ДНК и РНК это соотношение составляет 0,5 и 0,75° соответственно. Повышенная устойчивость G·C-пар в олигомерных дуплексах, по мнению авторов работы [49], может быть вызвана тем, что нуклеотидная последовательность пар оснований в дуплексах далека от квазистатистического распределения, характерного для природных НК. Энтальпия комплексообразования  $(Ap)_n CpG(pU)_n$  существенно выше энтальпии комплексообразования  $(Ap)_n ApU(pU)_n$  —65 и —54 ккал/моль соответственно (при  $N=8$ ). По оценке авторов [49]  $\Delta H_{G·C}^0$  приблизительно на 3—4 ккал/моль выше, чем  $\Delta H_{A·U}^0$ .



Изучение дуплексов, содержащих комплементарные пары одного типа, позволило рассчитать термодинамические параметры образования A·U(T)- или G·C-пар. Значение  $\Delta H_{G·C}^0$ , полученное при изучении комплексообразования  $d(pG·C)_n$  [15], —11,1 ккал/моль, значительно выше, чем  $\Delta H_{A·T}^0$ , которая оценивается в —8 ккал/моль [16], а свободная энергия одной G·C-пары при 37°С соответствует свободной энергии двух A·T-пар. На рис. 2 представлена зависимость термодинамических параметров образования нуклеотидных пар от состава дезоксирибонуклеотидных дуплексов.

В работе [22] проведено сопоставление значений энтальпии образования G·C- и A·U-пар, полученных с учетом и без учета стэкинг-взаимодействий в олигомерах. При исследовании комплексообразования большого набора олигорибонуклеотидов гетерогенного состава было установлено [22], что энтальпия образования G·C-пары из полностью деструктурированного клубка (—15 ккал/моль) выше соответствующей величины для A·U-пары (—10,7 ккал/моль). Если при расчете энтальпии не вводить поправку, учитывающую температурную зависимость стэкинг-конформации одноцепочечных олигомеров, то разница между  $\Delta H_{G·C}^0$  (—5÷—6 ккал/моль) и  $\Delta H_{A·U}^0$  (—5÷—6 ккал/моль) практически исчезает из-за того, что оба основания в G·C-парах взаимодействуют с соседними основаниями, в то время как в паре A·U стэкинг-взаимодействия с участием урацила незначительны.

Для ряда рибо(дезоксирибо)нуклеотидных комплексов были рассчитаны константы устойчивости ( $S$ ) G·C- и A·U(T)-пар (табл. 1). Сравнивая  $S_{G·C}$  (100—200) с  $S_{A·U}$  (~10), можно видеть, что G·C-пара в среднем в 15 раз более устойчива, чем A·U(T)-пара.

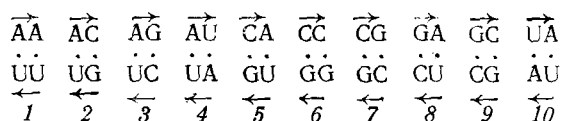
## 2. Влияние нуклеотидной последовательности и других факторов на устойчивость дуплексов

Из анализа данных табл. 1 (система 7) следует, что  $S_{G·C}$  зависит от нуклеотидной последовательности олигомерных компонентов, т. е. на устойчивость олигомерных комплексов влияет не только длина спира-

ли и нуклеотидный состав, но и последовательность пар оснований в цепи (нуклеотидное окружение). Впервые зависимость термической устойчивости нуклеотидных комплексов от последовательности пар оснований наблюдалась для синтетических полимерных систем с повторяющейся ди(три)нуклеотидной последовательностью [55, 56].

Согласно современным представлениям [23], различие в устойчивости изомерных комплексов обусловлено разной геометрией «стэкинга» соседних пар оснований в спиральных структурах. Теоретические расчеты предсказывают, что вклад каждой пары оснований в стабильность комплекса зависит главным образом от ближайших соседних пар, хотя в реальных системах часто нельзя пренебрегать вкладом дальних взаимодействий. Очевидно, что наиболее ярко влияние нуклеотидной последовательности должно проявляться в свойствах коротких олигомерных комплексов. Действительно, если сравнить пять изомерных спиралей, содержащих две G·C- и четыре A·U-пары, то величина  $T_{пл}$  этих комплексов в условиях одинаковой нуклеотидной концентрации изменяется от  $-1,3$  до  $28,3^\circ\text{C}$  [23]. Удлинение нуклеотидной цепи приводит к постепенному усреднению термодинамических параметров и в пределе для полимерных структур со статистическим распределением оснований вдоль цепи этот эффект не проявляется.

Рассматривая только уотсон-криковские A·U(T)- и G·C-взаимодействия, можно написать 10 различных сочетаний из двух нуклеотидных пар, т. е. 10 различных способов межплоскостных взаимодействий двух пар оснований в двойной спирали:



Авторы работы [57] выделили три комбинации двух пар оснований — две соседние A·U-пары в любом порядке, две соседние G·C-пары в любом порядке и две соседние A·U- и G·C-пары в любом порядке, и получили три равновесные константы для описания равновесия спираль — клубок на основе взаимодействия соседних пар. Изучение термодинамики ряда олигомерных дуплексов разного состава и нуклеотидной последовательности позволило [23] рассчитать термодинамические вклады шести сочетаний нуклеотидных пар. В табл. 2 приведены значения  $\Delta H_s^\circ$ ,  $\Delta S_s^\circ$  и  $\Delta G_s^\circ$  образования конкретной нуклеотидной пары рядом с уже сформированной парой. Из данных таблицы видно, что

дублет  $\begin{array}{c} \overrightarrow{CC} \\ \overleftarrow{GG} \end{array}$  более стабилен, чем  $\begin{array}{c} \overrightarrow{GC} \\ \overleftarrow{CG} \end{array}$ , который в свою очередь устойчивее

$\begin{array}{c} \overrightarrow{CG} \\ \overleftarrow{GC} \end{array}$ , а комплекс, состоящий из блока G·C-пар, за которым следует блок

A·U-пар, более устойчив, чем двойная спираль, содержащая повторяющиеся A·U- и G·C-пары. Отметим, что недавно с помощью метода ЯМР-спектроскопии удалось определить равновесные константы димеризации дидезоксирибонуклеотидов разной последовательности [58]. Порядок стабильности соответствующих миниспиралей полностью соответствует предсказанному авторами работы [23]:  $d(pG-G) \cdot d(pC-C) \geq d(pG-C) \cdot d(pG-C) > d(pC-G) \cdot d(pC-G)$ . С помощью рассчитанных термодинамических параметров роста цепи можно довольно точно предсказать устойчивость коротких двухспиральных комплексов и приблизительно оценить  $T_{пл}$  полимерных структур известной последовательности.

В работе [59] обнаружено, что  $T_{пл}$  двухцепочечных тетрануклеотидов C—A—U—G, U—G—C—A и A—G—C—U, содержащих равное число G·C- и A·U-пар, различаются ( $25$ ,  $33$  и  $34^\circ$  соответственно), т. е. дуплексы с A·U-парами на концах более стабильны, чем те, которые

ТАБЛИЦА 2

Термодинамические параметры образования нуклеотидной пары, рядом с уже сформированной парой оснований (для всех возможных комбинаций из двух уотсон-криковских пар) \* [23]

Реакция	$\Delta H_{S.}^0$ ккал/моль	$\Delta S_{S.}^0$ , э. е.	$\Delta G_{S.}^0$ ккал/моль, 25°C
$\begin{array}{c} \text{—A—} \\ \diagdown \\ \text{—A—} \end{array} \rightarrow \text{—A—A—}$ $\begin{array}{c} \text{—U—} \\ \diagdown \\ \text{—U—} \end{array} \rightarrow \text{—U—U—}$	—8,2	—23,5	—1,2
$\begin{array}{c} \text{—A—} \\ \diagdown \\ \text{—U—} \end{array} \rightarrow \text{—A—U—}$ $\begin{array}{c} \text{—U—} \\ \diagdown \\ \text{—A—} \end{array} \rightarrow \text{—U—A—}$ $\begin{array}{c} \text{—A—} \\ \diagdown \\ \text{—A—} \end{array} \rightarrow \text{—A—A—}$ $\begin{array}{c} \text{—U—} \\ \diagdown \\ \text{—U—} \end{array} \rightarrow \text{—U—U—}$	—6; 5	—16,4	—1,6
$\begin{array}{c} \text{—A—} \\ \diagdown \\ \text{—C—} \end{array} \rightarrow \text{—A—C—}$ $\begin{array}{c} \text{—U—} \\ \diagdown \\ \text{—G—} \end{array} \rightarrow \text{—U—G—}$ $\begin{array}{c} \text{—A—} \\ \diagdown \\ \text{—G—} \end{array} \rightarrow \text{—A—G—}$ $\begin{array}{c} \text{—U—} \\ \diagdown \\ \text{—C—} \end{array} \rightarrow \text{—U—C—}$	—5,9	—12,7	—2,1
$\begin{array}{c} \text{—C—} \\ \diagdown \\ \text{—A—} \end{array} \rightarrow \text{—C—A—}$ $\begin{array}{c} \text{—G—} \\ \diagdown \\ \text{—U—} \end{array} \rightarrow \text{—G—U—}$ $\begin{array}{c} \text{—C—} \\ \diagdown \\ \text{—U—} \end{array} \rightarrow \text{—C—U—}$ $\begin{array}{c} \text{—G—} \\ \diagdown \\ \text{—A—} \end{array} \rightarrow \text{—G—A—}$	—13,0	—33,5	—3,0
$\begin{array}{c} \text{—C—} \\ \diagdown \\ \text{—G—} \end{array} \rightarrow \text{—C—G—}$ $\begin{array}{c} \text{—U—} \\ \diagdown \\ \text{—C—} \end{array} \rightarrow \text{—U—C—}$ $\begin{array}{c} \text{—C—} \\ \diagdown \\ \text{—C—} \end{array} \rightarrow \text{—C—C—}$ $\begin{array}{c} \text{—G—} \\ \diagdown \\ \text{—G—} \end{array} \rightarrow \text{—G—G—}$	—14,7	—34,9	—4,3
$\begin{array}{c} \text{—C—} \\ \diagdown \\ \text{—C—} \end{array} \rightarrow \text{—C—C—}$ $\begin{array}{c} \text{—G—} \\ \diagdown \\ \text{—G—} \end{array} \rightarrow \text{—G—G—}$	—13,7	—29,8	—4,8

\* Расчет проведен на основании термодинамических данных, представленных в табл. 1 для систем [23].

оканчиваются на G·C-пары. Авторы [59] полагают, что центральное ядро («core») из G·C-пар приводит к увеличению стабильности.

Одним из факторов, повышающих устойчивость дуплексов, является фланкирование двойной спирали неспаренным (висящим) нуклеотидным остатком [19, 59], причем пуриновые нуклеотиды приводят к большей стабилизации на ( $\sim 11^\circ$ ), чем пиримидиновые (на  $\sim 5^\circ$ ) [59]. Локализация дополнительных нуклеотидных остатков (3'- или 5'-конец) не имеет большого значения [59]. Причина возрастания прочности дуплекса до конца не ясна. Одно из объяснений [6] состоит в том, что дополнительный «стэкинг» с висящими основаниями стабилизирует концевые пары дуплекса, которые в противном случае часто размыкаются при температуре ниже  $T_{пл}$  (см. стр. 161). Если длина некомплементарных плеч составляет несколько нуклеотидных остатков, то, напротив, устойчивость олигомерных дуплексов уменьшается. Например, смесь двух икозануклеотидов, способных образовывать 10 нуклеотидных пар, вообще не имеет профиля кооперативного плавления [60].

При сравнении устойчивости ряда семизвенных дуплексов (система 13, табл. 1) дезокси-ряда, рибо-ряда и гибридных сходного состава и последовательности (в олигорибонуклеотидах Т заменяется на U) обнаружено, что дуплекс  $dC(pA)_3pG \cdot rC(pU)_3pG$ , с  $oligo(dA \cdot rU)$  последовательностью в отличие от остальных чрезвычайно нестабилен [3]. По-видимому, dA-кластеры длиной  $\sim 5$  пар предпочитают конформацию В-ДНК, вследствие этого не могут образовывать устойчивые гибриды ДНК-РНК. Это, по мнению авторов [53], облегчает терминацию транскрипции. В работе [46] рассмотрено влияние растворителя на термодинамику комплексообразования  $d(G-C)_3$ . Добавление первичных спиртов, формамида, диметилформамида или мочевины к водному буферному раствору  $d(G-C)_3$  приводит к дестабилизации двойной спирали.

## V. КИНЕТИКА ОБРАЗОВАНИЯ И ДИССОЦИАЦИИ ОЛИГОМЕРНЫХ КОМПЛЕКСОВ

Кинетические параметры образования или диссоциации нуклеотидных комплексов обычно получают с помощью метода температурного скачка. В основе этого метода лежит фиксирование изменений во времени различных физико-химических параметров системы, например УФ-поглощения, после скачкообразного повышения температуры. При этом получают так называемые релаксационные кривые. Характеристикой релаксационных кривых служат времена релаксации —  $\tau$ . Во всех изученных межмолекулярных олигомерных комплексах реакция образования комплементарных пар представляет собой процесс второго порядка, характеризующийся единственным временем релаксации (от  $10^{-3}$  до 1 с) [22, 61], причем температура, при которой достигается максимальная амплитуда релаксационной кривой, близко соответствует  $T_{пл}$  дуплекса [21].

Время релаксации, характеризующее процесс комплексообразования олигомеров, непосредственно связано с константами скоростей образования ( $k_r$ ) и диссоциации ( $k_d$ ) двойной спирали и равновесными концентрациями комплементарных цепей —  $c_A$  и  $c_B$  [13, 22]:

$$1/\tau = 4k_r c_A + k_d \quad (\text{комплексообразование самокомплементарных олигонуклеотидов: } A \xrightleftharpoons[k_d]{k_r} AA)$$

$$1/\tau = k_r(c_A + c_B) + k_d \quad (\text{комплексообразование неидентичных олигомеров: } A + B \xrightleftharpoons[k_d]{k_r} AB)$$

Константы скоростей прямой и обратной реакций могут быть оценены с помощью графика зависимости  $1/\tau$  от концентрации свободных цепей.

Комплексообразование олигонуклеотидов можно рассматривать как процесс последовательного замыкания комплементарных пар. Поскольку образование зародышевой нуклеотидной пары (или нескольких пар) является реакцией второго порядка, эта стадия является более сложным и медленным процессом, чем последующий рост двойной спирали [62]. Если образование первой нуклеотидной пары является стадией, лимитирующей комплексообразование, то энтальпия активации процесса ( $\Delta H_r^*$ ) должна совпадать с энтальпией активации элементарной реакции, скорость которой ограничена диффузией компонентов —  $+2 \div 6$  ккал/моль [22]. Однако  $\Delta H_r^* \text{oligo}(A)$  в кислой среде [41],  $\text{oligo}(A) \cdot \text{oligo}(U)$  [61] и  $\text{oligo}(rA) \cdot \text{oligo}(dT)$  [13] отрицательна. Для разрешения этого противоречия Эйген и Поршке [41] предположили, что стадией, лимитирующей процесс рекомбинации, является образование устойчивого ядра из нескольких нуклеотидных пар. При этом образованию устойчивого зародыша спирали предшествует стадия предравновесия между быстро образующимися и распадающимися неустойчивыми нуклеотидными парами. Дальнейший рост двойной спирали происходит очень быстро. При этом общая константа скорости рекомбинации не зависит

от длины цепи олигомера [13]. На основании анализа величин  $\Delta H_r^*$  было установлено, что в случае комплексов, содержащих только А·U(T)-пары, зародыш спирали включает  $\sim 3$  пары оснований [13, 41, 61, 62].

Поскольку константа ассоциации G·C-пар примерно в 15 раз больше, чем А·U(T)-пар, процесс рекомбинации олигонуклеотидов смешанного состава будет начинаться с образования G·C-пар [22]. В этих системах  $k_r$  изменяется от  $10^5$  до  $10^7$  л/моль·с [21, 22, 25, 51]. Для  $(A)_n \cdot (U)_n[(T)_n]$  спиралей  $k_r$  составляет величину того же порядка ( $10^6$  л/моль·с) [61]. Поршке и др. [22], изучив кинетику комплексообразования в гетерогенных системах, выделили три характерные кинетические особенности: 1) в данной серии олигомеров скорость рекомбинации быстро уменьшается с увеличением длины цепи; 2) скорость рекомбинации олигомеров с одинаковой длиной цепи в 6 раз быстрее, когда две G·C-пары находятся на конце спирали, а не в середине; 3) энтальпия активации образования олигомерных дуплексов, содержащих G·C-пары, положительна.

Первые две особенности, по мнению авторов [22], объясняются различной доступностью G·C-пар, инициирующих рекомбинацию в олигомерных системах с разной нуклеотидной последовательностью и длиной. Наличие положительной энтальпии активации комплексообразования гетерогенных олигомеров [21, 22] связано с тем, что стадией, лимитирующей процесс рекомбинации, является образование одной или, возможно, двух G·C-пар. В этом случае нет необходимости использовать модель, включающую стадию предравновесия нескольких пар оснований.

Диссоциация олигомерных дуплексов происходит гораздо медленнее, чем их образование [21, 22, 25, 51, 61]. Константа скорости диссоциации дуплекса в отличие от  $k_r$  сильно зависит от длины спирали, т. е. от количества нуклеотидных пар, которые должны разорваться, прежде чем будет достигнута критическая интермедиатная спираль [13, 22]. Энтальпия активации процесса диссоциации,  $\Delta H_d^*$ , увеличивается с ростом длины цепи [13, 62].

## VI. КОМПЛЕМЕНТАЦИОННЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ДИНУКЛЕОТИДОВ

Характерным свойством двухспиральных олигонуклеотидов является зависимость устойчивости комплекса от длины цепи и нуклеотидной концентрации. Связь между  $T_{пл}$ ,  $N$  и  $c$  дается уравнением Аплеквиста и Дамла (стр. 143). Чем меньше длина олигомеров, тем выше должна быть их концентрация, для того чтобы наблюдалось образование элементарного комплекса. Так, при суммарной нуклеотидной концентрации  $10^{-4}$  М олигомеры, способные к комплементарным взаимодействиям, должны содержать не менее семи мононуклеотидных звеньев [10, 14]. Повышение нуклеотидной концентрации в 10 раз способствует образованию комплексов тетрамеров [10]. В последние годы в связи с развитием техники ЯМР-спектроскопии высокого разрешения удалось обнаружить в водной среде взаимодействия между комплементарными динуклеотидами, представляющими собой самые маленькие структурные единицы, содержащие 3'→5'-фосфодиэфирные связи. В работах [58, 63, 64] было показано, что в водных растворах высокой нуклеотидной концентрации (до 0,1 М) самокомплементарные динуклеозидмонофосфаты рибо-серии — CpG и GrC [63] и их дезоксианалоги [58], а также динуклеотиды d(pC—G) и d(pG—C) [58, 64] образуют при низких температурах димеры, стабилизированные H-связями. Образование комплементарных пар наблюдалось также в концентрированных растворах смесей CpU+ArC [53], d(pG—G)+d(pC—C) и d(pG—T)+d(pA—C) [58]. Следует отметить, что уже на уровне комплексов динуклеотидов проявляется зависимость термической устойчивости миннаторных двойных спиралей от содержания G·C-пар. Так, в смеси GrU+ArC образуется менее прочный комплекс, чем комплекс, возникаю-



щий в концентрированных растворах GrC (CrG) за счет самоассоциации динуклеозидмонофосфатов, а в растворе UrA, как и в кристаллическом состоянии (см. ниже) комплексообразования вообще не наблюдается [63].

## VII. ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРЫ ОЛИГОМЕРНЫХ КОМПЛЕКСОВ

### 1. Рентгеноструктурный анализ

Наиболее исчерпывающая информация о пространственной структуре двухспиральных олигонуклеотидов может быть получена путем их кристаллографического исследования. К настоящему времени методом рентгеноструктурного анализа (РСА) высокого разрешения ( $<2 \text{ \AA}$ ), позволяющего следить за индивидуальными атомами, изучены монокристаллы следующих самокомплементарных олигонуклеотидов: UrA [65, 66], ArU [67], GrC [68, 69], d(pA—T—A—T) [70] и d(C—G—C—G—C—G) [71]. С несколько меньшим разрешением (2,25—2,7  $\text{\AA}$ ) проведено исследование монокристаллов d(C—G—C—G) [72, 73], d(C—G—C—G—A—A—T—T—C—G—C—G) [74, 75] и d(G—G—T—A—T—A—C—C) [76]. Кроме того, в 1976 г. были получены рентгенограммы еще одного димера — TrpA [77]. Однако изучались не монокристаллы, а «ориентированные» образцы TrpA, в которых молекулы TrpA выстраивались в спиральные структуры (предел разрешения при РСА волокон обычно не превышает 3—4  $\text{\AA}$ ).

Из перечисленных самокомплементарных димеров только ArU и GrC образуют в кристаллическом состоянии уотсон-криковские пары, Кристаллическая структура UrA вследствие специфической конформации фосфодиэфирной связи моделирует петлеобразные участки РНК, а TrpA образует уникальную левоспиральную структуру, в которой остатки аденина и тимина соседних молекул соединены водородными связями «по Хугстину». Остановимся подробнее на описании кристаллической структуры ArU и GrC, сделанном Ричем и сотр. [67, 69], поскольку это первые данные об уотсон-криковских парах в атомном разрешении. Две молекулы ArU (или GrC) образуют в кристалле сегмент правой двойной спирали РНК с антипараллельным направлением цепей. Комплементарные основания не лежат точно в одной плоскости, а слегка повернуты. В каждой цепи основания уложены в стопку и максимально перекрывают друг друга. Такой полноценный «стэкинг» является следствием пурин-пиримидиновой последовательности динуклеозидфосфатов. Расстояние между C(1')-атомами остатков рибозы в парах A·U немного короче, чем аналогичное расстояние в G·C-парах. Это означает, что двухспиральный остов не совершенно регулярная структура, а структура с систематическими «вариациями», зависящими от природы оснований. И наконец, места связывания противоионов зависят от состава и последовательности оснований. Связывание ионов  $\text{Na}^+$  приводит к изменению стерических и электростатических характеристик двойной спирали в участках, содержащих ArU-последовательность.

d(pA—T—A—T) [70] в кристаллическом состоянии образует сегмент правой двойной спирали с антипараллельным направлением цепей и двумя парами оснований, стабилизированными водородными связями между первым аденином и вторым тимином одной и четвертым тимином и третьим аденином другой молекулы. Не вступившие в комплементарные взаимодействия моонуклеотидные звенья удалены друг от друга в пространстве. Характерной чертой пространственной структуры d(pA—T—A—T) являются различные для остатков тимидина и аденозина конформации дезоксирибозы (C(3')-эндо для A и C(2')-эндо для T) и углы поворота вокруг гликозидных связей. Конформация фосфодиэфирной связи во фрагментах ...ArT... и ...TrA... также различается. Эти данные послужили отправной точкой для описания необычной конформации и, как следствие, особой биологической роли poly[d(A—T)]·poly[d(A—T)] участков ДНК. Круг и др. [78] предположили, что в

растворе  $\text{poly}[\text{d}(\text{A}-\text{T})] \cdot \text{poly}[\text{d}(\text{A}-\text{T})]$  принимает так называемую чередующуюся *B*-форму. В отличие от классической *B*-формы ДНК повторяющийся структурный мотив этой двойной спирали — две нуклеотидные пары.

Наиболее поразительные результаты, приведшие к открытию левоскрученной двойной спирали ДНК, были получены в группе Рича при рентгенографическом исследовании кристаллов  $\text{d}(\text{C}-\text{G}-\text{C}-\text{G}-\text{C}-\text{G})$  (разрешение 0,9А, кристаллизация в условиях высокой ионной силы) [71]. Повторяющимся структурным элементом этой спирали, содержащей 12 Г·С-пар на виток, являются две нуклеотидные пары. Чередующиеся остатки гуанозина и цитидина имеют различную конформацию гликозидной связи и фуранозного цикла: *син*- и  $\text{C}(3')$ -*эндо* для Г, *анти*- и  $\text{C}(2')$ -*эндо* для С. Очень необычен ход углеводо-фосфатного остова: фосфатные группы идут зигзагом. Это дало повод авторам [71] назвать новую структуру *Z*-формой ДНК. Вскоре левоскрученная *Z*-форма была обнаружена у  $\text{d}(\text{C}-\text{G}-\text{C}-\text{G})$  (при кристаллизации в условиях высокой ионной силы) [72] и в волокнах  $\text{poly}[\text{d}(\text{G}-\text{C})] \cdot \text{poly}[\text{d}(\text{G}-\text{C})]$  [79, 80]. Изучая конформационную вариабельность  $\text{d}(\text{C}-\text{G}-\text{C}-\text{G})$  в кристаллическом состоянии авторы [73] сделали заключение о большей конформационной гибкости *Z*-формы ДНК по сравнению с *B*-формой. Они описали структурный переход из *Z* в *Z'*, связанный с изменением конформации фуранозного цикла гуанозина [ $\text{C}(3')$ -*эндо* →  $\text{C}(1')$ -*экзо*], а также переход  $Z_I \rightarrow Z_{II}$ , характеризующий изменение ориентации фосфодиэфирной связи в узле ...GrC... Авторы делают вывод о том, что *Z'*,  $Z_I$  и  $Z_{II}$  — конформационные варианты в пределах *Z*-формы. Интересно, что додекамер  $\text{d}(\text{C}-\text{G}-\text{C}-\text{G}-\text{A}-\text{A}-\text{T}-\text{T}-\text{C}-\text{G}-\text{C}-\text{G})$  существует в кристаллическом состоянии в *B*-форме с 10,1 основания на виток спирали, т. е. концевые С—Г—С—Г-участки не закручиваются в *Z*-спираль [74].

В 1981 г. Дикерсон и Дрю [75] провели детальное исследование методом РСА с разрешением, близким к атомному додекануклеотида  $\text{d}(\text{C}-\text{G}-\text{C}-\text{G}-\text{A}-\text{A}-\text{T}-\text{T}-\text{C}-\text{G}-\text{C}-\text{G})$ , который в кристаллическом состоянии образует полный виток двойной спирали в *B*-форме. За счет эффекта кристаллической упаковки ось спирали этого дуплекса немного изогнута и отклоняется от вертикали на 19°. Впервые строго показано, что локальные параметры двойной спирали зависят от последовательности оснований, отклоняясь от классической *B*-формы, причем влияние нуклеотидной последовательности на структуру дуплекса гораздо более существенно, чем влияние кристаллической упаковки и других внешних факторов. Хотя локальные изменения конформации дуплекса происходят в пределах *B*-формы, были обнаружены участки двойной спирали, геометрия которых более характерна для *A*- или *D*-форм ДНК. Оказалось, что в пурин-пиримидиновом блоке плоскости оснований «открыты в большую бороздку двойной спирали, в то время как плоскости пиримидин-пуринового блока экспонированы в малую бороздку; основания в комплементарных парах повернуты как лопасти пропеллера, причем в большей степени в А·Т-парах. Важный вывод, который делают авторы статей [75, 81] на основании корреляции экспонированности участков углеводо-фосфатного остова со скоростью расщепления этих участков ферментом ДНКазой I, заключается в том, что структура додекануклеотидного дуплекса идентична в кристаллическом состоянии и в растворе.

В следующей работе этой серии [82] дано описание гидратной оболочки  $\text{d}(\text{C}-\text{G}-\text{C}-\text{G}-\text{A}-\text{A}-\text{T}-\text{T}-\text{C}-\text{G}-\text{C}-\text{G})$  в кристалле. Было найдено, что вокруг каждой молекулы дуплекса расположено 72 молекулы воды, 50 из которых находятся в бороздках спирали или в первом координационном слое фосфатных групп. Сделана попытка оценить вклад этого фактора на стабильность двойной спирали. На основании рентгеноструктурных данных были рассчитаны [83] электростатический потенциал и стерическая доступность реакционноспособных участков самокомплементарного додекамера. Оказалось, что в центре олиго-

нуклеотидного дуплекса сосредоточен больший отрицательный потенциал, чем на концах. Это может быть общей чертой таких коротких спиралей, независимой от их нуклеотидной последовательности.

Большие конформационные возможности олигонуклеотидных дуплексов дезоксирибы были продемонстрированы в работе [76], посвященных кристаллографическому изучению  $d(G-G-T-A-T-A-C-C)$ , содержащего фрагмент промоторного района эукариот. Оказалось, что этот октамер образует правую двойную спираль в А-форме. Для дезоксирибонуклеотидных дуплексов, содержащих G·C- и A·T-пары, такой необычный факт наблюдается впервые. Существование олигомера такой последовательности в стабильной А-форме может быть логично связано с функциями промоторного района.

Успехи в рентгенографическом исследовании монокристаллов самокомплементарных олигонуклеотидов открывают новую страницу в изучении тонкой структуры и конформационных возможностей НК. Несомненно, что число объектов, изученных этим методом, будет непрерывно расти, поскольку информация о структурных особенностях НК чрезвычайно важна на современном этапе для выяснения на молекулярном уровне механизма белково-нуклеинового узнавания, регуляции генной активности и мутагенеза.

## 2. УФ-спектроскопия и КД (ДОВ)

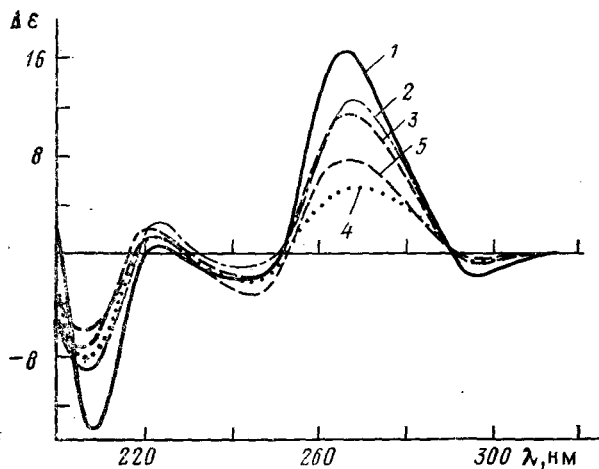
Оптические методы — УФ-спектроскопия и КД (ДОВ) нашли широкое применение при исследовании комплементационных взаимодействий олигонуклеотидов в растворе. С помощью этих методов определяют стехиометрию связывания в олигомерных системах [10, 20]. По изменению вида спектров КД комплементарных (самокомплементарных) олигонуклеотидов судят об образовании дуплекса [18, 29, 84]. Иногда, добиваясь более заметных изменений КД, добавляют лиганд, избирательно взаимодействующий с двухспиральными структурами, например дистамин А [84]. Изучение температурных зависимостей УФ-поглощения и параметров КД (ДОВ) позволяет определить  $T_{пл}$  и вычислить термодинамические параметры образования комплементарных пар (табл. 1). Изменение УФ-поглощения олигонуклеотидов в процессе образования (диссоциации) двойной спирали лежит в основе получения кинетических характеристик комплексообразования [13, 21]. Кроме того, методы УФ-спектроскопии и КД (ДОВ) дают полезную информацию о вторичной структуре олигомерных дуплексов.

Структурный аспект прослеживается в работе Пола [85], посвященной исследованию зависимости гипохромии комплексов, образованных  $d(pG-C)_n$ , от числа пар оснований в двойной спирали. Анализ такой зависимости позволил автору сделать вывод о близости геометрических параметров указанных олигомерных дуплексов и природной ДНК.

Более полная информация о структуре олигомерных комплексов может быть получена с помощью метода КД. Вследствие высокой чувствительности КД к взаимному расположению гетероциклических остатков и конформации мономерных звеньев, сходство спектров КД позволяет судить о близости геометрических параметров сравниваемых структур. Так, в работе [9] с помощью этого метода показана структурная аналогия трехтяжевых спиралей  $(Ap)_3A \cdot 2(Up)_3U$  и  $oligo(A) \cdot 2poly(U)$ . Особый интерес представляет сопоставление КД олигомерных комплексов и природных НК известной структуры. Оказалось, что спектры КД комплексов олигорибонуклеотидов друг с другом или с олигодезоксирибонуклеотидами имеют неконсервативный характер, свойственный А-форме РНК в водной среде [10, 53, 86], в то время как спектры КД олигодезоксирибонуклеотидных комплексов сходны со спектрами нативной ДНК в В-форме [53, 87]. Причем спектры КД комплексов, образованных  $d(pG-C)_n$  в растворах слабой ионной силы [69] и  $d(pG-G-T) \cdot d(pA-C-C)_2$  [18, 89], близки к спектрам КД ДНК в В-форме с высоким содержанием G·C-пар, а спектр КД  $d(pA)_5 \cdot d(pT)_{12}$  [89] похож

на спектр КД ДНК с содержанием G·C-пар  $\sim 30\%$ . Метод КД дает возможность легко различить формы двойных олигомерных спиралей в растворе. Спектр КД  $d(C-G)_n$  в водном растворе с низкой концентрацией NaCl [32] похож на спектр  $poly[d(C-G)] \cdot poly[d(C-G)]$ , снятый в тех же условиях и соответствующий B-форме [90]. Добавление NaCl (до 5 M) приводит к инверсии знака длинноволнового эффекта Коттона, что связано с переходом олигонуклеотидного дуплекса в левозакрученную Z-форму [32] (существование такой формы для  $d(C-G)_n$  в условиях высокой ионной силы доказано с помощью РСА). По данным КД, для  $d(C-G)_2$  Z-форма в растворе не стабильна [32]. В случае  $d(A-T)_3(C-G)_3$ , образующего комплекс конкатемерного типа, в котором блок  $d(C-G)_n$  фланкирован чередующейся A-T-последовательностью, переход в Z-форму, как следует из данных КД, не наблюдается [32] (ср. с самокомплементарным  $d(C-G-C-G-A-A-T-T-C-G-C-G)$ , изученным методом РСА, см. выше).

Рис. 3. Спектры КД пяти двухспиральных изомерных комплексов, содержащих четыре A·U- и две G·C-пары оснований (1 M NaCl, pH 7,0,  $c = 10^{-2}$  M на мономерное звено); 1 —  $A_2GCU_2$ , 2 —  $A_2CGU_2$ , 3 —  $U_2CGA_2$ , 4 —  $A_4G_2+C_2U_4$ , 5 —  $A_4CG+CGU_4$  [86]



Недавно были рассчитаны спектры КД для многочисленных возможных конформаций  $d(T-G-G-C-G-T-A-T-T-C-T) \cdot d(A-G-A-A-T-A-C-G-C-C-A)$  и было показано, что амплитуда КД при 275 нм линейно зависит от угла закручивания спирали и «твиста» оснований в паре [91]. Установление такой корреляции важно для исследования зависимости КД нуклеиновых кислот от структурных параметров.

Согласно современным представлениям, спектры КД НК зависят не только от вторичной структуры молекул, но и от нуклеотидной последовательности. Грэй и Тиноко [92] развили теорию, согласно которой вид спектра КД ДНК обусловлен взаимодействием главным образом соседних нуклеотидных пар. Очевидно, что зависимость КД от последовательности оснований должна особенно четко проявляться на уровне олигомерных дуплексов, поскольку в них, в отличие от ДНК, частоты встречаемости определенных сочетаний из двух нуклеотидных пар не будут усредняться. На рис. 3 в качестве примера приведены спектры КД изомерных рибонуклеотидных дуплексов [86]. В двух работах [86, 93] олигомерные дуплексы известной последовательности были использованы для проверки возможности определения нуклеотидной последовательности НК с помощью КД. На основании анализа спектров КД серии олигонуклеотидных дуплексов были выделены [86] вклады всех 10 сочетаний из двух уотсон-криковских нуклеотидных пар. Полученные спектры изомерных димеров динуклеотидов резко отличаются и по форме и по амплитуде. Спектры КД полимерных спиралей, сконструированные с учетом выделенных спектральных вкладов, плохо согласуются с экспериментальными кривыми. Авторами работы [93] была предпринята попытка рассчитать спектры КД 12 рестрикционных фрагментов ДНК длиной от 12 до 360 нуклеотидных пар. Для этого был использо-

ван набор спектральных вкладов определенных сочетаний из двух нуклеотидных пар, взятых из спектров синтетических двухспиральных полинуклеотидов (гомогенных или с повторяющейся ди- и тринуклеотидной последовательностью). Расчетные и экспериментальные спектры удовлетворительно совпадают, за исключением положительной полосы КД при 270 нм, которая особенно чувствительна к конформационным изменениям. Несовпадение особенно заметно в случае дуплексов, содержащих менее 43 нуклеотидных пар, по-видимому, за счет концевых эффектов.

### 3. Спектроскопия ЯМР

Наряду с рассмотренными оптическими методами в последнее время для изучения олигомерных комплексов стал широко использоваться метод ЯМР-спектроскопии [24—27, 39, 46, 52, 58, 59, 87, 94—106]. Этот метод позволяет дать детальное описание пространственной организации комплексов в растворе, выяснить динамику процесса диссоциации двухспиральных структур и оценить степень структурной аналогии олигомерных дуплексов с природными ДНК и РНК. С помощью оптических методов регистрируют суммарные эффекты, сопровождающие переход спираль — клубок, а метод ЯМР дает возможность следить за поведением индивидуальных пар оснований.

К настоящему времени на приборах высокого класса (270, 300, 360, 500 и 600 МГц) стало возможным разрешить и провести отнесение большинства резонансных сигналов протонов оснований и сахарных колец в двухспиральных олигонуклеотидах, содержащих до 12 пар оснований, и сделать заключение о локальном окружении каждого протона. Это обеспечило возможность независимого наблюдения за изменением характера окружения каждой нуклеотидной пары дуплекса при изменении концентрации, температуры, рН и т. д. В случае длинных нуклеотидных дуплексов происходит уширение резонансных линий, связанное с жесткостью полимерных НК, которая препятствует быстрому движению сегментов нуклеотидных цепей в растворе. Получены ПМР-спектры ряда таких дуплексов:  $A_{25} \cdot U_{25}$  [107];  $d(C_{15}A_{15}) \cdot d(T_{15}G_{25})$  [108];  $dG_n \cdot rC_{22}$ ,  $dG_n \cdot rC_{11}$ ,  $dC_{16}$ ,  $dG_n \cdot dC_{22}$  ( $n > 70$ ) [109] и двух рестрикционных фрагментов ДНК, содержащих 43 и 69 пар оснований [102], однако для них не были отнесены сигналы протонов индивидуальных оснований.

Недавно получены спектры ЯМР олигонуклеотидных дуплексов на ядрах  $^{31}P$  (145,7 МГц) [52, 98]. Эти спектры содержат данные о конформации углеводо-фосфатного остова олигомеров, образующих двойную спираль. С их помощью зафиксировано нарушение «стэкинга» оснований при температурах, превышающих  $T_m$  дуплекса. В 1980 г. Коэн [103] проанализировал полученные ранее ЯМР $^{31}P$ -спектры oligo  $d(G-C)$  и предположил, что наличие двух хорошо разрешенных сигналов  $^{31}P$  в 4 М LiCl и одного сигнала при низкой концентрации соли свидетельствует о левозакрученной Z-форме спирали у этих олигомеров в концентрированном солевом растворе.

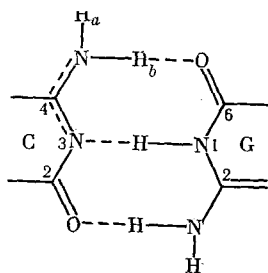
Для получения информации о структуре олигомерных комплексов исследуют две различные группы сигналов протонов.

1) Сигналы от необменивающихся протонов, связанных с углеродными атомами гетероциклических оснований или сахара, — дублеты H(5) и H(6) протонов пиримидиновых оснований (синглет H(6) в случае тимина), синглеты H(2) и H(8) протонов пуриновых оснований, синглет протонов  $CH_2$ -группы тимина и сигналы протонов сахарного кольца, главным образом H(1'). Все они локализованы в области 4—9 м.д. относительно 4,4-диметил-4-силапентан сульфоната натрия (ДСС). Спектры изучаются в  $D_2O$  или в буферных растворах с  $D_2O$ . Определение положения сигналов олигонуклеотидов осуществляют, как правило, с помощью стандартной методики «инкрементного отнесения» [26, 27, 110, 111], измеряя  $\delta$  димеров, тримеров и других фрагментов данного олигомера и предполагая, что величины  $\delta$  в основном не меня-

ются при переходе к интактному олигомеру. На величину химического сдвига ( $\delta$ ) сигнала каждого протона оказывают экранирующее влияние соседние основания, а также основания в комплементарной цепи. Кроме того, положение сигнала определяется конформацией фуранозного цикла, поворотом основания вокруг гликозидной связи, анизотропией фосфатной группы и межцепочечными водородными связями. Следовательно,  $\delta$  зависит от структуры двойной спирали. При термической диссоциации комплекса сигналы необменивающихся протонов оснований смещаются как в область слабых, так и в область сильных полей [27]. Кривые зависимости химических сдвигов сигналов необменивающихся протонов от температуры дают возможность непосредственного получения термодинамических характеристик процесса перехода спираль — клубок. При этом можно следить за диссоциацией каждой нуклеотидной пары дуплекса, хотя отнесение и регистрация изменений сигналов с температурой остается сложной задачей.

2) Сигналы медленно обменивающихся кольцевых протонов имино-групп N(1)—H гуанина и N(3)—H урацила (тимина), принимающих непосредственное участие в образовании водородных связей между основаниями (уотсон-криковские пары). Спектры регистрируются в H<sub>2</sub>O или в водных буферных растворах. Резонансный сигнал N(1)—H гуанина характеризует G·C-пару, сигнал N(3)—H урацила (тимина) — A·U(T)-пару. Отметим, что резонансы протонов иминогрупп свободных олигомеров не наблюдаются в воде из-за быстрого обмена протонов с растворителем. Образование водородной связи приводит к замедлению обмена протонов с водой и появлению резонансных сигналов в области слабых полей (12—15 м.д. относительно ДСС). Наличие таких сигналов в спектре ПМР смеси коротких олигонуклеотидов является убедительным доказательством образования дуплекса. С ростом температуры наблюдается, как правило, сдвиг в сильное поле, уширение и исчезновение сигналов, связанное с увеличением относительного содержания открытых форм и быстрым обменом протонов иминогрупп в открытой форме с водой. Температура исчезновения сигнала не связана с термодинамической устойчивостью двойной спирали, а дает лишь сравнительную характеристику устойчивости разных нуклеотидных пар дуплекса, поскольку резонансные сигналы протонов N(1)—H-групп G и N(3)—H-групп T (U) уже при концентрации открытых форм ~10% сильно уширены и не могут далее прослеживаться. Наблюдение за поведением отдельных сигналов при постепенном повышении температуры помогает их отнесению [27, 52, 99, 112]. При этом учитывают, что резонанс протона иминогруппы «изолированной» G·C-пары наблюдается в более сильном поле (13,6 м.д.), чем соответствующий резонанс A·T-пары (14,6 м.д.) [96]. Иногда при отнесении используется прием химической модификации [99] или проводится сравнение расчетных и экспериментальных химических сдвигов [27]. В случае образования трехспиральных олигомерных комплексов помимо сигналов обменивающихся протонов уотсон-криковских пар в районе 14,6—15 м.д. наблюдаются сигналы протонов иминогрупп, отвечающие образованию «обратных» хугстиновских A·U-пар [27, 104].

Наряду с сигналами протонов иминогрупп рассматривают сигналы обменивающихся протонов аминогрупп оснований C(4)—NH<sub>2</sub> цитозина и C(2)—NH<sub>2</sub> гуанина, лежащие в области 6—9 м.д. относительно ДСС. Для этих протонов обмен с растворителем происходит медленнее по сравнению с протонами иминогрупп [98]. Частично двоевязанный характер C—NH<sub>2</sub> связи цитозина ограничивает вращение аминогруппы, поэтому при низких температурах наблюдаются отдельные широкие сигналы для каждого из протонов NH<sub>2</sub>-группы цитозина. При комплементарных взаимодействиях сигнал протона, участвующего в образовании водородной связи (H<sub>b</sub> на схеме), сдвигается в слабое поле, в то время как для сигнала протона, доступного растворителю (H<sub>a</sub>), наблюдается сильнополюсный сдвиг. В случае гуанина наблюдается один резонансный сигнал от 2 протонов аминогруппы, что объяс-



няется быстрым вращением последней вокруг связи  $C-NH_2$ . При образовании комплементарной пары усредненный сигнал от протонов  $NH_2$ -группы гуанина смещается в слабое поле. Зависимость химического сдвига этого сигнала от нуклеотидной концентрации может быть использована для оценки величины константы равновесия комплексобразования динуклеотидов [58, 63]. Кроме того, анализируя зависимость ширины сигналов протонов аминогрупп цитозина и гуанина от температуры, можно судить о быстром или медленном вращении аминогруппы вокруг  $C-NH_2$ -связи в олигомерных дуплексах [98]. Следует отметить, что эти сигналы чаще используются для детектирования образования комплементарных комплексов между динуклеозидфосфатами (динуклеотидами) [58, 63, 64].

Детальное изучение с помощью спектроскопии ПМР структурных особенностей ряда олигомерных систем показало, что комплексы, содержащие дезоксирибонуклеотидные звенья —  $d(A-T-G-C-A-T)$  [96, 113],  $d(pG-C)_4$ ,  $d(pT-A)_{3,4}$ ,  $d(pA-G)_4 \cdot d(pC-T)_4$  [112],  $d(A-A-A-G-C-T-T-T)$  [114],  $d(C-C-G-G)$ ,  $d(G-G-C-C)$  [98],  $d(G-G-A-A-T-T-C-C)$  [52],  $d(A-T-C-C-T-A-T-A-G-G-A-T)$  [99],  $d(C-T_5-G) \cdot d(C-A_5-G)$  [27] и  $d(A-A-T-T-G-C-A-A-T-T)$  [106], принимают в растворе конформацию, близкую к *B*-форме ДНК, в то время как для комплексов рибопроизводных  $A-A-G-C-U-U$  [26, 97],  $C-C-G-G$  [96] и  $A-G-C-U$  [105], а также гибридных  $d(C-T_5-G) \cdot r(C-A_5-G)$  [27] характерна геометрия *A* (*A'*)-формы РНК. Этот вывод был сделан в результате сопоставления расчетных величин химических сдвигов и величин химических сдвигов, наблюдаемых экспериментально для обменивающихся и необменивающихся протонов оснований данной нуклеотидной пары олигомерного комплекса. При расчете химических сдвигов определяли влияние магнитных полей кольцевых токов на сигналы соответствующих протонов (без учета влияния других факторов) при всех возможных комбинациях соседних пар оснований с учетом известных геометрических параметров *A*-, *B*- и *D*-форм ДНК [112, 113, 115]. Следует иметь в виду, что соответствие расчетных и экспериментальных химических сдвигов сигналов обменивающихся протонов наблюдается далеко не всегда [27] и чаще только для внутренних пар оснований дуплексов [95, 96, 98, 112, 114]. Сигналы протонов концевых пар находятся в более сильном поле, чем это требуется по расчету. По мнению авторов [95, 112, 114], для концевых нуклеотидных пар дуплексов характерно равновесие между *H*-связанными и открытыми формами (сигналы открытых форм проявляются в более сильном поле) и химический сдвиг сигналов протонов иминогрупп определяется соотношением популяций этих двух форм. Альтернативным объяснением сильного сдвига сигналов обменивающихся протонов концевых нуклеотидных пар является образование межмолекулярных структур за счет «стэкинга» концов олигомерных дуплексов [98]. Несовпадение расчетных и экспериментальных  $\delta$  было отмечено и для необменивающихся протонов концевых пар и приписано стэкинг-взаимодействию концов дуплексов [52, 98]. При исследовании двухспиральных  $A-G-C-U$  и  $A-C-G-U$  был значительно более строго проведен расчет  $\delta$  необменивающихся протонов оснований [105]. В случае  $A-C-$

G—U в отличие от его изомера не совпали расчетные и экспериментальные  $\delta$  большинства необменивающихся протонов оснований. Авторы сделали вывод о нестандартной форме двойной спирали в A—C—G—U, подчеркнув важность этого заключения для оценки конформационных возможностей РНК-дуплексов.

С помощью данных ПМР была также установлена конформация фуранозных колец нуклеотидных звеньев комплекса, определяющая форму двойной спирали. С этой целью были измерены вицинальные константы спин-спинового взаимодействия протонов у C(1') и C(2') и сравнены с величинами, предсказанными для различных конформаций фуранозы. Оказалось, что для всех углеводных остатков d(A—T—G—C—A—T) [113], d(C—C—G—G) и d(G—G—C—C) [98] в условиях комплексообразования характерна C(3')-экзо-конформация, свойственная ДНК в В-форме. В дуплексе d(C—T<sub>5</sub>—G)·d(C—A<sub>5</sub>—G) два остатка дезоксирибозы, принадлежащие d(C—A<sub>5</sub>—G), на 90% находятся в C(2')-эндо-конформации и, следовательно, двойная спираль имеет геометрию В-формы [27]. В отличие от этих систем фуранозные кольца всех мономерных звеньев комплекса, образованного A—A—G—C—U—U [26] или всех мономерных звеньев рибосцепи комплекса d(C—T<sub>5</sub>—G)·r(C—A<sub>5</sub>—G) [27] находятся в C(3')-эндо-конформации, характерной для РНК в A(A')-форме [26]. На основании анализа температурных зависимостей  $J_{1,2'}$  был сделан вывод о преобладании C(3')-эндо-конформации фуранозных колец и, следовательно, (A(A')-форме спирали в дуплексах, образованных C—A—U—G [111] и A—G—C—U [105], а также в G—A—G—C·G—C—U—C [110].

Дополнительная информация о вторичной структуре олигомерных комплексов была получена при изучении взаимодействия двойных спиралей, обогащенных G·C-парами, с антибиотиком актиномицином-Д. Характерным свойством этого антибиотика является специфическое связывание с ДНК в В-форме и отсутствие родства к РНК и гибридным спиральям [116]. С помощью метода спектроскопии ПМР было показано, что феноксазониевое кольцо актиномицина-Д внедряется между G·C-парами двухспиральных олигодезоксирибонуклеотидов [96, 112, 117, 118], что свидетельствует о ДНК-подобной конформации таких комплексов в водном растворе.

При образовании дуплекса A—G—C—U или A—C—G—U [105] происходит изменение (на 20° и больше) гликозидного торсионного угла в аденозиновых и цитидиновых остатках. Это было показано на основании анализа  $\delta$  аномерных H(1')-протонов.

Изучение температурной зависимости химических сдвигов и ширины сигналов обменивающихся протонов олигомерных дуплексов привело Пателя и др. [52, 94, 117] к заключению, что для таких систем (независимо от нуклеотидного состава и последовательности) в условиях термодинамической стабильности спирали имеется вероятность неполного связывания концевых нуклеотидных пар. Другими словами, предполагается быстрое образование и разрушение водородных связей между основаниями концевых нуклеотидов, причем с ростом температуры равновесие сдвигается в сторону увеличения относительного содержания открытых форм. Процесс быстрого образования и диссоциации нуклеотидных пар на концах двойной спирали («обтрепывание») <sup>2</sup> происходит гораздо быстрее и при более низкой температуре, чем термодинамическое плавление — расхождение тяжёлой дуплекса, и приводит к усредненному резонансному сигналу, химический сдвиг и ширина которого определяется соотношением открытых форм и форм, стабилизированных Н-связями. На рис. 4 представлен спектр ПМР дуплекса, образованного C—C—G—G, при 0°С. Линиями отмечено рассчитанное положение сигналов протонов концевых и внутренних G·C-пар. Если принять, что сдвиг в сильное поле и уширение сигналов от протонов концевых G·C-пар обусловлены увеличением относительного содержания

<sup>2</sup> От английского fraying.



открытых форм, то получается, что при 0° С концевые пары оснований С—С—G—G—C—C—G—G «расплавлены» на 8% [95]. Аналогичный анализ спектра ПМР дуплекса, образованного d(A—T—G—C—A—T), приводит к выводу, что в условиях устойчивости двойной спирали основания концевых А·Т-пар 15% времени находятся в открытой форме [96]. При понижении температуры сигналы протонов иминогрупп А·Т- и Т·А-пар двухспирального d(A—T—G—C—A—T) смещаются в сторону слабого поля, причем смещение сигналов протонов концевых А·Т-пар дуплекса наблюдается до —30° С (водно-мета-

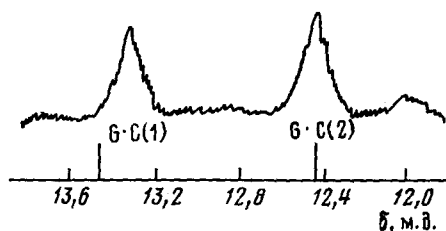


Рис. 4

Рис. 4. Спектр ЯМР (220 МГц) обменивающихся протонов иминогрупп гуаниновых остатков в дуплексе  $\text{CpCpGrG}$  при 0° С в воде. Линиями показано рассчитанное положение резонансных сигналов при условии, что структура двухспирального  $\text{CpCpGrG}$  соответствует структуре РНК-11 [95]

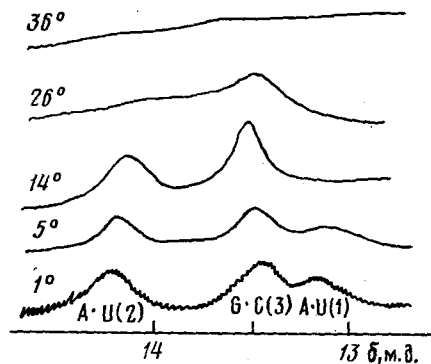


Рис. 5

Рис. 5. Спектр ЯМР (220 МГц) протонов иминогрупп дуплекса  $\text{ApArGrCpUpU}$  при различных температурах в  $\text{H}_2\text{O}$  (1M NaCl, pH 7,6 [97])

нольная среда), а внутренних Т·А-пар — до —20° С. Авторы работы [94] интерпретировали это, как увеличение доли Н-связанных форм при понижении температуры. Согласно их расчетам, при 3° С фракция открытых форм составляет для концевых А·Т-пар — 22,5%, внутренних Т·А-пар — 1,1%, а для центральных G·C-пар отсутствует. При повышении температуры для комплексов олигонуклеотидов любого состава и последовательности наблюдается обратный процесс — последовательное увеличение относительного содержания открытых форм (сначала раскрываются концевые, а потом внутренние нуклеотидные пары) [27, 94, 95, 99, 112]. На рис. 5 представлены спектры ПМР комплекса, образованного А—А—G—C—U—U, в области слабого поля при разных температурах. При 1° С наблюдаются линии поглощения протонов иминогрупп при 13,2, 13,5 и 14,2 м.д. (каждый сигнал соответствует двум идентичным резонансам протонов иминогрупп эквивалентных нуклеотидных пар). С ростом температуры все три сигнала уширяются и исчезают в следующем порядке: сначала сигнал при 13,2 м.д., которому соответствуют концевые А·U-пары, затем сигнал при 14,2 м.д. — внутренние А·U-пары и, наконец, сигнал при 13,5 м.д. — центральные G·C-пары [97]. Таким образом, сигналы менее прочных (за счет неполного спаривания) концевых А·U-пар уширяются и исчезают быстрее, чем сигналы экранированных от действия растворителя внутренних А·U- и G·C-пар. В дуплексе d(A—T—C—C—T—A—T—A—G—G—A—T) плавление также начинается с концов двойной спирали. Предварительного

плавления центрального А—Т-фрагмента не происходит, т. е. последовательность из 4 А·Т-пар, защищенная G·C-парами, слишком коротка для локальной дестабилизации дуплекса [99].

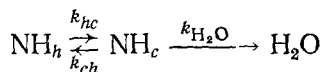
При изучении температурной зависимости  $\delta$  необменивающихся протонов были определены  $T_{пл}$  отдельных нуклеотидных пар дуплексов и было показано, что эти  $T_{пл}$  зависят от состава и последовательности оснований. При диссоциации двухспиральных олигонуклеотидов, не содержащих концевых G·C-пар— $d(A-T-G-C-A-T)$  [51] и  $A-A-G-C-U-U$  [26], устойчивость нуклеотидных пар возрастает в следующем порядке: концевые А·U(Т)-пары < внутренние А·U(Т)-пары < центральные G·C-пары. Тенденция концевых пар к «дифференциальному» плавлению (т. е. до плавления остальной части дуплекса) сильно понижена для дуплексов, в которых А·U-пары являются внутренними, а более прочные G·C-пары — концевыми. Так, для дуплексов  $C-A-U-G$  [111],  $G-A-G-C-G-C-U-C$  [110],  $d(G-G-A-A-T-T-C-C)$  [52],  $d(C-A_3-G) \cdot d(C-T_3-G)$  [27], а также  $C-C-G-G$ , в состав которого входят исключительно G·C-пары [95], не наблюдается ступенчатой диссоциации (переход спираль — клубок идет по принципу «все или ничего» [27]) и  $T_{пл}$  индивидуальных нуклеотидных пар, определенная с помощью ПМР-спектроскопии (на необменивающихся протонах), соответствует  $T_{пл}$  спирали, полученной оптическими методами. С другой стороны, указанная тенденция резко возрастает для дуплекса  $d(pT-A)_3$ : при 5°С нуклеотидные цепи удерживаются главным образом за счет двух центральных А·Т-пар [100]. В некотором противоречии с этими данными находятся результаты исследования дуплексов  $A-G-G-A \cdot U-C-C-U$  и  $U-G-C-A$ , концевые А·U-пары которых плавилась при той же температуре, что и внутренние G·C-пары [59]. При одинаковом нуклеотидном составе и одинаковом числе внутренних G·C-пар в дуплексах  $A-G-C-U$  и  $U-G-C-A$ , в первом — концевые остатки диссоциированы, а во втором — нет [59]. Наконец, диссоциация концевых пар уменьшается при наличии неспаренных (висящих) оснований [59] [см. выше]. Эта информация полезна для понимания природы РНК—РНК взаимодействий в клетке. При исследовании дуплексов, образованных самокомплементарными  $d(G-G-C-C)$  и  $d(C-C-G-G)$ , Патель наблюдал различие между ходом температурных зависимостей  $\delta$  необменивающихся протонов внутренних и внешних G·C-пар [98]. По мнению автора, эти различия обусловлены агрегацией дуплексов «конец в конец» за счет стэкинг-взаимодействий концевых пар, приводящей к большему экранированию протонов этих пар. В результате сигналы от протонов концевых G·C-пар наблюдаются в более сильных полях. При понижении температуры они продолжают смещаться в сильное поле (не выходя на плато), и определенная с их помощью  $T_{пл}$  оказывается меньше, чем  $T_{пл}$  внутренних пар. Следует отметить, что нужно подходить с осторожностью к количественным аспектам анализа температурных зависимостей, так как  $T_{пл}$ , определенные по температурным зависимостям сигналов различных необменивающихся протонов в пределах одного и того же нуклеотидного остатка, иногда заметно отличаются [7]. Ошибка в определении  $T_{пл}$  меньше в случае дуплексов, образованных несамокомплементарными олигонуклеотидами, так как в этом случае можно учитывать температурные зависимости протонов каждой из цепей [27]. При описании «дифференциального» плавления концевых нуклеотидных пар олигомерных дуплексов некоторые авторы неоправданно употребляют термин «обтрепывание» концов [59, 100, 110], которое отражает кинетический эффект (см. выше) и никак не связан с равновесной концентрацией открытых и закрытых форм [27]. Например, в  $d(C-T_3-G) \cdot d(C-A_3-G)$  имеет место «обтрепывание» концов, но дуплекс при этом не разрушен, а содержание частично расплавленных форм очень мало [27].

Хорошей иллюстрацией возможностей метода ЯМР является работа [99], в которой изучался дуплекс  $d(A-T-C-C-T-A-T-T-A-G-G-A-T)$ , содержащий одну некомплементарную пару Т·Т.

Было показано, что тридекануклеотид образует регулярную структуру, подобную ДНК в В-форме, причем неканоническая Т·Т-пара не выходит из спирали. Интересно, однако, что вкрапление Т·Т-пары приводит к значительному понижению общей устойчивости двойной спирали за счет возникновения дополнительного нестабильного участка, с которого, как видно по исчезновению сигналов обменивающихся протонов, одновременно с концевыми участками начинается плавление.

Недавно методом ЯМР-спектроскопии было впервые исследовано релаксационное поведение резонансов обменивающихся протонов оснований олигомерного дуплекса — 12-звенного рестрикционного фрагмента  $d(C-C-G-C-A-C-T-G-A-T-G-G) \cdot d(C-C-A-T-C-A-G-T-G-C-G-G)$  [101]. Анализ скоростей релаксации и их температурных зависимостей позволил рассмотреть совершенно новый аспект поведения дуплексов — конформационные флуктуации спирали. Было обнаружено отсутствие внутренней динамики в 12-звенном фрагменте ДНК, по крайней мере во временной шкале 10—100 нс [101]. Показано, что не происходит переориентации оснований (относительно оси спирали) и этот фрагмент можно представить как жесткую палочку. Кроме того, было сделано любопытное наблюдение, касающееся механизма раскрытия отдельных пар оснований. Оказалось, что происходящий при 30—40°С обмен протонов иминогрупп тиминовых остатков с растворителем не сопровождается раскрытием соседних G·C-пар. Из этого авторы [101] заключили, что скорости случайного раскрытия А·Т-пар в любых ДНК не зависят от нуклеотидной последовательности и длины и, следовательно, одинаковы для всех ДНК. Этот вывод нашел экспериментальное подтверждение при изучении рестрикционных фрагментов ДНК, состоящих из 43 и 69 звеньев [102].

В ряде работ, посвященных исследованию комплексообразования олигомеров с помощью спектроскопии ПМР, подробно изучены кинетические аспекты процесса обмена протонов иминогрупп с водой [24, 25, 97]. Эти данные позволили оценить время жизни пар оснований в спиральном комплексе и независимым образом получить кинетические параметры зарождения и роста олигомерной двойной спирали [25]. Рассчитанные величины энергии активации, константы скорости нуклеации и диссоциации хорошо согласуются с соответствующими данными, полученными для рибоолигонуклеотидов с помощью метода температурного скачка (раздел V). Общее описание процесса обмена, ответственного за уширение резонансных линий, можно выразить следующим образом [24, 114]:



Согласно этой схеме, протон иминогруппы может находиться в одном из трех состояний: внутри двухспиральной структуры —  $NH_h$ , в открытой форме —  $NH_c$  и в составе молекулы  $H_2O$ . Равновесная константа перехода из Н-связанного ( $h$ ) в свободное состояние ( $c$ ),  $K_{равн} = k_{hc}/k_{ch}$ . Характеристики этих обменных процессов сейчас хорошо известны [119]. Были выведены уравнения, описывающие отношения между шириной и положением резонансных линий двухспирального комплекса и скоростями обменных реакций [52, 97, 119]. Более подробно о механизме обмена протонов иминогрупп с водой сообщается в работах [24, 119].

#### 4. Хроматография на колонках

Олигонуклеотиды, иммобилизованные на носителе, способны образовывать комплексы с комплементарными гомогенными [120—122] и гетерогенными [121, 123] олигонуклеотидами (включая образование гибридных рибодезоксирибонуклеотидных комплексов) [120, 121]. В качестве носителей использовали целлюлозу [120, 121, 123], гексаметилендиаминсефарозу [123], к которым ковалентно пришивался олигонуклеотид, и ДЭАЭ-целлюлоза, на которой происходила необратимая сорбция оли-

гонуклеотида, ковалентно связанного с растворимым полимером (поливиниловым спиртом) [122]. В условиях температурного градиента происходит диссоциация комплементарного олигонуклеотида, и по температуре выхода пика можно приблизительно оценить устойчивость комплекса. Показано, что в образовании Н-связей участвуют все основания имобилизованного олигомера [120, 121] и этот процесс высокоспецифичен: достаточно одной некомплементарной пары, чтобы олигонуклеотид не сорбировался [124]. Хроматография на носителях, несущих олигонуклеотиды, обсуждается в литературе в основном как метод для разделения олигонуклеотидных смесей [120—123].

#### Литература

1. *Riesner D., Römer R.* In: *Physico-chemical Properties of Nucleic Acids*. Duchesne J., ed. London—New York: Academic Press, 1973, v. 2, p. 237.
2. *Ts'o P. O. P.* In: *Basic Principles in Nucleic Acid Chemistry*. New York — London: Academic Press, 1974, v. 2, p. 411.
3. *Cantor C. R., Schimmel P. R.* *Biophysical Chemistry*. San Francisco: W. H. Freeman and Company, 1980, v. III, p. 1183.
4. *Seeman N. C.* In: *Nucleic Acid Geometry and Dynamics*. Sarma R. H., ed. New York, Oxford: Pergamon Press, 1980, p. 109.
5. Соколова Н. И., Каграманова В. К., Долинная Н. Г. *Успехи химии*, 1975, т. 44, с. 104.
6. *Kallenbach N. R., Berman H. M. Q. Rev. Biophysics*, 1977, v. 10, p. 138.
7. *Kearns D. R. Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 1977, v. 6, p. 477.
8. *Sarma R. H.* In: *Nucleic Acid Geometry and Dynamics*. Sarma R. H., ed. New York, Oxford: Pergamon Press, 1980, p. 143.
9. *Cantor C. R., Chin W. W. Biopolymers*, 1968, v. 6, p. 1745.
10. *Gennis R. B., Cantor C. R. Biochemistry*, 1970, v. 9, p. 4714.
11. *Pörschke D. Biopolymers*, 1971, v. 10, p. 1989.
12. *Cassani G. R., Bollum F. J. Biochemistry*, 1969, v. 8, p. 3928.
13. *Hogget J. G., Maass G. Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, 1971, v. 75, p. 45.
14. *Naylor R., Gilham P. T. Biochemistry*, 1966, v. 5, p. 2722.
15. *Pohl F. M. J. Biochem.*, 1974, v. 42, p. 495.
16. *Scheffler I. E., Elson E. L., Baldwin R. L. J. Mol. Biol.*, 1970, v. 48, p. 145.
17. *Hayes F. N., Lilly E. H., Ratliff R. L., Smith D. A., Williams D. L. Biopolymers*, 1970, v. 9, p. 1105.
18. Долинная Н. Г., Громова Е. С., Михайлов С. Н., Шабарова З. А. *Биоорган. химия*, 1978, т. 4, с. 535.
19. *Martin F. H., Uhlenbeck O. C., Doty P. J. Mol. Biol.*, 1971, v. 57, p. 201.
20. *Jaskunas S. R., Cantor C. R., Tinoco I., Jr. Biochemistry*, 1968, v. 7, p. 3164.
21. *Podder S. K. Eur. J. Biochem.*, 1971, v. 22, p. 467.
22. *Pörschke D., Uhlenbeck O. C., Martin F. H. Biopolymers*, 1973, v. 12, p. 1313.
23. *Borer P. N., Dengler B., Tinoco I., Jr. J. Mol. Biol.*, 1974, v. 86, p. 843.
24. *Crothers D. M., Hilbers C. W., Shulman R. G. Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1973, v. 70, p. 2899.
25. *Hilbers C. W., Patel D. J. Biochemistry*, 1975, v. 14, p. 2656.
26. *Borer P. N., Kan L. S., Ts'o P. O. P. Ibid.*, 1975, v. 14, p. 4847.
27. *Pardi A., Martin F. H., Tinoco I., Jr. Ibid.*, 1981, v. 20, p. 3986.
28. Добрынин В. Н., Коробко В. Г., Северцова И. В., Быстров Н. С., Болдырева Е. Ф., Чернов Б. К., Колосов М. Н. *Биоорган. химия*, 1978, т. 4, с. 1600.
29. *Shabarova Z. A., Dolinnaya N. G., Turkin S. I., Gromova E. S. Nucleic Acids Res.*, 1980, v. 8, p. 2413.
30. Шабарова З. А., Волков Е. М., Орецкая Т. С., Туркин С. И., Долинная Н. Г., Каграманова В. К., Прокофьев М. А. *Докл. АН СССР*, 1981, т. 258, с. 914.
31. *Shabarova Z. A., Dolinnaya N. G., Drutsa V. L., Melnikova N. P., Purnal A. A. Nucleic Acids Res.*, 1981, v. 9, p. 5747.
32. *Quadrifoglio F., Manzini G., Vasser M., Dinkelspiel K., Crea R. Ibid.*, 1981, v. 9, p. 2195.
33. *Doel M. T., Eaton M., Cook E. A., Lewis H., Patel T., Carey N. H. Ibid.*, 1980, v. 8, p. 4575.
34. Кочетков Н. К., Будовский Э. И., Свердлов Е. Д., Симукова Н. А., Турчинский М. Ф., Шигаев В. Н. В кн.: *Органическая химия нуклеиновых кислот*. М.: Химия, 1970, с. 216.
35. *Zimm B. H. J. Chem. Phys.*, 1960, v. 33, p. 1349.
36. *Poland D., Scheraga H. A. Theory of Helix-Coil Transitions in Biopolymers*. New York—London: Academic Press, 1970.
37. *Appelquist J., Damle V. J. Amer. Chem. Soc.*, 1965, v. 87, p. 1450.
38. *Gralla J., Crothers D. M. J. Mol. Biol.*, 1973, v. 78, p. 301.
39. *De Pirsco Albergo D., Marky L. A., Breslauer K. J., Turner D. H. Biochemistry*, 1981, v. 20, p. 1409.
40. *Breslauer K. J., Sturtevant J. M., Tinoco I. J. Mol. Biol.*, 1975, v. 99, p. 549.
41. *Eigen M., Pörschke D. Ibid.*, 1970, v. 53, p. 123.

42. Applequist J., Damle V. J. Amer. Chem. Soc., 1966, v. 88, p. 3895.
43. Ts'o P. O. P., Kondo N. S., Schweizer M. P., Hollis D. H. Biochemistry, 1969, v. 8, p. 997.
44. Appleby D. W., Kallenbach N. R. Ibid., 1973, v. 12, p. 2093.
45. Adler A., Grossman L., Fasman G. D. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1967, v. 57, p. 423.
46. De Pirsco Albergo D., Turner D. H. Biochemistry, 1981, v. 20, p. 1413.
47. Warshaw M. M., Cantor C. R. Biopolymers, 1970, v. 9, p. 1079.
48. Kotin L. J. Mol. Biol., 1963, v. 7, p. 309.
49. Uhlenbeck O. C., Martin F. N., Doty P. Ibid., 1971, v. 57, p. 217.
50. England T. E., Neilson T. Canad. J. Biochem., 1977, v. 55, p. 365.
51. Patel D. J. Biochemistry, 1975, v. 14, p. 3984.
52. Patel D. J., Canel L. L. Eur. J. Biochem., 1979, v. 96, p. 267.
53. Martin F. H., Tinoco I., Jr. Nucleic Acids Res., 1980, v. 8, p. 2295.
54. Marmur J., Doty P. Nature, 1959, v. 186, p. 1427.
55. Wells R. D., Larson J. E., Grant R. C., Shorile B. E., Cantor C. R. J. Mol. Biol., 1970, v. 54, p. 465.
56. Karstadt M., Krakow J. S. J. Biol. Chem., 1970, v. 245, p. 752.
57. Gralla J., Crothers D. M. J. Mol. Biol., 1973, v. 73, p. 497.
58. Young M. A., Krugh T. R. Biochemistry, 1975, v. 14, p. 4841.
59. Nielson T., Romaniuk P. J., Alkema D., Hughes D. W., Everett J. R., Bell R. A. Nucleic Acids Res., Symposium Series № 7, 1980, p. 293.
60. Gupta N. K., Ohtsuka E., Sgaramella V., Büshi H., Kumar A., Weber H., Khorana H. G. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1968, v. 60, p. 1341.
61. Pörschke D., Eigen M. J. Mol. Biol., 1971, v. 62, p. 361.
62. Craig M. E., Crothers D. M., Doty P. Ibid., 1971, v. 62, p. 383.
63. Krugh T. R., Laing J. W., Young M. A. Biochemistry, 1976, v. 15, p. 1224.
64. Krugh T. R., Young M. A. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1975, v. 62, p. 1025.
65. Rubin J., Brennan T., Sundaralingam M. Biochemistry, 1972, v. 11, p. 3112.
66. Sussman J. L., Seeman N. C., Kim S.-H., Berman H. M. J. Mol. Biol., 1972, v. 66, p. 403.
67. Seeman N. C., Rosenberg J. M., Suddath F. L., Kim J. J. P., Rich A. Ibid., 1976, v. 104, p. 109.
68. Hingerty B., Subramanian E., Stellam N. S. D., Broyde S. B., Sato T., Langridge R. Biopolymers, 1975, v. 14, p. 227.
69. Rosenberg J. M., Seeman N. C., Day R. O., Rich A. J. Mol. Biol., 1976, v. 104, p. 145.
70. Viswamitra M. A., Kennard O., Jones P. G., Sheldrick G. M., Salisbury S., Falvello L. Nature, 1978, v. 273, p. 687.
71. Wang A. H. J., Quigley G. J., Kolpak F. J., Crawford J. L., van Boom J. H. van der Marel G., Rich A. Ibid., 1979, v. 282, p. 680.
72. Drew H., Takano T., Tanaka S., Itakura K., Dickerson R. E. Ibid., 1980, v. 286, p. 567.
73. Drew H. R., Dickerson R. E. J. Mol. Biol., 1981, v. 152, p. 723.
74. Wing R., Drew H., Takano T., Broka C., Tanaka S., Itakura K., Dickerson R. E. Nature, 1980, v. 287, p. 755.
75. Dickerson R. E., Drew H. R. J. Mol. Biol., 1981, v. 149, p. 761.
76. Shakked Z., Rabinovich D., Kruse W. B. T., Egert E., Kennard O., Sala G., Salisbury S. A., Viswamitra M. A. Proc. Roy. Soc. B, 1981, 213, p. 479.
77. Wilson H. R., Al-Mukhtar J. Nature, 1976, v. 263, p. 171.
78. Klug A., Viswamitra M. A., Kennard O., Shakked Z., Steitz T. A. J. Mol. Biol., 1979, v. 131, p. 669.
79. Arnott S., Chandrasekaran R., Birdsall D. L., Leslie A. G. W., Ratliff R. L. Nature, 1980, v. 283, p. 743.
80. Goupta G., Bansal M., Sasisekharan V. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1980, v. 95, p. 728.
81. Lomonosoff G. P., Butler P. J. G., Klug A. J. Mol. Biol., 1981, v. 149, p. 745.
82. Drew H. R., Dickerson R. E. Ibid., 1981, v. 151, p. 535.
83. Lavery R., Pullman B. Nucleic Acids Res., 1981, v. 9, p. 3765.
84. Weiss R., Birch-Hirschfeld E., Zimmer C., Luck G. Ibid., 1979, v. 6, p. 757.
85. Pohl F. M. FEBS Letters, 1974, v. 38, p. 202.
86. Borer P. N., Uhlenbeck O. C., Dengler B., Tinoco I., Jr. J. Mol. Biol., 1973, v. 80, p. 759.
87. Miller P. S., Cheng D. M., Dreon N., Jayaraman K., Kan L. S., Leutzing E. E., Pulford S. M., Ts'o P. O. P. Biochemistry, 1980, v. 19, p. 4688.
88. Pohl F. M., Govin T. M. J. Mol. Biol., 1972, v. 67, p. 375.
89. Долинная Н. Г., Громова Е. С., Ильина Е. В., Сергеева Н. Ф., Шабарова Э. А., Прокофьев М. А. Биоорг. химия, 1975, т. 1, с. 1296.
90. Pohl F. M., Jovin T. M. J. Mol. Biol., 1972, v. 67, p. 375.
91. Johnson B. B., Dahl K. S., Tinoco I., Jr., Ivanov V. I., Zhurkin V. B. Biochemistry, 1981, v. 20, p. 73.
92. Gray D. M., Tinoco I., Jr. Biopolymers, 1970, v. 9, p. 223.
93. Hillen W., Goodman T., Wells R. D. Nucleic Acids Res., 1981, v. 9, p. 3029.
94. Patel D. J., Hilbers C. W. Biochemistry, 1975, v. 14, p. 2651.
95. Arter D. B., Walker G. C., Uhlenbeck O. C., Schmidt P. G. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1974, v. 61, p. 1089.
96. Patel D. J., Tonelli A. E. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, v. 71, p. 1945.
97. Kan L. S., Borer P. N., Ts'o P. O. P. Biochemistry, 1975, v. 14, p. 4864.
98. Patel D. J. Biopolymers, 1977, v. 16, p. 1635.

99. *Cornelis A. G., Haasnoot J. H. J., Hartog J. F., Rooij M., van Boom J. H., Cornelis A.* Nature, 1979, v. 281, p. 235.
100. *Phillips D. R., Roberts G. C. K.* Biochemistry, 1980, v. 19, p. 4795.
101. *Early T. A., Kearns D. R., Hillen W., Wells R. D.* Ibid., 1981, v. 20, p. 3756.
102. *Early T. A., Kearns D. R., Hillen W., Wells R. D.* Ibid, 1981, v. 20, p. 3764.
103. *Cohen J. S.* Trends in Biochem. Sci., 1980, v. 5, p. 58.
104. *Geerdes H. A., Hilbers C. W.* Nucleic Acids Res., 1977, v. 4, p. 207.
105. *Bubienko E., Uniack M. A., Borer P. N.* Biochemistry, 1981, v. 20, p. 6987.
106. *Lancelot G., Roger M., Thuong N. T., Chassignot M., Hélène C.* Biochimie, 1981, v. 63, p. 785.
107. *Heller M. J., Tu A. T., Maciel G. E.* Biochemistry, 1974, v. 13, p. 1623.
108. *Early T. A., Kearns D. R., Burd J. F., Lascqn G. E., Wells R. D.* Ibid, 1977, v. 16, p. 541.
109. *Selsing E., Wells R. D., Early T. A., Kearns D. R.* Nature, 1978, v. 275, p. 249.
110. *Hughes D. W., Bell R. A., England T. E., Neilson T.* Canad. J. Chem., 1978, v. 56, p. 2243.
111. *Romaniuk P. J., Neilson T., Hughes D. W., Bell R. A.* Ibid., 1978, v. 56, p. 2249.
112. *Patel D. J., Tonelli A. E.* Biopolymers, 1974, v. 13, p. 1943.
113. *Patel D. J., Tonelli A. E.* Ibid., 1975, v. 14, p. 3990.
114. *Kallenbach N. R., Daniel W. E., Kaminker M. A.* Ibid., 1976, v. 15, p. 1218.
115. *Geissner-Prettre C., Pullman B. J.* Theor. Biol, 1970, v. 27, p. 87.
116. *Sobell H. M., Jain S. C. J.* Mol. Biol., 1972, v. 68, p. 21.
117. *Patel D. J.* Biochemistry, 1974, v. 13, p. 2396.
118. *Cross A. D., Crothers D. M.* Ibid., 1971, v. 10, p. 4015.
119. *Crothers D. M., Cole P. E., Hilbers C. W., Shulman R. G. J.* Mol. Biol., 1974, v. 87, p. 63.
120. *Astell C. R., Smith M.* Biochemistry, 1972, v. 11, p. 4114.
121. *Astell C. R., Doel M. T., Jahne P. A., Smith M.* Ibid., 1973, v. 12, p. 5068.
122. *Schott H., Eckstein H., Bayer E. J.* Chromat., 1974, v. 99, p. 31.
123. *Ильина Е. В., Смирнов В. Д., Шабарова Э. А., Прокофьев М. А.* Биоорган. химия, 1976, т. 2, с. 376.
124. *Schott H.* FEBS Letters, 1974, v. 41, p. 203.

Московский государственный университет  
им. М. В. Ломоносова,  
Химический факультет