

Стабілізація дуплексних та триплексних комплексів оліготимідилату ковалентно приєднаним глікозидом імідазофеназину

В. М. Зозуля, Ю. П. Благой, І. Я. Дубей¹, О. Д. Федоряк¹,
А. С. Щербакова, Д. М. Федоряк¹

Фізико-технічний інститут низьких температур ім. Б. І. Веркіна НАН України
310164, Харків, пр. Леніна, 47

¹ Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України
253660, Київ, вул. Мурманська, 1

Синтезовано декатимідилат, який містить на 3'-кінці нуклеозидне похідне імідазофеназину (Pzn). Вивчено вплив ковалентного приєднання барвника на формування комплементарних комплексів (dT)₁₀ – дуплексу з (dA)₁₅ та триплексів з (dA)₁₅ і poly(dA)·poly(dT) – в буферних розчинах з нейтральним рН при двох значеннях іонної сили: $\mu=0,1$ та 1 М. Дослідження здійснювали методом термічної денатурації з використанням абсорбційної та флуоресцентної спектроскопії. Показано, що залишок Pzn значно стабілізує утворені дуплексні та триплексні комплекси за рахунок інтеркаляції хромофору барвника в послідовності dA та dA·dT. Температура плавлення комплексів зростала на 10–12 °С для дуплексних і на 15–20 °С для триплексних структур. Стабілізуюча дія нейтрального імідазофеназину виявилася порівнянною за величиною з тією, яку спричиняють катіонні інтеркалюючі барвники, котрі приєднані до олігонуклеотидів через поліметиленовий лінкер.

Вступ. За останні роки молекули багатьох сполук, таких як інтеркалятори, флюорофори, нуклеолітичні агенти, сполуки з фотореактивними групами та ін., були ковалентно приєднані до олігонуклеотидів [1–3]. Показано, що приєднані молекули інтеркалюючих барвників стабілізують дво- та триспіральні комплекси олігонуклеотидів [4–13]. Так, катіонні похідні феназину (четвертинні солі), ковалентно приєднані до термінальної фосфатної групи антисенсових олігонуклеотидів, виявляють сильний стабілізуючий вплив на дуплекси [7, 8]. Звичайно модифікація здійснюється через поліметиленовий лінкер постсинтетично. У нашій роботі досліджено модифікацію олігонуклеотидів у процесі твердофазного синтезу запропонованим раніше [14] нуклеозидним похідним імідазофеназину (далі — феназин, Pzn), приєднаним до 3'-кінця олігонуклеотидного ланцюга через залишок рибози

(рис. 1). Ця нейтральна ліпофільна молекула повинна полегшувати проникнення олігонуклеотидних кон'югатів через клітинні мембрани. Крім того, відомо, що 3'-модифікація посилює нуклеазну стійкість олігонуклеотидів [1, 15], що також важливо для антисенсової та антигенної технологій. Нарешті, флуоресцентні властивості Pzn дозволяють використовувати його як репортерну групу для мічення олігонуклеотидів.

Нами вивчено вплив такої модифікації олігонуклеотидів на ефективність гібридації у модельних системах. Методом термічної денатурації з використанням абсорбційної та флуоресцентної спектроскопії досліджено формування 3'-модифікованим декатимідилатом ((dT)₁₀Pzn дуплексу та триплексу з (dA)₁₅, а також триплексу з poly(dA)·poly(dT). Для встановлення стабілізуючої дії Pzn отримані результати порівнювали з даними для систем з немодифікованим (dT)₁₀.

Матеріали і методи. Всі немодифіковані та модифіковані олігонуклеотиди були синтезовані на

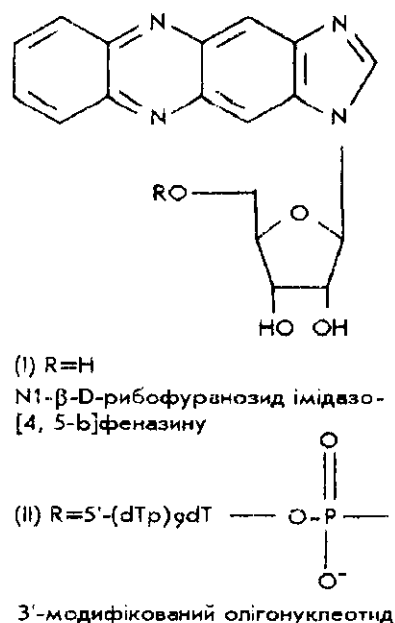


Рис. 1. Структура похідного феназину (I) та модифікованого декатимідилату (II)

синтезаторі Вікторія 6М (Новосибірськ, Росія) стандартним Н-фосфонатним твердофазним методом [16]. Носій для синтезу олігонуклеотидів, модифікованих глікозидом імідазофеназину (I, див. рис. 1) на 3'-кінці, отримали шляхом приєднання 5'-О-монометокситритильного похідного N1-β-D-рибофуранозиду імідазо[4,5-b]феназину [14] до амінопропілльованого силікагелю Silochrom S-80 через сукцинатну лінкерну групу у відповідності з [17]. Після завершення синтезу олігонуклеотиди відділяли від полімерного носія і деблокували, обробляючи концентрованим NH₃ протягом ночі (при кімнатній температурі для оліготимідилату та при 50 °С для (dA)₁₅). Олігомери виділяли електрофорезом у 20 %-му денатуруючому поліакриламідному гелі. Після елюції з гелю олігонуклеотиди знесолювали за допомогою гель-фільтрації на колонці PD-10 («Pharmacia», Швеція). Використовували poly(dA)·poly(dT) фірми «Sigma» (США).

Всі спектральні експерименти проводили в Накаодилатному буфері на деіонізованій дистильованій воді (10 мМ, 0,5 мМ EDTA, рН 7). Дослідження здійснювали при іонній силі розчину μ = 0,1 і/або μ = 1 М (для створення іонної сили додавали NaCl). Концентрації оліго- та полінуклеотидів визначали спектрофотометрично, викори-

стовуючи наступні молярні коефіцієнти екстинкції (M⁻¹см⁻¹): 9800 при 257 нм для (dA)₁₅, 8600 при 266 нм для (dT)₁₀ (при 21—23 °С) [18] та 6500 при 260 нм для poly(dA)·poly(dT). Концентрацію (dT)₁₀Pzn розраховували по поглинанню феназинового залишку у видимій області спектра (див. «Результати і обговорення»).

Профілі термічної денатурації отримували шляхом реєстрації температурних залежностей УФ поглинання нуклеотидів та інтенсивності флюоресценції приєднаного барвника. Флюоресценцію збуджували при довжині хвилі 450 нм і реєстрували сигнал у максимумі спектра випромінювання (dT)₁₀Pzn (537 нм). Абсорбційні криві плавлення визначали на спектрофотометрі SPECORD UV-VIS («Karl Zeiss Jena», ФРН), а флюоресцентні — на лабораторному спектрофлюориметрі з електронною системою рахування фотонів [19]. Ці прилади були приєднані до персонального комп'ютера для накопичення і обробки даних. Поглинання і флюоресценцію вимірювали в спеціальній кварцевій кюветі (об'єм 60 мкл, довжина оптичного шляху 0,2 см). Кювету поміщали в мідний утримувач, температуру якого змінювали за допомогою елемента Пелтьє, керованого комп'ютером. Виміри здійснювали при швидкості нагрівання 0,5 °С/хв.

Результати і обговорення. Похідні феназину відомі як ефективні стабілізатори комплементарних комплексів нуклеїнових кислот. Стратегія ковалентної модифікації олігонуклеотидів феназином звичайно базується на введенні аміноалкільної групи у відповідне положення синтетичного олігонуклеотиду з наступною реакцією попередньо деблокованого і очищеного функціоналізованого олігомеру з четвертинною сіллю феназину [7, 8]. Реакція окислювального амінування проходить селективно по положенню 2 інтеркалятора. Проте одержання олігонуклеотидних кон'югатів безпосередньо в процесі твердофазного синтезу часто виглядає вигіднішим, оскільки при цьому уникають трудомісткого постсинтетичного мічення і додаткової стадії очистки кінцевого продукту. Раніше були запропоновані носії, модифіковані акридином, флюоресцеїном, холестериним, біотином та іншими молекулами для синтезу олігонуклеотидів, що містять ці ліганди на 3'-кінці олігомеру [1, 2]. В нашій роботі для 3'-модифікації олігонуклеотидів у відповідності з такою стратегією був використаний носій на основі силікагелю, модифікований нейтральним нуклеозидним похідним феназину (I) з використанням методів, звичайних для отримання нуклеозидвмісних полімерів [17]. На цьому носіїв здійснено синтез (dT)₁₀ стандартним Н-фосфонат-

ним методом. В отриманому таким чином кон'югаті $(dT)_{10}Pzп$ рибонуклеозид імідазофеназину приєднаний до 3'-кінця олігонуклеотидного ланцюга через фосфодісфірний зв'язок, як звичайний нуклеозид.

Слід зазначити, що залишок Pzп у вигляді Н-фосфонату чи амідфосфіту нуклеозиду (1) може бути також введений у 5'-кінцеве чи будь-яке внутрішнє положення олігонуклеотидної послідовності в процесі її твердофазного синтезу.

Абсорбційні і флуоресцентні властивості вільного Pzп опубліковані раніше [19, 20]. Спектр поглинання $(dT)_{10}Pzп$ є суперпозицією спектрів поглинання оліготимідилату і феназину (рис. 2). Максимум його УФ смуги поглинання займає середнє положення між максимумами поглинання вільного феназину (262 нм) і декатимідилату (266 нм). Спектр поглинання феназину у видимій області має одну смугу з максимумом при 384 нм (коефіцієнт екстинкції $22400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). При ковалентному приєднанні феназину до 3'-кінця $(dT)_{10}$ він дещо змінюється (червоний зсув на 0,6 нм, гіпохромізм близько 5 %). Неструктурований спектр випромінювання вільного феназину має максимум при 543 нм. При приєднанні барвника до олігонуклеотиду він зсувається до 537 нм, а інтен-

сивність флуоресценції падає (приблизно на 30 % при 20 °С) (див. рис. 2).

Комплексоутворення $(dA)_{15}$ з $(dT)_{10}$ і $(dT)_{10}Pzп$ досліджували в розчинах з молярним співвідношенням ниток 1:1 і 1:2 при двох значеннях $\mu = 0,1$ та 1. Концентрація $(dA)_{15}$ в усіх випадках складала 7 мкМ. Зміни поглинання при 260 нм (A_{260}) з підвищенням температури подані на рис. 3 у відносних одиницях, що визначаються як $(A_t - A_0)/(A_{70} - A_0)$, де A_t , A_0 і A_{70} — значення поглинання при деякій температурі t , при 0 і 70 °С відповідно. Як видно з цього рисунку, приєднаний Pzп підвищує температуру плавлення утворених комплексів при обох іонних силах розчину. Більшість отриманих кривих плавлення відхиляється від звичайного S-подібного вигляду, передбачуваного моделлю двох станів. У нижній частині криві переходу сильно розтягнуті, і асоціація олігонуклеотидів у сумішах 1:1 при $\mu = 0,1$ і в сумішах 1:2 при обох значеннях іонної сили не завершується при охолодженні до 0 °С. В останньому випадку також проявляється двофазність кривих переходів і їхній зсув у бік низьких температур відносно переходів в еквімолярних сумішах.

Вияток складає крива плавлення для системи $(dA)_{15} \cdot 2(dT)_{10}$ при $\mu = 0,1$, яка майже збігається з кривою переходу для еквімолярної суміші $(dA)_{15} \cdot (dT)_{10}$. Можна припустити, що спостережені ефекти обумовлені утворенням поряд з дуплексними також і триплексними структурами.

З метою виділення ефектів триплексних формувань були проведені виміри поглинання при 284 нм (A_{284}), результати яких наведено на рис. 4. Як відомо [21], ця довжина хвилі відповідає ізобестичній точці УФ поглинання для переходу уотсон-кріківських пар у неупорядкований стан, і відповідно усі зміни поглинання визначаються розривом хугстинівських зв'язків у триплексах.

Було встановлено, що зміна A_{284} для вільних $(dT)_{10}$, $(dA)_{15}$ і $(dT)_{10}Pzп$ у діапазоні температур 0—70 °С не перевищує 1 %, що знаходиться у межах похибки вимірів (даних не наведено). Як видно з рис. 4, при $\mu = 1$ для еквімолярних систем $(dA)_{15} \cdot (dT)_{10}$ і $(dA)_{15} \cdot (dT)_{10}Pzп$ спостерігається ріст A_{284} приблизно на 3 %. Цей ефект може бути викликаний дисоціацією деякої кількості сформованих триплексних комплексів. Утворення триплексів добре проявляється у сумішах з молярним співвідношенням ниток 1:2. Навіть при 0,1 М Na^+ для системи $(dA)_{15} \cdot 2(dT)_{10}$ спостерігається гіперхромізм у 2,5 % при підвищенні температури від 0 до 50 °С (див. рис. 4). Приєднання Pzп збільшує його до 5 %. З підвищенням концентрації Na^+ до 1 М ефективність формування триплексів зростає, про

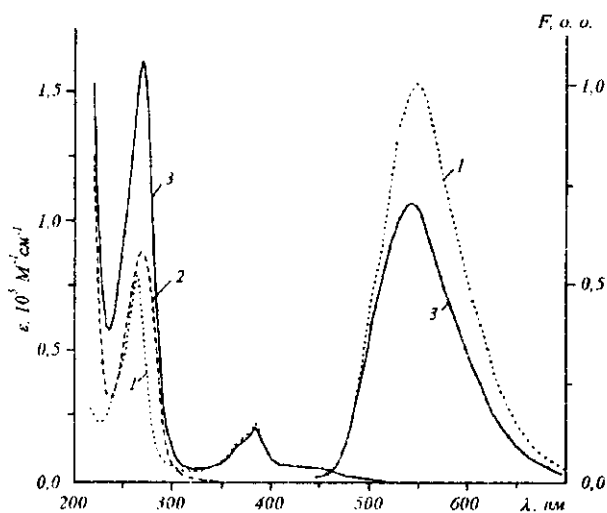


Рис. 2. Спектри поглинання і флуоресценції вільного феназину (Pzп, 1), декатимідилату ((dT)₁₀, 2) та модифікованого декатимідилату ((dT)₁₀Pzп, 3). Флуоресценцію збуджували при довжині хвилі 450 нм

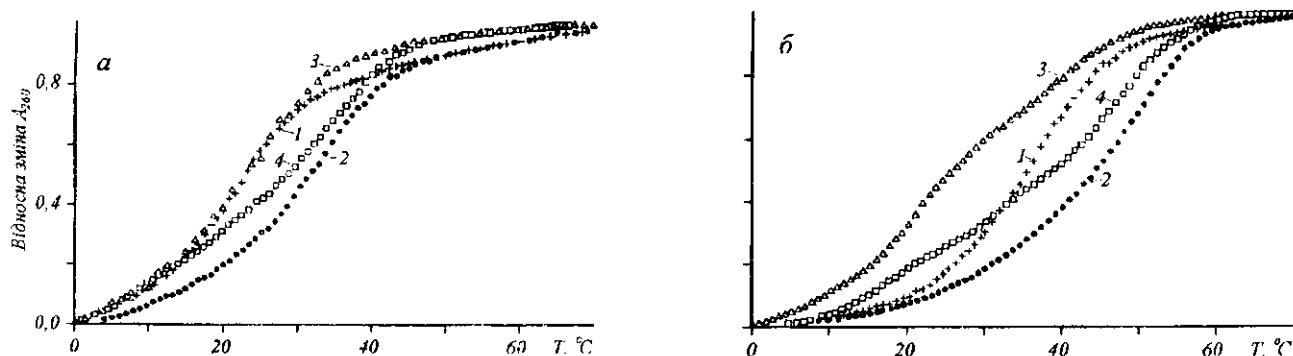


Рис. 3. Криві плавлення, отримані по поглинанню при 260 нм для систем: 1 — $(dA)_{15} \cdot (dT)_{10}$; 2 — $(dA)_{15} \cdot (dT)_{10}Pzn$; 3 — $(dA)_{15} \cdot 2(dT)_{10}$; 4 — $(dA)_{15} \cdot 2(dT)_{10}Pzn$; а — $\mu = 0,1$ М; б — $\mu = 1$ М

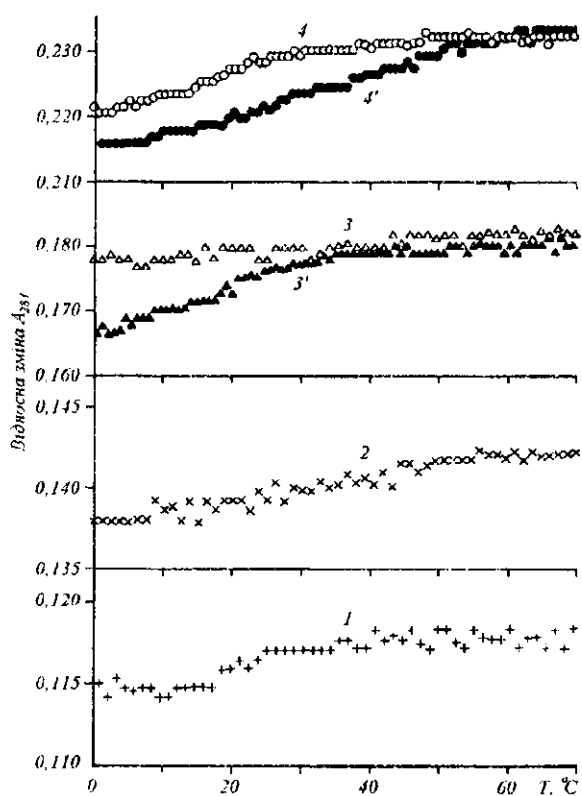


Рис. 4. Криві плавлення, отримані по поглинанню при 284 нм для систем: 1 — $(dA)_{15} \cdot (dT)_{10}$; 2 — $(dA)_{15} \cdot (dT)_{10}Pzn$ при $\mu = 1$ М; 3 і 3' — $(dA)_{15} \cdot (dT)_{10}$; 4 і 4' — $(dA)_{15} \cdot 2(dT)_{10}Pzn$ при $\mu = 0,1$ і 1 М відповідно

що свідчить 8 %-й ріст A_{284} для сумішей з модифікованим і немодифікованим $(dT)_{10}$. Температурні інтервали змін A_{284} узгоджуються з положенням низькотемпературних фаз переходів для цих систем, які виявляються на кривих плавлення, отриманих при 260 нм (див. рис. 3). З цього рисунку видно, що приєднання Pzn зсуває перехід триплекс — дуплекс у бік вищих температур приблизно на 20 °С. Майже такий зсув помічено при підвищенні концентрації іонів Na від 0,1 до 1 М.

Утворення дуплексів і триплексів у сумішах $(dA)_{15}$ з $(dT)_{10}Pzn$ підтверджується також даними флюоресцентних вимірів. На рис. 5 показано температурну залежність нормалізованої інтенсивності флюоресценції (F) $(dT)_{10}Pzn$ в 1:1 і 2:1 сумішах з $(dA)_{15}$. Виміри здійснювали при тих же концентраціях олігонуклеотидів та іонних силах розчинів, що і при абсорбційних вимірах кривих плавлення.

Формування дуплексів і триплексів проявляється в гасінні флюоресценції. При цьому максимум спектра емісії зсувається в синю область спектра на 2 нм. Ці спектральні зміни свідчать про інтеркаляцію хромофору барвника в поліаденіловий ланцюг, що спостерігалось нами при взаємодії вільного Pzn з $poly(rA)$ [19]. Однак ефекти гасіння суттєво менші, ніж для вільного Pzn, для якого здійснюється більш ніж 10-кратне зниження флюоресценції. Як видно з рис. 5, при 0 °С флюоресценція приєданого Pzn гаситься в дуплексних комплексах приблизно в 4, а в триплексних — у 2 рази. При розведенні ланцюгів з підвищенням температури інтенсивність флюоресценції збільшується і після повної дисоціації комплексів збігається з

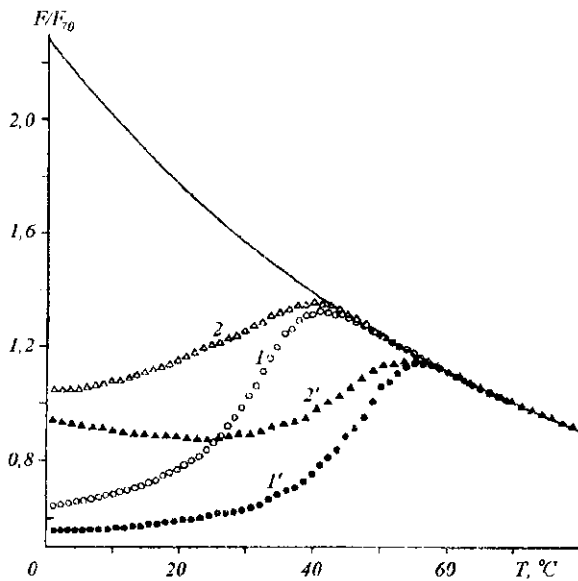


Рис. 5. Залежність нормалізованої інтенсивності флюоресценції від температури для систем: $(dA)_{15} \cdot (dT)_{10}Pzn$ (1, 1') та $(dA)_{15} \cdot 2(dT)_{10}Pzn$ (2, 2'); 1 і 2 — $\mu = 0,1$ М; 1' і 2' — $\mu = 1$ М. Суцільна лінія — зміна інтенсивності вільного $(dT)_{10}Pzn$ від температури

інтенсивністю вільного $(dT)_{10}Pzn$. Остаточна дисоціація спостерігається при таких же температурах, які визначені з абсорбційних кривих плавлення (див. рис. 3).

З використанням останніх, отриманих при 260 нм, побудовано криві переходів у неупорядкований стан дуплексних комплексів $(dA)_{15} \cdot (dT)_{10}$ і

$(dA)_{15} \cdot (dT)_{10}Pzn$ (рис. 6). Долю АТ-пар (Θ) розраховували за стандартною методикою, використовуючи лінійні базові лінії [22]. Для комплексу $(dA)_{15} \cdot (dT)_{10}Pzn$ переходи розраховували також за допомогою флюоресцентних кривих плавлення. У цьому випадку Θ виражає долю зв'язаних олігомерів $(dT)_{10}Pzn$ (а не долю АТ-пар, як у попередньому випадку), що розраховувалася з рівняння

$$\Phi = \Phi_f(1 - \Theta) + \Phi_b\Theta,$$

де $\Phi = F/F_{70}$ — нормовані на значення інтенсивності флюоресценції при 70 °С експериментальні значення; Φ_f і Φ_b — аналогічним чином нормовані інтенсивності флюоресценції вільного і зв'язаного $(dT)_{10}Pzn$ відповідно. Для Φ_b приймали значення F/F_{70} при 0 °С.

Ковалентно приєднаний Pzn суттєво підвищує термостабільність дуплексу $(dA)_{15} \cdot (dT)_{10}$ як при низькій, так і високій іонній силі розчину (див. рис. 6), що виявляється в підвищенні температури плавлення (T_m) на 10—12 °С (таблиця). Проте абсорбційні криві плавлення стають більш пологими. Флюоресцентні ж виміри дали крутіші переходи, які збігаються з абсорбційними лише в кінці дисоціації комплексу. Ефекти однакові при обох іонних силах.

Різниця абсорбційних і флюоресцентних кривих плавлення може бути пояснена двома причинами. По-перше, цей ефект може обумовлюватися присутністю триплексних комплексів, плавлення яких робить більший відносний внесок у зміну поглинання, ніж у зміну флюоресценції. По-друге, зміцнення феназином дуплексу лише з одного його кінця може викликати збільшення населеності проміжних станів з частковим розривом водневих

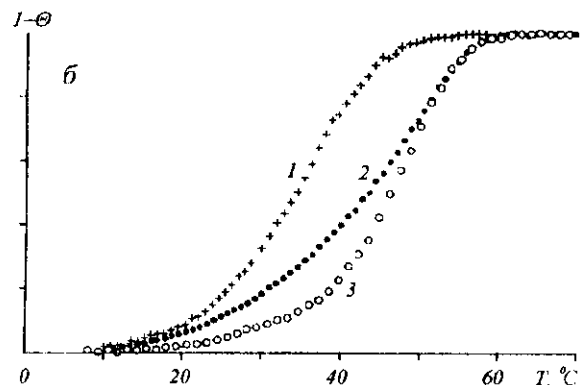
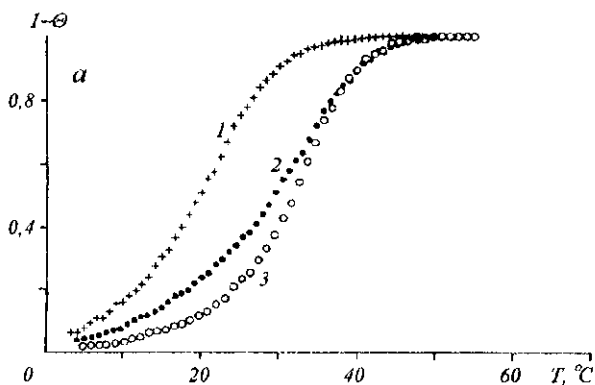


Рис. 6. Профілі термічної денатурації дуплексів: 1 — $(dA)_{15} \cdot (dT)_{10}$ та 2 — $(dA)_{15} \cdot (dT)_{10}Pzn$, отримані з абсорбційних вимірів; 3 — $(dA)_{15} \cdot (dT)_{10}Pzn$ — з флюоресцентних даних; а — $\mu = 0,1$ М; б — $\mu = 1$ М

Температура плавлення (T_m) дуплексів, утворених $(dT)_{10}$ і $(dT)_{10}Pzn$ з $(dA)_{15}$

| Дуплекс | μ | T_m^* |
|--------------------------------|-------|-----------------------------------|
| $(dA)_{15} \cdot (dT)_{10}$ | 0,1 | $19,7 \pm 0,2$ |
| $(dA)_{15} \cdot (dT)_{10}Phz$ | 0,1 | $29,2 \pm 0,2$ ($31,4 \pm 0,2$) |
| $(dA)_{15} \cdot (dT)_{10}$ | 1,0 | $34,2 \pm 0,2$ |
| $(dA)_{15} \cdot (dT)_{10}Phz$ | 1,0 | $43,6 \pm 0,2$ ($46,2 \pm 0,2$) |

*У дужках наведені значення, отримані з флуоресцентних кривих плавлення, решта — з абсорбційних.

зв'язків в АТ-парах з другого кінця дуплексу. Ця часткова дисоціація проявляється в зміні поглинання при 260 нм, а флуоресценція її «не відчуває», реєструючи процес повного розведення ланцюгів після відділення хромофору барвника.

Стабілізуюча дія Pzn на дуплекс виявилася порівнянною з аналогічними ефектами, встановленими для інших інтеркалюючих барвників, приєднаних до олігонуклеотиду через лінкер. Так, приєднання акридинового похідного до одновиткового декамеру А·Т збільшувало значення T_m його комплексу з комплементарною послідовністю в гені 32 мРНК на $11,5^\circ\text{C}$ [5]. Бромистий етидій, приєднаний до 3'-кінця $(dT)_{11}$, підвищував T_m дуплексу $(dA)_{14} \cdot (dT)_{11}$ на 10°C [10]. Досліджений варіант модифікації олігонуклеотиду нейтральним феназиновим барвником дає стабілізуючий ефект такий же, який встановлений для катіонного похідного феназину, приєданого через поліметиленовий ланцюжок до 3'-кінця гептамеру [7] (підвищення T_m на $10\text{--}12^\circ\text{C}$).

Для утворення триплексних комплексів $(dA)_{15} \cdot 2(dT)_{10}$ необхідна висока іонна сила розчину. При $\mu = 1$ точка напівпереходу для нього знаходиться в інтервалі $10\text{--}15^\circ\text{C}$ (див. рис. 4). Дещо більше значення T_m ($17,7^\circ\text{C}$) було отримане Пільчем та ін. [23] для близького до нашої системи $(dA)_{10} \cdot 2(dT)_{10}$, напевно, через різницю іонних умов (використовувалися розчини з 50 мМ MgCl_2). Приєднаний Pzn збільшує значення T_m переходу триплекс — дуплекс приблизно на 20°C (див. рис. 4). Для порівняння: автори роботи [6] спостерігали збільшення значення T_m на 13°C для триплексу, утвореного 11-мерною ТС-послідовністю при її 5'-модифікації акридиновим похідним. $(dT)_{10}$, модифікований феназином, здатний ефективно формувати триплексну структуру також і при

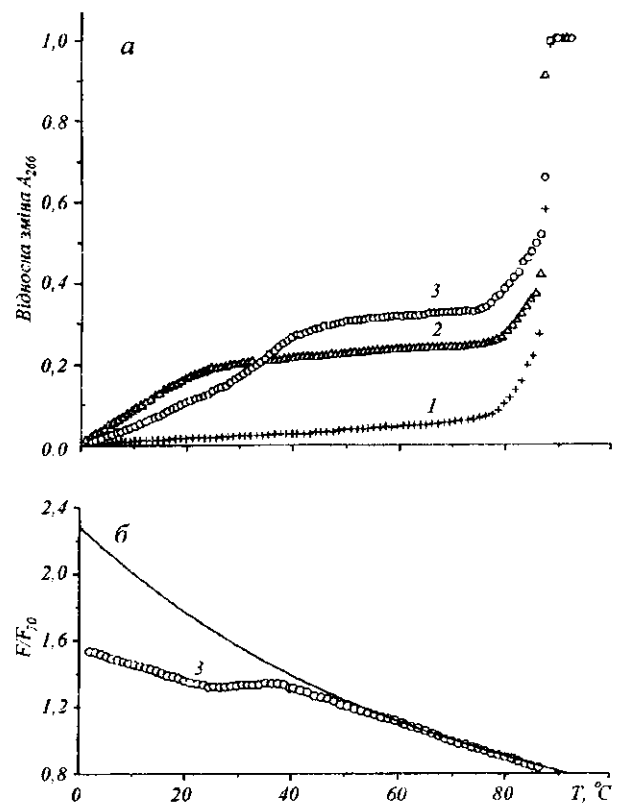


Рис. 7. Абсорбційні криві плавлення для зразків (а) та залежність нормалізованої інтенсивності флуоресценції від температури для системи $(dT)_{10}Pzn^*poly(dA) \cdot poly(dT)$ (б): 1 — $poly(dA) \cdot poly(dT)$; 2 — $(dT)_{10}^*poly(dA) \cdot poly(dT)$ та 3 — $(dT)_{10}Pzn^*poly(dA) \cdot poly(dT)$ при $\mu = 1\text{ М}$; концентрації полімеру (в парах основ) та олігомерів (в залишках тиміну) однакові (200 мкМ)

фізіологічних іонних умовах. При $\mu = 0,1$ значення T_m для триплексу складає приблизно 13°C (див. рис. 4).

Для того щоб прояснити особливості утворення триплексів між $(dT)_{10}Pzn$ і довгою двоспіральною АТ-послідовністю, було використано $poly(dA) \cdot poly(dT)$. Еквімолярні суміші (200 мкМ АТ-пар полімеру і 200 мкМ тимінових основ олігомерів) були досліджені в буферних розчинах при $\mu = 1$. Абсорбційні криві плавлення записувалися в максимумі смуги поглинання тиміну (266 нм, рис. 7). Перед нагріванням зразки витримували при початковій температурі (близько 0°C) до 10 год. Отримані абсорбційні криві плавлення для обох досліджених систем демонструють два переходи, на відміну від монофазного переходу для $poly(dA) \cdot poly(dT)$ (рис. 7, а). Низькотемпературні переходи демонструють відокремлення $(dT)_{10}Pzn$ або $(dT)_{10}$ від дволанцюгового полінуклеотиду. При температурі 0°C формування триплексу $(dT)_{10} \cdot poly(dA) \cdot poly(dT)$ є неповним. Точка середини переходу знаходиться приблизно при 5°C . Приєднання Pzn підвищував T_m триплексу приблизно на 15°C .

Флюоресцентні виміри підтвердили факт утворення триплексних комплексів $(dT)_{10}Pzn$ з $poly(dA) \cdot poly(dT)$. Це проявлялося в гасінні флюоресценції $(dT)_{10}Pzn$ (рис. 7, б) і короткохвильовому зсуві максимуму спектра емісії на 2 нм. Температурний інтервал, у якому відбувається зміна інтенсивності флюоресценції $(dT)_{10}Pzn$, викликана взаємодією з полінуклеотидом, збігається з інтервалом переходу, отриманим абсорбційними вимірами. Формування декатимідилатом триплексної структури з довгим полімером $poly(dA) \cdot poly(dT)$ відбувається менш ефективно, ніж з $(dA)_{15}$. При концентрації компонентів суміші, в 3 рази більшій, ніж для системи $(dA)_{15} \cdot 2(dT)_{10}$, точка напівпереходу знаходиться при нижчій температурі ($T_m \approx 5^\circ\text{C}$).

Приєднання Pzn також дає менший ріст T_m (приблизно на 15°C) (див. рис. 7), ніж для триплексу з $(dA)_{15}$. Напевне, ця різниця обумовлена більшою жорсткістю двоспіральної структури $poly(dA) \cdot poly(dT)$ порівняно з короткими послідовностями $(dA) \cdot (dT)$ [24].

Цікаво, що нахил абсорбційних кривих плавлення в середній точці для дуплексних і триплексних комплексів, утворених $(dT)_{10}Pzn$, виявився меншим, ніж для комплексів, утворених немодифікованим $(dT)_{10}$ (див. рис. 6 і 7). Аналогічний ефект (зменшення величини максимуму похідної кривої оптичного переходу) спостерігався також у випадку приєднання залишку дауноміцину для ду-

плексів [25] і акридинового похідного для триплексів [6]. Можливо, така зміна абсорбційних кривих плавлення викликана частковим розплетенням уотсон-криківських або хугстиновських пар з боку вільного від барвника кінця олігонуклеотиду за рахунок утворення напіввідкритих станів [26].

Таким чином, приєднання нуклеозидного похідного імідазофеназину до 3'-фосфатної групи олігонуклеотиду суттєво підвищує стабільність дуплексів і триплексів. Стабілізуючий ефект приєданого таким способом нейтрального феназину не менший, ніж вплив катіонних інтеркалюючих барвників, приєднаних через алкільний лінкер.

Автори вдячні п. А. С. Шаламаю за люб'язно наданий зразок модифікованого полімеру.

В. Н. Зозуля, Ю. П. Благой, І. Я. Дубей, О. Д. Федоряк, А. С. Щербаківа, Д. М. Федоряк

Стабилизация дуплексных и триплексных комплексов олиготимидилата ковалентно присоединенным гликозидом имидазофеназина

Резюме

Синтезирован декатимидилат, содержащий на 3'-конце нуклеозидное производное имидазофеназина (Pzn). Исследовано влияние ковалентного присоединения красителя на формирование комплементарных комплексов $(dT)_{10}$ — дуплекса с $(dA)_{15}$ и триплексов с $(dA)_{15}$ и $poly(dA) \cdot poly(dT)$ — в буферных растворах с нейтральным pH при двух значениях ионной силы: $\mu = 0,1$ и 1 М. Изучение проводили методом термической денатурации с использованием абсорбционной и флюоресцентной спектроскопии. Показано, что остаток Pzn сильно стабилизирует образующиеся дуплексные и триплексные комплексы за счет интеркаляции хромофора красителя в последовательности dA и dA·dT. Температура плавления комплексов возросла на $10\text{--}12^\circ\text{C}$ для дуплексных и на $15\text{--}20^\circ\text{C}$ для триплексных структур. Стабилизирующее действие нейтрального имидазофеназина оказалось сравнимым по величине с тем, которое оказывают катионные интеркалирующие красители, присоединяемые к олигонуклеотидам через полиметилновый линкер.

V. N. Zozulya, Yu. P. Blagoi, I. Y. Dubey, O. D. Fedoryak, A. S. Shcherbakova, D. M. Fedoryak

Stabilization of duplex and triplex complexes of oligothymidylate by covalently linked imidazophenazine glycoside

Summary

Decathymidylate containing nucleoside derivative of imidazophenazine (Pzn) at the 3'-end was synthesized. The effect of dye covalent attachment on the formation of complementary complexes of $(dT)_{10}$, namely duplex with $(dA)_{15}$ and triplex with $(dA)_{15}$ and $poly(dA) \cdot poly(dT)$, was studied in buffer solutions of neutral pH at ionic strength $\mu = 0,1$ and 1 M. Thermal denaturation method using absorption and fluorescence spectroscopy was employed. It has been shown that Pzn residue strongly stabilized duplex and triplex complexes by dye chromophore intercalation into dA and dA·dT sequences. Melting point of complexes increased for $10\text{--}12^\circ\text{C}$ for duplex and $15\text{--}20^\circ\text{C}$ for triplex structures. Stabilizing effect of

neutral imidazophenazine was comparable to that of cationic intercalating dyes linked to oligonucleotides via polymethylene linker.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Goodchild J. Conjugates of oligonucleotides and modified oligonucleotides: a review of their synthesis and properties // *Bioconjugate Chem.*—1990.—1, N 3.—P. 165—187.
2. Beaucage S. L., Iyer R. P. The functionalization of oligonucleotides via phosphoramidite derivatives // *Tetrahedron.*—1993.—49, N 10.—P. 1925—1963.
3. Thuong N. T., Helene C. Sequence-specific recognition and modification of double-helical DNA by oligonucleotides // *Angew. Chem. (Int. Ed. Engl.)*—1993.—32, N 5.—P. 666—690.
4. Asseline U., Toulme F., Thuong N. T. et al. Oligodeoxynucleotides covalently linked to intercalating dyes as base sequence-specific ligands. Influence of dye attachment site // *EMBO J.*—1984.—3, N 4.—P. 795—800.
5. Toulme J. J., Krisch H. M., Loreau N. et al. Specific inhibition of mRNA translation by complementary oligonucleotides covalently linked to intercalating agents // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1986.—83.—P. 1227—1231.
6. Sun J.-S., Francois J. C., Montenay-Garestier T. et al. Sequence-specific intercalating agents: Intercalation at specific sequences on duplex DNA via major groove recognition by oligonucleotide-intercalator conjugates // *Ibid.*—1989.—86.—P. 9198—9202.
7. Lokhov S. G., Podyminogin M. A., Sergeev D. S. et al. Synthesis and high stability of complementary complexes of N-(2-hydroxyethyl)phenazinium derivatives of oligonucleotides // *Bioconjugate Chem.*—1992.—3, N 5.—P. 414—419.
8. Maltseva T. V., Agback P., Repkova M. N. et al. The solution structure of a 3'-phenazinium (Pzn) tethered DNA-RNA duplex with a dangling adenosine: r(5'GAUUGAA3'):-:D(5'TCAATC3'-Pzn) // *Nucl. Acids Res.*—1994.—22, N 25.—P. 5590—5599.
9. Fox K. R. Formation of DNA triple helices incorporating blocks of G·GC and T·AT triplets using short acridine-linked oligonucleotides // *Ibid.*—N 11.—P. 2016—2021.
10. Mergny J.-L., Boutevine A. S., Garestier M. et al. Fluorescence energy transfer as a probe for nucleic acid structures and sequences // *Ibid.*—N 6.—P. 920—928.
11. Orson F. M., Kinsey B. M., McShan W. M. Linkage structures strongly influence the binding cooperativity of DNA intercalators conjugated to triplex forming oligonucleotides // *Ibid.*—N 3.—P. 479—484.
12. Miller P. S., Bi G., Kipp S. A. et al. Triplex formation by a psoralen-conjugated oligodeoxyribonucleotide containing the base analog 8-oxo-adenin // *Ibid.*—1996.—24, N 4.—P. 730—736.
13. Marchand C., Bailly C., Nguyen C. H. et al. Stabilization of triple helical DNA by a benzopyridoquinoxaline intercalator // *Biochemistry.*—1996.—35, N 15.—P. 5022—5032.
14. Makitruk V. L., Yarmoluk S. N., Shalamay A. S., Alexeeva I. V. Oligonucleotides modified with phenazine derivatives // *Nucl. Acids Res., Symp. Ser.*—1991.—N 24.—P. 244.
15. Uhlmann E., Peyman A. Antisense oligonucleotides: a new therapeutic principle // *Chem. Rev.*—1990.—90, N 4.—P. 543—584.
16. Froehler B. C., Ng P. G., Matteucci M. D. Synthesis of DNA via deoxynucleoside H-phosphonate intermediates // *Nucl. Acids Res.*—1986.—14, N 13.—P. 5399—5407.
17. *Oligonucleotide synthesis: A practical approach* / Ed. M. J. Gait.—Oxford: IRL press, 1984.—218 p.
18. Cassani G. R., Bollum F. J. Oligodeoxythymidylate: Polydeoxyadenylate and oligodeoxyadenylate: Polydeoxythymidylate interactions // *Biochemistry.*—1969.—8, N 10.—P. 3928—3936.
19. Zozulya V., Blagoi Yu., Lober G. et al. Fluorescence and binding properties of phenazine derivatives in complexes with polynucleotides of various base composition and secondary structure // *Biophys. Chem.*—1997.—65.—P. 55—63.
20. Блазгой Ю. П., Зозуля В. П., Волошин И. М. и др. Исследование взаимодействия производных феназина с ДНК методом поляризованной флюоресценции // *Биополимеры и клетка.*—1997.—13, № 1.—С. 22—29.
21. Riley M., Maling B., Chamberlin M.-J. Physical and chemical characterization of two- and three stranded adenine-thymine and adenine-uracil nanopolymer complexes // *J. Mol. Biol.*—1966.—20.—P. 359—389.
22. Martin F. H., Uhlenbeck O. C., Doty P. Self-complementary oligoribonucleotides: Adenylic acid-urilic acid block copolymers // *Ibid.*—1971.—57.—P. 201—215.
23. Pilch D. S., Levenson C., Shafer R. H. Structural analysis of the (dA)₁₀·2(dT)₁₀ triple helix // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1990.—87, N 5.—P. 1942—1946.
24. Burkhoff A. M., Tullius T. D. Structural details of an adenine tract that does not cause DNA to bend // *Nature.*—1988.—331, N 6155.—P. 455—457.
25. Годовикова Т. С., Зарытова В. Ф., Лохов С. Г. и др. Синтез, структура и свойства рубомициновых производных моно- и олигонуклеотидов // *Биоорг. химия.*—1990.—16, № 10.—P. 1369—1378.
26. Говорун Д. М. Структурно-динамічна модель спонтанних напіврозкритих станів ДНК // *Биополимеры и клетка.*—1997.—13, № 1.—С. 39—45.

Надійшла до редакції 05.11.97