

Г. И. БАРАМ, В. Г. БУДКЕР, Н. И. ГРИНЕВА
член-корреспондент АН СССР Д. Г. КНОРРЕ, А. Я. КОЗОВОИЦКИЙ,
Г. Г. ШАМОВСКИЙ

КОМПЛЕМЕНТАРНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БЕНЗИЛИДЕНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ОЛИГОАДЕНИЛАТОВ

Ранее нами было показано, что в 2',3'-O-4-(N-2-хлорэтил-N-метил-амино)-бензилиденовых производных (RCl-производных) ди- и три-адениловых кислот разрушен стекинг между азотистыми основаниями (²), по-видимому, за счет электростатического взаимодействия между ароматическим и гетероциклическим кольцами (¹). Целью данной работы было изучение того, как сказываются эти изменения конформации олигонуклеотида на его способности к специфическим взаимодействиям: к образованию спирального комплекса с полиуридиловой кислотой и к стимулированию связывания лизил-тРНК с рибосомами *in vitro*.

Олигонуклеотиды и их RCl-производные получали, как описано ранее (²). Поли-U, полученная по методу (³), любезно предоставлена В. К. Райтом; в некоторых экспериментах использовали поли-U и поли-A фирмы «Reanal» (Венгрия), очищенные по методу, описанному в (⁴) (в работе используются обозначения, рекомендованные комиссией IUPAC-IUB (⁵)).

Таблица 1

Характеристики использовавшихся препаратов

Соединение	$E_{260} \cdot 10^{-3}$	Соединение	$E_{260} \cdot 10^{-3}$	P *
ApA	13,9	ApARCl	23,9	0,22
(Ap) ₂ A	12,6	(Ap) ₂ ARCl	18,9	0,20
(Ap) ₃ A	12,1	(Ap) ₃ ARCl	16,6	0,23
(Ap) ₄ A	12,1	(Ap) ₄ ARCl	20,8	0,46
поли-A	9,6	поли-U	9,2	—

Коэффициенты экстинкции, выраженные на моль оснований, получены в 0,1 M NaCl — 0,05 M трис HCl (pH 7,0) при 20°.

* P — мольная доля немодифицированного олигонуклеотида в препарате.

Некоторые характеристики использованных препаратов приведены в табл. 1. тРНК получали из *E. Coli* MRE-600, как описано в (⁶). Рибосомы выделяли из *E. Coli* MRE-600, как в (⁷). Ацилирование тРНК C¹⁴-лизинном (ЧССР) с удельной активностью 100 мКи/ммоль проводили по методу, приведенному в (⁸). Связывание C¹⁴-лизил-тРНК с рибосомами в присутствии олигонуклеотидов проводили по методу Ниренберга (⁹). Спектры поглощения и профили плавления снимали на спектрофотометре Unicam SP-700 A, спектры кругового дихроизма — на дихрографе СД-185 фирмы «Roussel Jouan». Измерение радиоактивности проводили на сцинтилляционном счетчике Tritiomatik. Концентрацию олиго- и полинуклеотидов в растворах (в пересчете на концентрацию оснований) определяли спектрофотометрически.

Известно, что в водно-солевых растворах при достаточно низких температурах олигоаденилаты взаимодействуют с поли-U с образованием спиральных комплексов, и этот процесс сопровождается значительными изме-

нениями оптических свойств растворов (¹⁰⁻¹²). При исследовании смесей RCl-производных олигоаденилатов с поли-U были обнаружены отклонения от аддитивности в спектрах поглощения и кругового дихроизма, что указывает на образование в этих смесях межмолекулярных комплексов. Для определения стехиометрии образующихся комплексов были получены кривые смешивания. Как видно из рис. 1 А, в смесях ArArARCl + поли-U

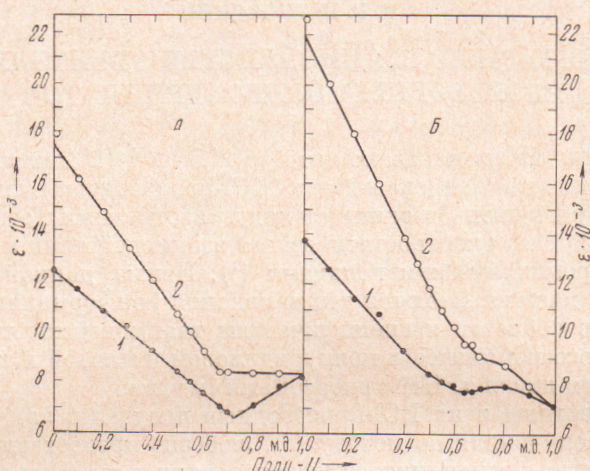


Рис. 1. Кривые смешивания поли-U с олигоаденилатами и их бензилиденовыми производными в 0,1 M NaCl — 0,01 M MgCl₂ — 0,05 M трис·HCl (pH 7,0). Общая нуклеотидная концентрация $0,45 \cdot 10^{-4}$ M, температура -1° . А: 1 — ArArA + поли-U, 2 — ArArARCl + поли-U; Б: 1 — ArA + поли-U, 2 — ArARCl + поли-U

максимальный гипохромизм при 259 мμ наблюдается при мольной доле полиуридилата около 0,7 аналогично тому, как это имеет место в смесях ArArA с поли-U. Это указывает на образование в обеих системах тройных комплексов состава 1A : 2U. Наши данные по стехиометрии комплекса ArArA с поли-U совпадают с литературными (¹⁰⁻¹²). В случае смесей ArA и ArARCl с поли-U (рис. 1Б) на кривых смешивания отсутствуют четкие переломы, что указывает на низкое значение констант ассоциации (¹⁴). Максимальный гипохромизм в обеих системах наблюдается при мольной доле поли-U около 0,6, что указывает, по-видимому, на образование одновременно двух типов комплексов состава 1A : 1U и 1A : 2U. Расхождение этих данных с результатами работ (¹¹⁻¹³), согласно которым в системе ArA + поли-U возможно образование только одного типа комплекса — трехспирального, обусловлено тем, что в цитируемых работах изучались растворы с концентрацией нуклеотидного материала на 1—2 порядка выше наших. Образованию двуспирального комплекса (ArA) × (поли-U) сообщалось в работе (¹⁰), в которой использовались такие же, что у нас, концентрации нуклеотидного материала, но несколько иные солевые условия. Наличие перегиба на кривых рис. 2Б при мольной доле поли-U около 0,8 обусловлено тем, что вследствие низких констант ассоциации ArA и ArARCl не могут препятствовать образованию собственной структуры поли-U, как это имеет место в случае комплексов с высокими константами ассоциации (¹⁵).

Образование комплексов (ArArA) × 2(поли-U) и (ArArARCl) × 2(поли-U) сопровождается однотипными изменениями в спектрах кругового дихроизма; спектры комплексов практически идентичны (рис. 2А и 2Б). Из последнего факта можно сделать следующие выводы: во-первых, бензилиденовые остатки не вносят вклада в оптическую активность комплекса, что возможно только в том случае, если они расположены вне спирали:

во-вторых, геометрические параметры вторичной структуры обоих комплексов очень близки или даже идентичны. Более того, спектры кругового дихроизма комплексов ArArA и ArArARCl с поли-У близки к спектру трехспирального комплекса $(\text{поли-А}) \times 2(\text{поли-У})$ (рис. 2), что свидетельствует о сходстве геометрических параметров комплексов, включающих поли-А и олигоаденилаты. Сходство спектров $(\text{ArArA} \times 2(\text{поли-У}))$ и $(\text{поли-А}) \times 2(\text{поли-У})$ отмечалось ранее в работе ⁽¹²⁾; согласно этим данным, небольшие различия наблюдались только в коротковолновой области спектра, однако, мы наблюдали гипсохромный сдвиг положения длинноволнового максимума (около 2 мμ) при переходе от первого ко второму.

На рис. 3 приведена зависимость температуры плавления (температура, при которой наклон кривой плавления максимален) исследованных нами комплексов от длины цепи олигонуклеотидов. Видно, что стабильность комплексов с участием RCl -производных олигонуклеотидов практически не отличается от стабильности комплексов, образованных немодифицированными олигоаденилатами соответствующей длины.

Таким образом, все приведенные выше результаты свидетельствуют о том, что наблюдавшееся ранее взаимодействие между бензилиденовым остатком и аденином в RCl -производных олигоаденилатов ⁽²⁾ не препятствуют образованию этими производными спиральных комплексов с поли-У. Можно полагать, что отсутствие влияния бензилиденового заместителя на комплексообразование обусловлено в основном энергетической выгодностью стэкинг-взаимодействия между крайними аденинами соседних олигомеров, которое возможно, если олигомеры образуют

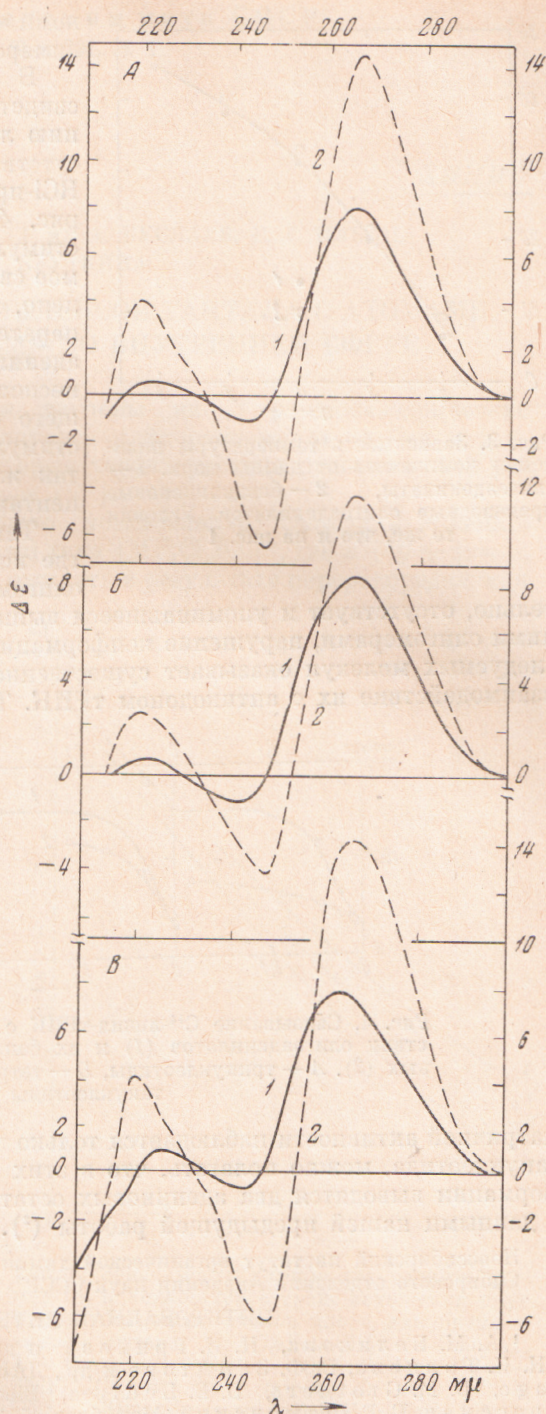


Рис. 2. Спектры кругового дихроизма комплексов. 1 — $(\text{ArArA}) \cdot 2(\text{поли-У})$, 2 — $\frac{1}{3} \text{ArArA} + \frac{2}{3} \text{поли-У}$; Б: 1 — $(\text{ArArARCl}) \cdot 2(\text{поли-У})$, 2 — $\frac{1}{3} \text{ArArARCl} + \frac{2}{3} \text{поли-У}$; В: 1 — $(\text{поли-А}) \cdot 2(\text{поли-У})$; 2 — $\frac{1}{3} \text{поли-А} + \frac{2}{3} \text{поли-У}$. Условия те же, что на рис. 1, $t = -3,5^\circ$

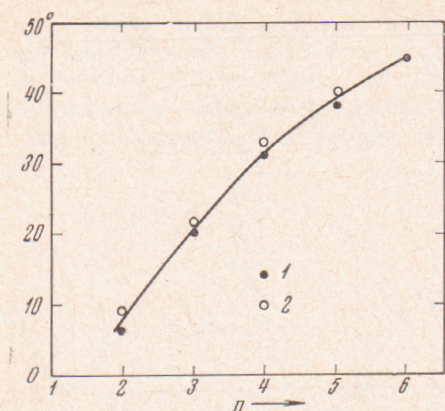


Рис. 3. Зависимость температуры плавления комплексов от длины цепи. 1 — олигонуклеотиды, 2 — бензилиденные производные олигонуклеотидов. Условия те же, что и на рис. 1

комплекс с достаточно длинным полимером.

В пользу этого предположения свидетельствуют данные по связыванию лизил-тРНК рибосомами в присутствии олигонуклеотидов и их RCl-производных. Как видно из рис. 4, $(Ap)_2ARCl$ практически не стимулирует связывание (наблюдаемое связывание лизил-тРНК обусловлено, по-видимому, примесью в препарате немодифицированного олигонуклеотида); активность $(Ap)_3ARCl$ несколько ниже, чем у соответствующего олигонуклеотида, а $(Ap)_4ARCl$ стимулирует связывание практически так же, как немодифицированный пентамер.

Таким образом, в этой системе, где исключена взаимная ориентация олигомеров на полимере, а следова-

тельно, отсутствует и упоминавшееся выше взаимодействие между соседними олигомерами, нарушение конформации олигонуклеотидной части исследуемых молекул оказывает существенное влияние на специфическое взаимодействие их с антикодоном тРНК. Так как полное восстановление

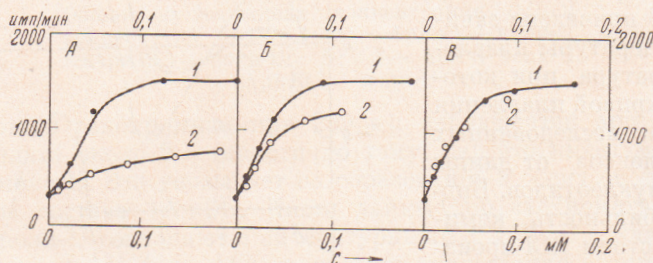


Рис. 4. Связывание C^{14} -лизил-тРНК с рибосомами в присутствии олигонуклеотидов (1) и их бензилиденных производных (2). А — тринуклеотиды, Б — тетрануклеотиды, В — пентануклеотиды

матричной активности наблюдается только в случае RCl-производного пентануклеотида, можно полагать, что в этих соединениях из нативной конформации выводятся два адениновых остатка, что полностью согласуется с данными нашей предыдущей работы (2).

Новосибирский институт органической химии
Сибирского отделения Академии наук СССР

Поступило
26 V 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- 1 А. М. Беликова, Н. И. Гринева и др., ДАН, 195, № 6, 1337 (1970).
- 2 Н. И. Гринева, В. Ф. Зарытова и др., ДАН, 198, № 3 (1971).
- 3 D. W. Henneage, D. M. Grothers, D. B. Ludlum, Biochemistry, 8, 2298 (1969).
- 4 Л. С. Прессман, Г. Г. Шамоуцкий, Мол. биол., 5, 375 (1971).
- 5 Biochemistry, 9, 4022 (1970).
- 6 Л. С. Сандахчиев, В. К. Старостина и др., Мол. биол., 1, 463 (1967).
- 7 M. W. Nirenberg, J. H. Matthaei, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 47, 1598 (1961).
- 8 Д. Г. Кнорре, В. И. Сиротюк, Л. Е. Стефанович, Мол. биол., 1, 837 (1967).
- 9 M. W. Nirenberg, P. Leder, Science, 145, 1399 (1964).
- 10 M. N. Lipsett, L. A. Heppel, D. F. Bradley, J. Biol. Chem., 236, № 3, 857 (1961).
- 11 A. M. Michelson, C. Monny, Biochim. et biophys. acta, 149, 107 (1967).
- 12 C. R. Cantor, W. W. Chin, Biopolymers, 6, № 12, 1745 (1968).
- 13 I. Tazawa, S. Tazawa, L. M. Stempel, P. O. P. Ts'o, Biochemistry, 9, № 18, 3499 (1970).
- 14 G. Felsenfeld, Biochim. et biophys. acta, 29, 133 (1958).
- 15 P. M. Pitha, P. O. P. Ts'o, Biochemistry, 8, 5206 (1969).