



УДК 577.113.4 + 539.194

© 1990 г.

## ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРНО-ЭНЕРГЕТИЧЕСКИХ АСПЕКТОВ КОМПЛЕМЕНТАРНО-АДРЕСОВАННОЙ МОДИФИКАЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ МЕТОДОМ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МЕХАНИКИ. КОНФОРМАЦИОННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ АЛКИЛИРОВАНИЯ 4-[N-МЕТИЛ-N-(2-ХЛОРЭТИЛ)]- АМИНОБЕНЗИЛ-5'-ФОСФАМИДНЫМИ ПРОИЗВОДНЫМИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

*Воробьев Ю. Н.*

*Новосибирский институт биоорганической химии Сибирского отделения  
Академии наук СССР*

Разработана методика и необходимые программные средства для моделирования методом молекулярной механики структурно-энергетических аспектов комплементарно-адресованной модификации нуклеиновых кислот. Программы ориентированы на ЕС ЭВМ. Расчеты ведутся с учетом влияния среды на электростатическую и гидратационную энергии комплекса в приближении статистической модели среды. Оптимизация конформационной энергии выполняется по степеням свободы комплементарного комплекса и алкилирующего реагента методами локальной оптимизации или Монте-Карло.

Представлены результаты расчетов относительных вероятностей алкилирования 4-[N-метил-N-(2-хлорэтил)]аминобензил-5'-фосфамидными производными олигонуклеотида различных сайтов НК-мишени. Показано, что комплементарный комплекс имеет две абсолютно оптимальные конформации T1, T2, являющиеся «накопителями» состояний для дальнейшего формирования реакционноспособных конформаций. В конформации T1 активная группа реагента ориентирована «вперед» в сторону 3'-конца НК-мишени, в конформации T2 активная группа реагента ориентирована «назад» в сторону 5'-конца НК-мишени. Соответствие конформаций «накопителей» реакционноспособным конформациям определяет эффективность алкилирования сайтов и способность взаимодействовать с нуклеофилами среды. Результаты расчетов качественно согласуются с экспериментальными данными по позиционной направленности алкилирования.

Модификация нуклеиновых кислот комплементарно-адресованными производными олигонуклеотидов, содержащих химически реакционноспособную группу, является перспективным методом направленного воздействия на биополимеры. Химические, термодинамические, кинетические аспекты комплементарно-адресованной модификации НК-мишени реакционноспособными производными олигонуклеотидов активно исследовались и накоплен достаточно содержательный экспериментальный и теоретический материал, обобщенный в обзорах [1—3]. Важная характеристика адресованного реагента — направленность и избирательность модификации определенного реакционноспособного сайта НК-мишени. Направленность и избирательность адресованного реагента определяется, во-первых, положением соответствующего комплементарного участка на НК-мишени, во-вторых, деталями пространственной третичной структуры НК-мишени и, в третьих, конформационными возможностями реакционноспособной группы адресованного реагента образовывать продуктивные комплексы, в которых алкилирующая группа реагента пространственно сближена с реакционноспособными центрами НК-мишени. Конструирование реакционноспособных производных олигонуклеотидов, обладающих вы-

Принятые сокращения: ММ — молекулярная механика, СМС — приближение статистической модели среды, ПВК — предреакционный ван-дер-ваальсов комплекс.

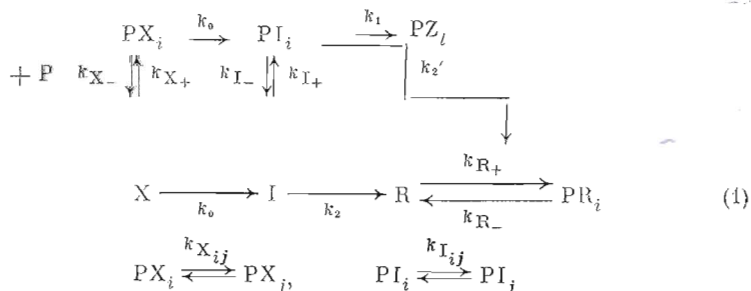
сокой избирательностью, более эффективно, если известны структурные и энергетические детали процесса на атомном уровне. Исследование структурных энергетических аспектов может быть выполнено моделированием методом молекулярной механики вероятных конформаций и энергий комплексов НК-мишени с адресованным реагентом. Накопление результатов моделирования и сопоставление их с экспериментальными данными по избирательности адресованных реагентов необходимо для построения общих математических моделей предсказаний свойств адресованных реагентов по их химической структуре и оптимизации структуры по заданному свойству. Достоверность моделирования структуры и энергии комплексов НК-мишень — адресованный реагент требует глубоко разработанных методов молекулярной механики, учитывающих влияние среды на энергию конформаций макромолекулярной системы в растворе электролита. Разработка и тестирование такого метода описаны в работах [4—6].

В настоящей работе сообщается о разработке методики и реализующих ее программ на ЭВМ ЕС-1061, позволяющих методом молекулярной механики исследовать структурно-энергетические аспекты комплементарно-адресованной модификации НК. Приведены результаты расчетов конформационных возможностей производных олигонуклеотидов dCCAACrA в комплементарном комплексе с октануклеотидом dTGTTTGGC, комплексах с иной последовательностью оснований НК-мишени и комплексах октануклеотидов производных пентануклеотидов, несущих 4-[N-метил-N-(2-хлорэтил)аминобензиламидные группы на 5'-концевом фосфате или 5'-RCl-группу.

Число исследований, посвященных моделированию конформационных возможностей НК и их комплексам с низкомолекулярными лигандами, возрастает [7—9], что свидетельствует о важности модельного подхода. Следует отметить, что программный продукт, реализующий определенную методику моделирования, как правило, ориентирован на возможности вычислительной системы и внешние устройства. Например, известная методика моделирования строения макромолекул AMBER, разработанная группой Кольмана [10, 11], использует суперкомпьютер с системой визуализации высокого разрешения. Необходимо также отметить грубость метода учета влияния растворителя на энергию макромолекулы в растворе в большинстве модельных исследований [7—11]. С другой стороны, известны достаточно точные способы учета воздействия среды на растворенную молекулу, основанные на методе молекулярной динамики в супермолекулярном приближении и уравнении Пуассона — Больцмана [12, 13], которые, однако, неприемлемы для макромолекулярной системы ввиду громоздкости вычислений.

### Факторы, определяющие избирательность адресованного реагента

Для выяснения факторов, определяющих избирательность, т. е. относительную способность химического взаимодействия реагента с определенными центрами НК-мишени, рассмотрим обобщенную кинетическую схему процесса комплементарно-адресованной модификации, приведенную в [2, 14]:



Здесь P — биополимер мишень, X — адресованный реагент, I — реагент с активной группой в ионизированном состоянии в форме этилениммоние-

Константы скорости адресованной модификации НК [1–3,15] (см. схему 1)

$k_{X_+}, M^{-1}\cdot c^{-1}$	$k_{X_-}, c^{-1}$	$k_0, c^{-1}$	$k_1, c^{-1}$	$k_2, c^{-1}$	$k_{X_{ij}}, c^{-1}$	$k_{I_{ij}}, c^{-1}$
$10^5$	$10^0$	$10^{-5}$	$10^1$	$10^0$	$10^7$	$10^7$
$10^6$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^2$	$10^1$	$10^8$	$10^8$

вого катиона;  $PX_i$  — комплементарный комплекс в  $i$ -й конформации адресованного реагента;  $R$  — продукт гидролиза активной частицы, дезактивированный адресованный реагент;  $PZ_l$  — модифицированный ковалентно сшитый комплементарный комплекс НК-мишень — адресованный реагент.

Основными этапами процесса являются: 1) образование популяции конформаций комплементарных комплексов  $PX_i$ ; 2) активация реагента в комплементарном комплексе  $PI_i$ ; 3) модификация сайта  $l$  НК-мишени в комплементарном комплексе  $PZ_l$ . Конкурентные процессы, уменьшающие выход модифицированного продукта: 1) дезактивация активной частицы в комплементарном комплексе нуклеофилами буфера, например молекулой воды; 2) дезактивация адресованного реагента в свободном состоянии в растворе; 3) образование комплементарных комплексов  $PR_i$  с реагентом, имеющим уже дезактивированную активную группу.

Кинетическая схема (1) содержит быстрые и медленные стадии, порядок скоростей реакции приведен в табл. 1. Процессы образования комплементарных комплексов и конформационные переходы в них являются быстрыми стадиями. Наиболее медленный процесс — ионизация реагента и превращение в этилениммониевый катион  $R^+$ . Прямые данные о константах скорости  $k_1$  реакции катиона  $R^+$  с сайтами НК-мишени в комплексе отсутствуют. Однако из обработки кинетических данных следует [2, 16], что, по-видимому,  $k_{1i} \gg k_{1-}$ , т. е.  $k_{1i} \sim 10-10^2 c^{-1}$ . Константа скорости  $k_2$  дезактивации адресованного реагента в комплексе нуклеофилами буфера, согласно косвенным данным [2, 16], по-видимому, подчиняется условию  $k_{1+}[P] \ll k_2$ , т. е.  $k_2 \sim 10^0-10^1 c^{-1}$ .

Из сопоставления констант скоростей конформационных перестроек  $k_{X_{ij}}$  и  $k_{I_{ij}}$  следует, что<sup>1</sup> распределение комплексов  $PX_i$  и  $PI_i$  по относительным концентрациям равновесное. Алкилирование НК-мишени происходит из равновесной популяции комплементарных комплексов  $PI$  с реакционноспособной группой, активированной в этилениммониевый катион. Скорость образования  $v_l$  продукта алкилирования  $PZ_l$  по определенному сайту  $l$  по схеме (1) определяется выражением

$$v_l = \sum_i C_i \frac{k_{1il}}{\sum_i k_{1il} + k_{2i}}, \quad (2)$$

где  $C_i$  — равновесная концентрация комплекса  $PI_i$ . Константы скорости  $k_{1il}$  определяются величиной энергии активации реакции  $PE_{il}^\ddagger$  из  $i$ -го состояния адресованного реагента в комплементарном комплексе. Качественная картина изменения энергии комплекса вдоль пути реакции на последовательных этапах превращения  $PI_i$  в  $PZ_l$  приведена на рис. 1. Из выражения (2) следует, что эффективная полная энергия активации  $E_l^\ddagger$  равна сумме

$$E_l^\ddagger = \Delta E_i + \Delta E_{il}^\ddagger. \quad (3)$$

В свою очередь, величина  $\Delta E_{il}^\ddagger$  может быть представлена в виде суммы

$$\Delta E_{il}^\ddagger = \Delta E_{il}^* + \Delta E_{il}^\ddagger, \quad (4)$$

где  $\Delta E_{il}^*$  — энергия перехода в предреакционное состояние, отвечающее оптимальному предреакционному ван-дер-ваальсову комплексу свобод-

ного алкилирующего реагента активированного до  $R^+$ ;  $\Delta E_{ii}^\ddagger$  — энергия активации собственно стадии химической реакции, полностью определяется только природой алкилируемого центра  $l$ .

Из проведенного анализа составляющих полной энергии активации  $E_l^\ddagger$  виден путь повышения избирательности алкилирования, т. е. скорости

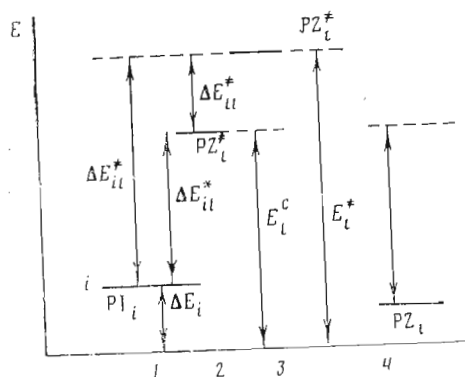


Рис. 1. Состояния комплементарного комплекса вдоль пути реакции алкилирования: 1 — оптимальная  $i$ -я конформация комплементарного комплекса; 2 — предреакционный ван-дер-ваальсов комплекс алкилирования  $l$ -го сайта НК-мишени; 3 — переходный комплекс реакции алкилирования сайта; 4 — продукт алкилирования НК-мишени

выхода  $\nu_l$  определенного продукта. Он состоит в конструировании адресованных реагентов, имеющих минимальную конформационную  $E_l^c$ , составляющую полную энергии активации,

$$E_l^c = \Delta E_i + \Delta E_{ii}^*. \quad (5)$$

Величина  $E_l^c$  может быть оценена моделированием методом молекулярной механики конформационных возможностей адресованного реагента в комплементарном комплексе с НК-мишенью. Величина  $\nu_l$  определяется суммарной энергией активации

$$E_l^\ddagger = E_l^c + \Delta E_{ii}^\ddagger. \quad (6)$$

Последний член  $\Delta E_{ii}^\ddagger$  определяется реакционной способностью сайтов НК-мишени. Величина энергии активации  $\Delta E_{ii}^\ddagger$  химического взаимодействия этилениммониевого катиона с сайтом  $l$  нуклеиновой кислоты может быть оценена квантово-химическими расчетами. Однако, так как надежность последних в оценке величин барьеров реакций в среде еще не достаточна [17, 18], приближенно можно оценить относительные величины  $\Delta E_{ii}^\ddagger$  из экспериментальных данных по реакционной способности мономеров нуклеотидов [3, 19]. Известно, что реакционная способность оснований мономеров нуклеотидов при алкилировании фенилдиэтилхлораминном уменьшается в ряду  $G \gg C \sim A > T$  [3, 19] в отношении 35 : 5 : 4 : 1. Так как скорость ионизации хлора и превращения в этилениммониевый катион практически не зависит от типа основания [1, 3], а определяется только условиями среды, реакционная способность оснований НК определяется различными донорными способностями сайтов оснований. Оценки величины  $\Delta E_{ii}^\ddagger$  для G, C, A, T соответственно дают 0; 1; 1; 2,2 ккал/моль.

### Метод расчета конформаций комплементарных комплексов

Расчет конформаций и энергий комплементарных комплексов адресованного реагента с НК выполняли методом молекулярной механики. В настоящей задаче важное значение имеет точность оценки энергии конформаций комплексов в водном растворе электролита. Для учета влияния среды нами разработано приближение статистической модели среды [4—6], которое широко тестировано именно на комплементарных комплексах НК, в том числе модифицированных по фосфатной группе [20]. Разработанная параметризация метода ММ и СМС позволяет с точностью

1 ккал/моль рассчитать энтальпию раскрытия концевых пар оснований в дуплексе [6], зависимость относительной стабильности А- и В-форм дуплексов от последовательности [5], влияние стереоспецифической модификации фосфатных групп неионных аналогов олигонуклеотидов на стабильность их комплементарных комплексов с НК [20].

Полная конформационная энергия  $E_F$  комплекса НК — реагент состоит из следующих слагаемых:

$$E_F = E_V + E_H + E_{el} + E_t + E_D + E_{SL} + E_{ms} + E_i + E_{ws} + E_{gn} + E_{gs},$$

где  $E_V$  — энергия ван-дер-ваальсовых взаимодействий атомов,  $E_H$  — энергия водородных связей,  $E_{el}$  — энергия электростатических взаимодействий атомов в водном растворе электролита,  $E_t$  — энергия торсионных взаимодействий,  $E_D$  — энергия деформации межнуклеотидных связей и валентных углов в олигонуклеотидных цепочках и алкилирующем реагенте,  $E_{SL}$  — энергия электростатического поля в среде заряженных фосфатных групп олигонуклеотида и алкилирующего реагента,  $E_{ms}$  — вклад молекулярной структуры растворителя во взаимодействие заряженных и гидрофобных групп,  $E_i$  — энергия взаимодействия с мобильными ионами электролита,  $E_{ws}$  — энергия системы водных скрепок между полярными атомами макромолекулы,  $E_{gn}$ ,  $E_{gs}$  — энергии неспецифической гидрофобной и специфической гидрофильной гидратации. Подробности расчета перечисленных энергий взаимодействия, а также величины необходимых параметров приведены в работах [4—6]. Для выполнения расчетов оптимальных и условно оптимальных конформаций комплементарных комплексов олигонуклеотида с алкилирующим реагентом создана программа MMNARG на ЭВМ ЕС-1061 на языке Фортран-IV. Программа MMNARG является развитием программы MMNAAM [5, 6] для расчетов конформаций комплементарных комплексов НК. Основные возможности программы MMNARG: 1) генерация конформаций комплементарных комплексов по независимым для каждого мономера спиральным параметрам, торсионным углам рибозофосфатного скелета и взаимному положению цепей НК; 2) генерация конформаций ковалентно пришитого к указанному месту олигонуклеотида алкилирующего реагента, имеющего произвольную структуру. Структура реагента описывается общим векторным алгоритмом Хоуэлла [21] и имеет в качестве независимых варьируемых параметров торсионные и валентные углы, длины валентных связей; 3) введение различных типов линейной зависимости между парами геометрических конформационных параметров; 4) возможно дополнение конформационной энергии штрафным условием на взаимные ориентации и расстояния между атомными группами комплекса. Это позволяет имитировать сближение реагирующих атомных групп; 5) оптимизация конформационной энергии и условного функционала возможна по любому подмножеству геометрических конформационных переменных, что позволяет имитировать жесткий или подвижный комплементарный комплекс. Оптимизация конформационной энергии может выполняться либо методом локальной оптимизации [22], либо методом Монте-Карло по схеме Метрополиса [23]. Симуляция методом Монте-Карло позволяет получить представление о строении поверхности потенциальной энергии в окрестности устойчивых конформаций комплекса, а также исследовать устойчивость состояния при заданной температуре.

В приближении СМС все вклады среды вычисляются как свободная энергия. Конформационная энтропия комплекса не вычисляется. Однако, так как энтропия — слабо изменяющаяся функция поверхности потенциальной энергии, есть основания полагать, что разность свободных энергий двух конформаций комплексов в большинстве случаев будет достаточно удовлетворительно аппроксимироваться разностью конформационных потенциальных энергий. Исключениями будут состояния комплекса, существенно различающиеся конформациями олигонуклеотидов комплементарного комплекса или числом «размороженных» степеней свободы внутреннего вращения. Так как число микроскопических состояний —

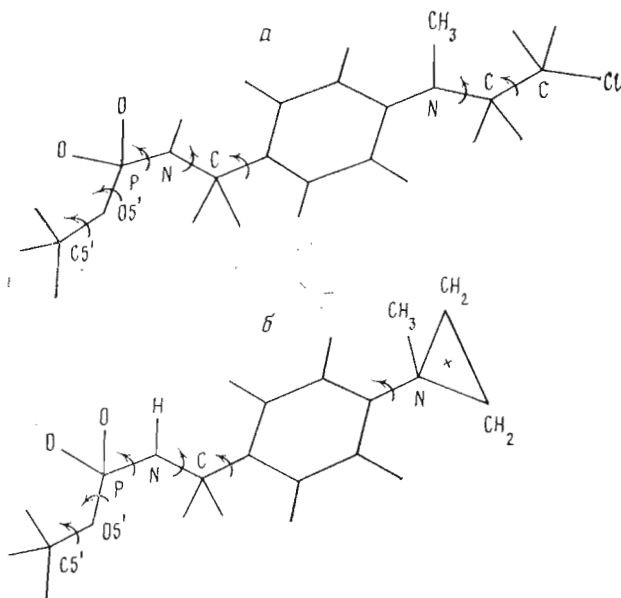


Рис. 2. Структура алкилирующего реагента RCl, присоединенного к 5'-концевой фосфатной группе олигонуклеотида адреса (а), и реагента в ионизованном состоянии (б). Показана степень внутреннего вращения

экспоненциальная функция числа степеней свободы, изменение энтропии можно оценивать выражением

$$\Delta S = S_0 \Delta n, \quad (7)$$

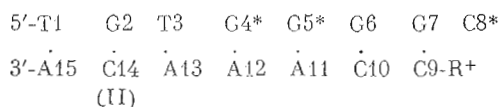
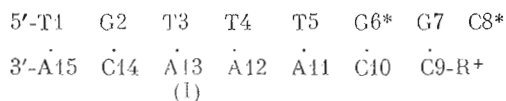
где  $S_0$  — эмпирическая константы,  $\Delta n$  — изменение числа размороженных степеней свободы. Для систем НК величину  $S_0$  можно оценить из энтропии раскрытия концевой пары оснований. Для этого процесса  $\Delta n \sim 16$ , в среднем  $\Delta S \approx 21$  э. е. [24, 25], следовательно,  $S_0 \approx 1,3$  э. е. Оценка среднего числа состояний  $m$

$$m = \exp(S_0/R),$$

на каждую размороженную степень внутреннего вращения дает величину  $m \approx 1,9$ , что достаточно разумно для полинуклеотидов.

### Конформационные возможности алкилирующих реагентов 5'-RCl в комплементарном комплексе

Расчеты конформационных возможностей 5'-RCl-производных олигонуклеотидов в комплементарном комплексе выполнены для нескольких комплементарных дуплексов. Цель расчетов состояла в определении величин  $E_i^c$  конформационной составляющей энергии активации реакции алкилирования сайтов НК-мишени или адреса. Расчеты выполнены для алкилирующего реагента, ионизованного до этилениммониевого катиона  $R^+$  (см. рис. 2). Исследованы следующие комплементарные комплексы:



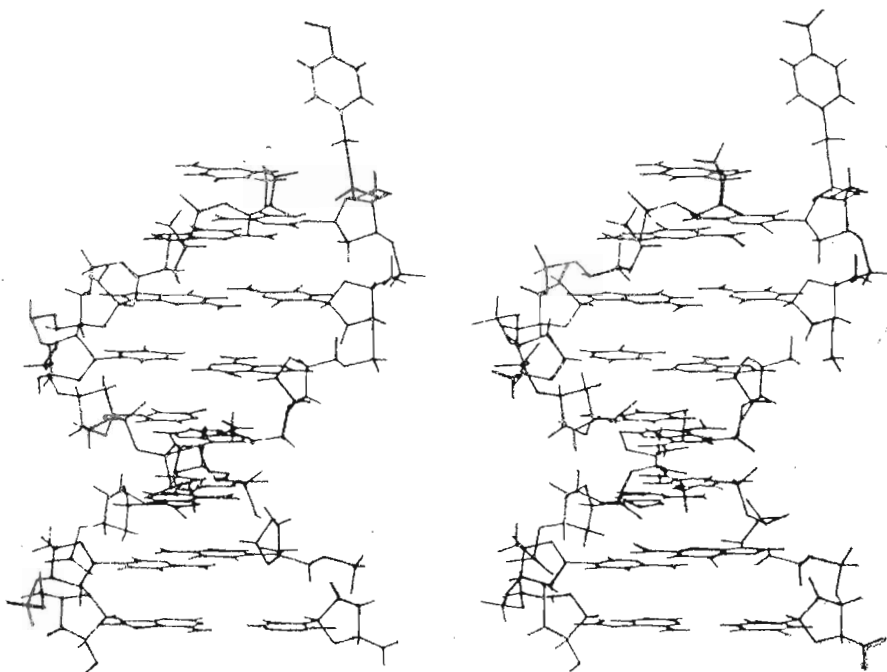


Рис. 3. Конформация 10 комплементарного комплекса (I) с реагентом  $R^+$ , экспонированным в окружающую среду

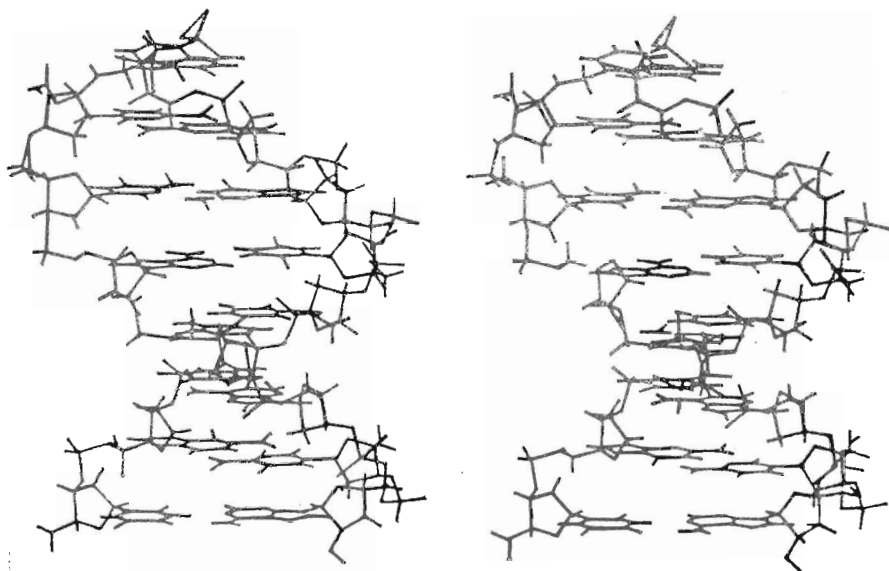
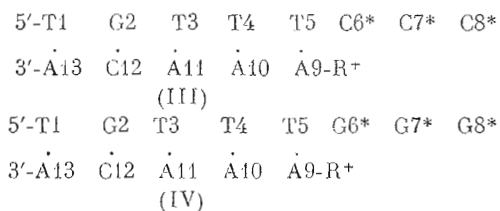


Рис. 4. Конформация T1 комплементарного комплекса (I)



Исследованы возможности образования энергетических оптимальных конформаций комплексов, а также ПВК этилениммониевого катиона адресованного реагента с реакционноспособными сайтами олигонуклеотида

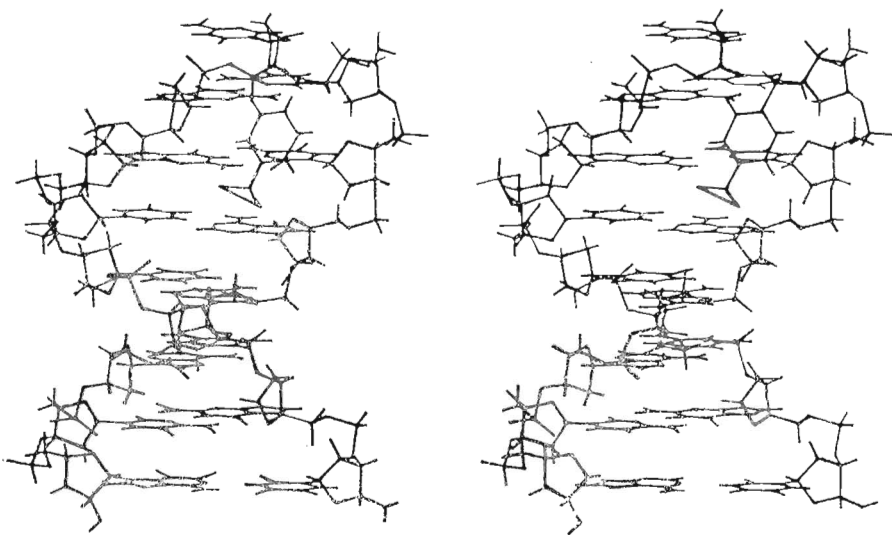


Рис. 5. Конформация T2 комплементарного комплекса (I)

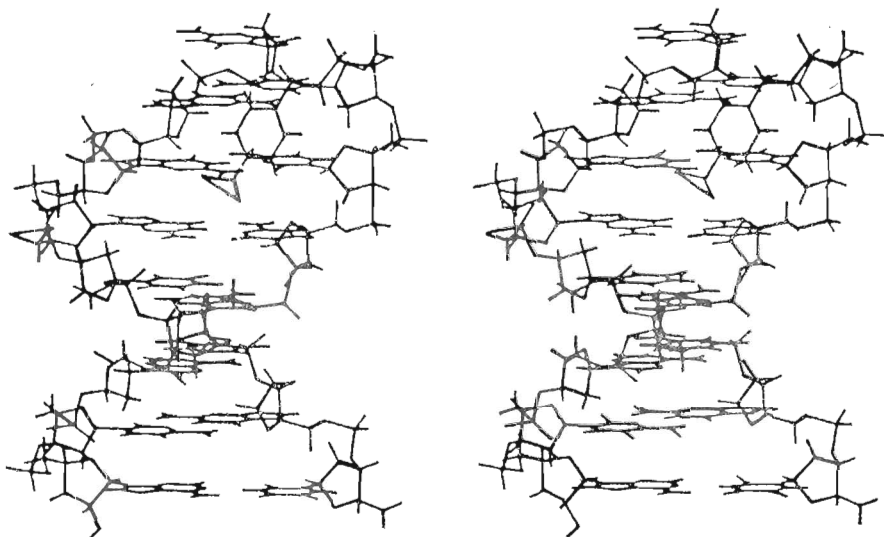


Рис. 6. Конформация T2, K5 комплементарного комплекса (II)

мишени: атомами N7(G, A), N3, O2(C). Основания, для которых выполнены расчеты ПВК, отмечены звездочкой в комплексах (I)–(IV).

Обсудим результаты расчетов. Во-первых, для дуплексов (I)–(IV) без алкилирующей группы реагента был выполнен расчет оптимальной конформации в В-форме по методике [5]. Оптимизацию энергии комплекса проводили по спиральным параметрам каждой пары и торсионным углам рибозофосфатных цепей. Полученные структуры дуплексов имеют в среднем угол спирального вращения  $\sim 37^\circ$ , шаг  $\sim 3,40$  Å, углы наклона и пропеллера пар в пределах  $\sim 1^\circ$ . Далее, к олигонуклеотиду адреса был присоединен алкилирующий реагент в ионизованном состоянии  $R^+$  и рассчитана конформация с реагентом, экспонированным в окружающую среду. Соответствующая структура комплекса (рис. 3) характеризуется минимальным торсионным напряжением в цепочке атомов реагента.

Расчет низкоэнергетических локально оптимальных конформаций комплекса указал на существование двух состояний — T1 и T2. В состоянии T1 активная частица реагента ориентирована «вперед» в сторону 3'-конца НК-мишени (рис. 4). В состоянии T2 активная группа реагента ориентирована «назад» в сторону 5'-конца НК-мишени, а реагент уложен в большую бороздку двойной спирали (рис. 5).



Энергии взаимодействий в различных конформациях комплексов (ккал/моль)

Комп- лекс	Конфор- мации	Сайт алкили- рования	$E_V$	$E_{el}$	$E_g$	$E_D$	$E_{ful}$	$\Delta E_l^c$	$\Delta \Delta E_l^{\neq}$
(I)	T0	—	-109,1	-53,8	-297,8	10,3	-630,2	0,0	—
	T1 K1	N3(C8)	-113,2	-57,2	-300,5	11,1	-637,8	-7,6	0,0
	T2	—	-117,0	-56,3	-300,6	12,6	-640,6	-10,4	—
	T2 K2	N7(G6)	-110,1	-55,7	-298,7	11,5	-631,5	-1,5	4,1
(II)	T2 K3	N7(G7)	-95,2	-55,4	-300,5	11,7	-618,1	4,5	11,1
	T0	—	-111,1	-53,5	-288,7	10,5	-627,2	0,0	—
	T1 K4	N3(C8)	-115,3	-56,2	-292,5	11,3	-635,2	-8,0	0,0
	T2	O6(G5)	-118,6	-56,0	-291,6	12,5	-637,4	-10,2	—
(III)	T2 K5	N7(G5)	-114,1	-57,1	-290,3	12,3	-632,4	-5,2	1,8
	T0	—	-79,8	-41,9	-266,6	10,2	-531,8	0,0	—
	T1 K6	N3(C7, C6)	-83,6	-42,4	-265,6	11,9	-534,3	-2,5	0,0
	T1 K7	N3(C6)	-82,3	-42,1	-266,6	12,1	-533,0	-1,2	1,3
(IV)	T1 K8	N3(C8)	-79,4	-42,7	-264,7	10,5	-529,8	2,0	4,5
	T0	—	-85,9	-43,2	-267,8	10,9	-539,5	0,0	—
	T1	N7(G6)	-87,8	-43,6	-267,6	12,8	-542,4	-2,9	0,0
	T1	N7(G7)	-84,2	-43,7	-267,1	13,7	-539,3	0,2	3,1
	T1	N7(G8)	-83,0	-43,1	-266,7	15,2	-535,8	3,7	6,6

Примечание.  $E_V$  — энергии ван-дер-ваальсовых взаимодействий,  $E_{el}$  — энергия электростатических взаимодействий,  $E_g$  — энергия гидратационных взаимодействий,  $E_D$  — энергия деформаций,  $\Delta E_l^c$  — конформационная составляющая энергии активации алкилирования сайта,  $\Delta \Delta E_l^{\neq}$  — относительная величина эффективной энергии активации алкилирования сайта  $l$ .

Далее, из состояний T1 и T2 конструировали ПВК для алкилирования определенных сайтов оснований. Так как активная частица представляет практически тетраэдр с ван-дер-ваальсовым радиусом 2,2 Å, длина минимального ван-дер-ваальсова контакта алкилируемого атома N основания с атомом N(R<sup>+</sup>) составляет ~4,0 Å. Сконструированные ПВК характеризовались именно таким расстоянием. Ориентацию R<sup>+</sup> не принимали во внимание, так как раскрытие этилениммониевого цикла при алкилировании может происходить множеством способов. Результаты расчетов энергий ПВК представлены в табл. 2. В ПВК K1 активная частица R<sup>+</sup> сближена с реакционноспособными сайтами N3, O2 основания C8. Фенильное кольцо реагента в этой конформации находится почти в стопке с основанием C9 НК-адреса, хотя качество их стеклинг-расположения не идеальное. Структура комплекса K1 показана на рис. 4. Из табл. 2 видно, что энергия ван-дер-ваальсовых взаимодействий  $\Delta E_V$  в конформации K1 комплекса понижена ( $\Delta E_V(K1) = -4$  ккал/моль) относительно энергии ван-дер-ваальсовых взаимодействий в комплексе T0 с реагентом, экспонированным в среду. Энергия электростатических взаимодействий при переходе из конформаций T0 в K1 уменьшается ( $\Delta E_{el}(K1) = -3,4$  ккал/моль), так как катион R<sup>+</sup> приближается к отрицательно заряженному дуплексу. Изменение суммарной энергии неспецифической, специфической гидратаций и энергии системы водных скрепок составляет  $\Delta E_g(K1) = -2,7$  ккал/моль, в водном растворе молекулярный комплекс стремится компактизоваться. Комплекс T1 характеризуется малым расстоянием между катионом R<sup>+</sup> и отрицательно заряженными центрами алкилирования (N3, O2(C8) ~ 4 Å), хорошо соответствует оптимальному ПВК (K1).

Второе низкоэнергетическое состояние комплекса (T2) соответствует конформации, в которой реагент R<sup>+</sup> взаимодействует с двойной спиралью комплементарного комплекса по большой бороздке (рис. 5). В конформации T2 фенильное кольцо уложено в большую бороздку дуплекса и образует прочный ван-дер-ваальсов комплекс ( $\Delta E_V(T2) \approx -7,9$  ккал/моль). Электростатические взаимодействия, как и следует ожидать, увеличиваются в комплексе T2 ( $\Delta E_{el}(T2) = -2,5$  ккал/моль). Энергия гидратационных взаимодействий ( $\Delta E_g(T2) = -2,8$  ккал/моль) в комплексе T2 также уменьшается. Комплекс T2 характеризуется малым расстоянием между

$R^+$  и атомом  $O_4(T5)$ . Однако, так как реакционная способность атома  $O_4$  основания  $T5$  по отношению к алкилированию в уотсон-криковской паре очень низка [3], это препятствует алкилированию основания.

В целом из расчетов следует, что ориентация реагента в большую бороздку двойной спирали энергетически наиболее выгодна. Основной фактор, определяющий высокую стабильность комплекса  $T2$ , — оптимизация ван-дер-ваальсовых взаимодействий. Деформационная напряженность реагента возрастает в ряду комплексов  $T1, T2$ . Возмущение двойной спирали оптимальной  $B$ -формы в конформациях  $T1, T2$  практически отсутствует.

Оценка электростатической энергии взаимодействия в комплексе заряженной частицы этилениммониевого катиона  $R^+$  относительно неионизованного реагента  $RCI$  дает величину  $\Delta E_{el} \approx -3,5$  и  $-5$  ккал/моль в комплексах  $T1$  и  $T2$ . Из работ [3, 26] по экспериментальному изучению влияния зарядового состояния активной частицы на скорость алкилирования следует, что скорость алкилирования ДНК частицей с зарядом  $+1$  в 200 раз больше, чем нейтральной частицей. Величина такого ускорения при  $\sim 300$  К соответствует уменьшению энергии активации на 3 ккал/моль.

Вероятными сайтами алкилирования являются атомы  $N7$  оснований  $G7, G6$ . Расчеты конформационной энергии ПВК катиона  $R^+$  относительно атомов  $N7$  в  $G7, G6$  показали, что их формирование требует заметного возмущения строения дуплекса. Именно формирование комплекса для алкилирования  $N7$  основания  $G6$  сопровождается увеличением на  $10-12^\circ$  угла спирального вращения на шаге  $G6-G7$ . Это позволяет сблизить  $R^+$  с атомом  $N7(G6)$  (рис. 6). Однако такая конформационная подстройка требует дополнительного напряжения. В результате полная энергия комплекса оказывается выше, чем в оптимальном комплексе  $T2$ , на 9 ккал/моль.

Образование ПВК для алкилирования  $N7(G7)$  требует разрыва концевой пары  $G6-C9$  и поэтому также энергетически невыгодно. По оценкам, с учетом изменения конформационной энтропии начального и конечного состояния по формуле (7) разность энергий  $\Delta E_i^c$  ( $G7, G6$ ) более 5 ккал/моль.

Таким образом, расчеты конформационных энергий  $\Delta E_i^c$  ПВК для алкилирования оснований  $C8, G7, G6$ , приведенные в табл. 2, свидетельствуют, что меньшей (на 6 ккал/моль) энергией обладает ПВК алкилирования атомов  $N3, O2$  основания  $C8$ . Оценка относительной величины полной энергии активации  $\Delta E_i^{\neq}$  алкилирования сайтов, т. е. с учетом относительной реакционной способности сайтов дает преобладание алкилирования  $C8$  над  $G6, G7$  в отношении 1000 : 1. Экспериментально для комплекса (I) установлено преимущественное алкилирование по  $C8$  по сравнению с  $G6$  и  $G7$  в отношении 10 : 1 [27].

Вернемся к обсуждению комплекса  $T2$  с реагентом, уложенным в большой бороздке двойной спирали (рис. 5). Расположение активной частицы  $R^+$  вблизи основания  $T5$  комплекса  $T2$  в неискаженном дуплексе свидетельствует о возможности алкилирования «назад» оснований НК-мишени в 3-м и при дополнительных искажениях дуплекса в 4-м положениях от 5'-конца комплементарного адреса. Для исследования такой возможности был рассмотрен комплекс (II), полученный из (I) заменой  $T5$  на  $C5$ . Расчеты величины  $\Delta E_i^c$  конформационной энергии ПВК  $K5$  алкилирования  $N3(C8)$  и комплекса  $K6$  алкилирования  $N7(G5)$ , приведенные в табл. 2, свидетельствуют, что энергии комплексов  $K5$  и  $K6$  различаются незначительно ( $\Delta E_i^c \sim 2,8$  ккал/моль). В комплексе  $K5$  сближение активной частицы  $R^+$  с атомом  $N7$  до 4 А требует увеличения на  $3-5^\circ$  углов спирального вращения на участке  $G5-G7$  двойной спирали. С учетом различной реакционной способности к алкилированию оснований  $G$  и  $C$  оценка разности величин полных барьеров  $\Delta E_i^{\neq} \sim 1,8$  ккал/моль, т. е. вероятности алкилирования при  $\sim 300$  К  $C8, G5$  относятся как 20 : 1. Экспериментально на фрагменте одноцепочечной ДНК с несколько другой последовательностью оснований [28] получены вероятности алкилирования оснований  $C$  и  $G$  в положениях, соответствующих  $C8$  и  $G5$  в отношении 5 : 1.

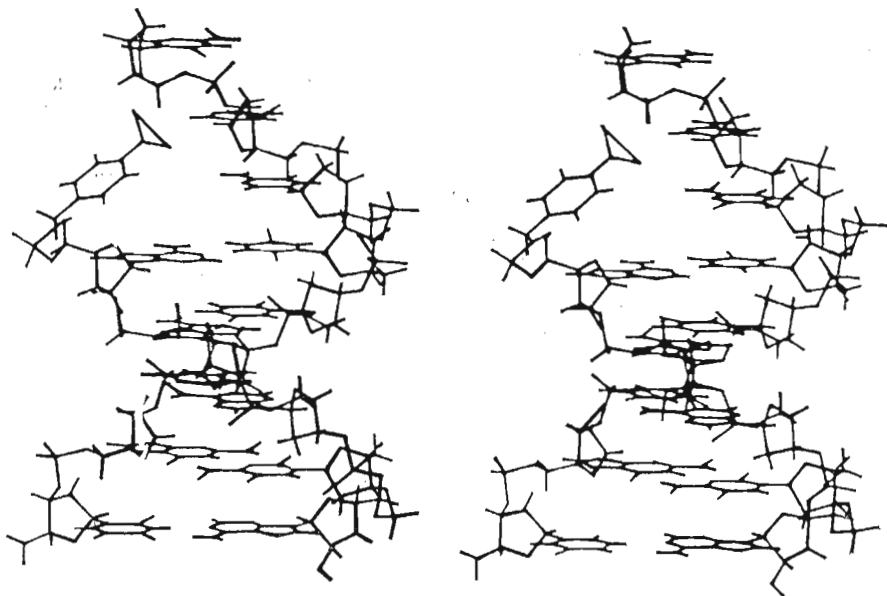


Рис. 7. Конформация T1, K6 комплементарного комплекса (III)

Алкилирование основания G4 в комплементарном комплексе (III) стерически возможно. Однако формирование ПВК алкилирования атома N7(G4) требует более существенных конформационных изменений в олигонуклеотиде адреса. В частности, так же как и в ПВК K5, увеличиваются углы спирального вращения на 3—5°, кроме того, ориентация основания относительно рибозы должна измениться с *анти*, характерной для В-формы, на *син*. Так как *син*-ориентация основания более напряженная (на 0,5—1 ккал/моль для пуринов и 1—2 ккал/моль для пиримидинов) по сравнению с *анти* [29, 30], вероятность алкилирования основания G4 ниже в 3—10 раз, чем G5. Из анализа также следует, что относительная вероятность алкилирования G4 по сравнению с G5 увеличивается, если первое основание с 5'-конца адреса пуриновое.

Обсудим результаты моделирования ПВК алкилирования НК мишени «вперед», в направлении 3'-конца. Был рассмотрен комплементарный комплекс (III) с последовательностью C6, C7, C8 на 3'-конце. Результаты расчета (табл. 2) свидетельствуют, что более оптимальной энергией обладают комплексы K6, K7, соответствующие алкилированию C7, C6. Напряжение в ПВК алкилирования C8 (K8) наибольшее. Следовательно, согласно расчетам, вероятности алкилирования C7, C7, C8 при 300 К относятся как 1 : 5 : 0,01. Строение комплекса K6 приведено на рис. 7.

Формирование ПВК K6 происходит практически без изменения оптимальной конформации цепочки C6, C7. Формирование ПВК K7 сопровождается увеличением угла спирального вращения на 7° на шаге T5-C6. Анализ строения ПВК алкилирования по N7 оснований G6, G7, G8 для комплементарного комплекса (IV) показал, что наименьшей энергией обладает ПВК алкилирования основания G6. Энергия ПВК алкилирования G7 повышается относительно величины  $E_i^c$  (G6) на 3 ккал/моль, а энергия ПВК алкилирования G8 увеличивается еще на 5 ккал/моль. Вероятности алкилирования G6, G7, G8 относятся 1 : 10<sup>-2</sup> : 10<sup>-4</sup>. Формирование ПВК алкилирования G6, G7, G8 сопровождается раскручиванием цепочки G5-G8 на угол 10—18° на каждом шаге.

Из экспериментальных данных по алкилированию «вперед» [28] следует отношение вероятностей алкилирования G6, G7, равное 1 : 0,2, и преимущественное (на порядок) алкилирование ближайшего основания C6 в НК-мишени с последовательностью C6, A7, G8.

## Заключение

Результаты моделирования конформаций ПВК приводят к следующим выводам. Комплементарные комплексы формируют энергетически оптимальные комплексы двух типов — Т1 и Т2, принципиально различающиеся конформацией 5'-алкилирующего реагента. Комплексы Т1 имеют ориентацию активной части реагента «вперед» в сторону 3'-конца мишени. Эти комплексы стабилизированы ван-дер-ваальсовыми взаимодействиями ( $\Delta E_v \approx -4$  ккал/моль), электростатическими ( $\Delta E_{el} \approx -3$  ккал/моль) и совокупностью гидратационных взаимодействий с водным растворителем ( $\Delta E_g = -2,5$  ккал/моль) относительно конформации Т0. Комплексы Т1 являются исходной стабильной конформацией для формирования ПВК алкилирования реакционноспособных центров оснований НК-мишени «вперед» в результате флуктуационных диффузионных движений активной части реагента.

Энергетически оптимальные комплексы типа Т2 характеризуются ориентацией активной части реагента «назад» в сторону 5'-конца НК-мишени. Алкилирующий 5'-реагент в комплексах Т2 уложен в большую бороздку двойной спирали комплементарного комплекса. Такая конформация комплекса сильно стабилизирована ван-дер-ваальсовыми взаимодействиями ( $\Delta E_v \approx -8$  ккал/моль), стабилизации электростатическими и гидратационными взаимодействиями практически не отличается от стабилизации комплексов Т1 ( $\Delta E_{el} \approx -2,5$ ,  $\Delta E_g \approx -3$  ккал/моль). Комплексы Т2 являются исходными долгоживущими состояниями, из которых формируются ПВК алкилирования «назад» сайтов НК-мишени.

Стабильность комплексов Т1 и Т2 исследована нами симуляцией флуктуационных движений реагента методом Монте-Карло [23]. Комплексы Т1 и Т2 являются накопителями долгоживущих конформаций 5'-реагента, «активных» для химической стадии процесса алкилирования. Далее, алкилирование сайта НК-мишени сопровождается дополнительной подстройкой относительных ориентаций активной частицы реагента и сайта мишени, что требует затрат дополнительной энергии напряжения.

Расположение 5'-реагента в малой бороздке двойной спирали и модификация пуринов НК-мишени по атомам N3 стерически запрещены. Самомодификация пуриновых олигонуклеотидов адреса в комплементарном комплексе по атомам N7 возможна только из сильно напряженных ПВК, энергия которых более чем на 10 ккал/моль превышает энергию ПВК алкилирования «вперед» и «назад».

Наиболее вероятно алкилирование «вперед» в сторону 3'-конца НК-мишени позиций +1, +2 неспаренных оснований, если ими являются основания С или G (последнее спаренное основание НК-мишени соответствует нулевой позиции). Вероятность алкилирования «вперед» более удаленных оснований существенно ниже (в 10 раз) для позиций +3. Образование ПВК алкилирования «вперед» по основаниям С в комплексе (III) сопровождается увеличением угла спирального вращения шага 0, +1 на  $7^\circ$ , а по основаниям G — в комплексе (IV) уменьшением угла спирального вращения на  $10-18^\circ$  на шагах 0, +1, +2.

С высокой вероятностью возможно алкилирование НК-мишени «назад» в направлении 5'-конца. Наиболее высокая вероятность алкилирования «назад» по атомам N7 оснований G в положениях -2 и -3. Алкилирование основания G в положении -2 сопровождается увеличением угла спирального вращения двойной спирали на  $5^\circ$  на каждом шаге (0, -1), (-1, -2). Алкилирование по положению -3 требует переориентации концевое основания адреса из *анти*- в *син*-конформацию, что сопровождается дополнительным напряжением комплекса. Вероятности алкилирования «вперед» и «назад» относятся как 20 : 1. Выводы о распределении вероятностей алкилирования различных сайтов НК-мишени в комплементарном комплексе с 5'-адресованным реагентом качественно соответствуют экспериментальным данным по алкилированию в ряде комплексов [27, 28] (см. табл. 3).

Необходимо отметить, что для эффективности алкилирования важна

## Относительные вероятности алкилирования оснований в комплементарных комплексах

Комплекс	Относительная вероятность алкилирования сайта					Ссылка
—5'-GGGTCACCT—	C(+1)	C(+2)	A(0)	G(-3)		[27]
—3'-CCCAGTR+	1,0	0,2	0,1	0,05		
—5'-AGAGGGTCAG—	G(+1)	G(0)	G(-1)	G(-3)		[27]
—3'-TCTCR+	1,0	0,3	0,1	0,02		
—5'-AAGAGGGTCAG—	C(+1)	G(-2)	G(-1)	G(+3)	G(-3)	[27]
—3'-TCTCCCAR+	1,0	0,22	0,1	0,07	0,03	
5'-TGTTTGGC	C(+1)	G(-2)	G(-1)			[28]
3'-ACAAAACCR+	1,0	0,1	0,1			
5'-TGTTTGGC	C(+1)	G(-1)	G(-2)			Расчет
3'-ACAAAACCR+	1,0	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>			
5'-TGTGGGGC	C(+1)	G(-2)	G(-3)			»
3'-ACAACCCCR+	1,0	0,05	0,001			
5'-TGTTTCCC	C(+1)	C(+2)	C(+3)			»
3'-ACAAAR+	1,0	1,0	0,001			
5'-TGTGGGG	G(+1)	G(+2)	G(+3)			»
3'-ACAAAR+	1,0	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-4</sup>			»

не только энергия напряжения ПВК, но и его конформационная удаленность от долгоживущих конформаций накопителей T1, T2, в которых в основном и находится комплекс. Конформационная удаленность ПВК определяет время перехода активной группы реагента в химически активную позицию, и, следовательно, вероятность столкновения активной группы реагента с молекулами воды или другими нуклеофилами буфера и понижает способность алкилирования сайта. Конформации T1 хорошо структурно соответствуют конформациям ПВК для алкилирования НК-мишени «вперед», наибольшее соответствие наблюдается с ПВК алкилирования C8 в дуплексе (I) или C6, C7 в дуплексе (III). Меньшее соответствие наблюдается с ПВК алкилирования G6 в дуплексе (IV). Конформации ПВК для алкилирования «назад» оснований G5, G6 в дуплексе (II) значительно структурно удалены от своей конформации накопителя T2, расстояние между атомами N7 (G5)—N(R<sup>+</sup>) более 7 Å. Поэтому расчеты позволяют сделать вывод, что вероятность алкилирования «вперед» выше, чем алкилирования «назад» по причине большего структурного соответствия ПВК конформациям накопителей.

Автор выражает благодарность О. С. Федоровой за консультации и полезные замечания.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Knorre D. G., Vlasov V. V. Affinity Modification of Biopolymers. Boca Raton: CRC Press, 1988.
2. Knorre D. G., Vlasov V. V., Zarytova V. F., Lebedev A. V. // Soviet Scientific Reviews, Section B: Chemistry Reviews. V. 10 / Ed. M. E. Vol'pin. Harwood: Acad. Publ., 1988.
3. Knorre D. G., Vlasov V. V. // Progr. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol. 1985. V. 32. P. 292—320.
4. Воробьев Ю. И. // Молекулярн. биология. 1989. Т. 23. № 2. С. 545—555.
5. Воробьев Ю. И. // Молекулярн. биология. 1989. Т. 23. № 1. С. 80—92.
6. Воробьев Ю. И. // Молекулярн. биология. 1989. Т. 23. № 6.
7. Rao S. N., Singh U. C., Kollman P. A. // J. Amer. Chem. Soc. 1986. V. 108. № 8. P. 2058—2068.
8. Lavery R., Sklenar H., Pullman B. // J. Biomol. Str. Dyn. 1986. V. 3. № 5. P. 1015—1031.
9. Taylor E. R., Miller K. J. // Biopolymers. 1984. V. 23. № 12. P. 2853—2878.
10. Weiner P. K., Kollman P. A. // J. Comput. Chem. 1981. V. 2. N. 2. P. 287—307.
11. Weiner S. J., Kollman P. A., Case D. A. et al. // J. Amer. Chem. Soc. 1984. V. 106. № 3. P. 765—784.
12. Singh U. C., Brown F. K., Bash P. A., Kollman P. A. // J. Amer. Chem. Soc. 1987. V. 109. № 6. P. 1607—1613.
13. Gilson M. K., Honig B. H. // Proteins. 1988. V. 3. № 1. P. 32—52.
14. Knorre D. G., Chimitova T. A. // FEBS Lett. 1981. V. 131. № 1. P. 249—254.

15. Кантор Ч., Шиммель П. Биофизическая химия. Т. 3. М.: Мир, 1985.
16. Кюрре Д. Г., Чимитова Т. А. // Молекулярн. биология. 1978. Т. 12. № 4. С. 814—820.
17. Weiner S. J., Singh U. C., Kollman P. A. // J. Amer. Chem. Soc. 1985. V. 107. № 8. P. 2249—2229.
18. Madura J. D., Jorgensen W. L. // J. Amer. Chem. Soc. 1986. V. 108. № 9. P. 2517—2526.
19. Беликова А. М., Гринева И. И., Карпова Г. И. // Изв. СО АН СССР. Сер. хим. наук. 1970. В. 6. № 1. С. 110—116.
20. Воробьев Ю. Н. // Молекулярн. биология. 1989. Т. 23. № 6.
21. Howell J. M. // Stud. Univ. Babeş-Bolyai, Chem. 1970. V. 15. № 1. P. 87—98.
22. Химмельблау Д. Прикладное нелинейное программирование. М.: Мир, 1975.
23. Metropolis N., Rosenbluth A. W., Teller A. H. // J. Chem. Phys. 1953. V. 21. № 4. P. 1087—1096.
24. Breslawer K. J., Frank R., Blocker H., Marky L. A. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. № 11. P. 3746—3750.
25. Frier S. M., Kierzek R. et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. № 24. P. 9373—9377.
26. Гринева И. И., Мызина С. Д. // Молекулярн. биология. 1975. Т. 9. № 4. С. 502—508.
27. Зарьтова В. Ф., Кутявин И. А., Подымигогин М. В. и др. // Биоорг. химия. 1987. Т. 13. № 9. С. 1212—1219.
28. Бросалина Б. Е., Власов В. В., Кутявин И. В. и др. // Биоорг. химия. 1986. Т. 12. № 2. С. 240—247.
29. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот. М.: Мир, 1987.
30. Воробьев Ю. Н. // Молекулярн. биология. 1983. Т. 17. № 1. С. 181—191.

Поступила в редакцию  
28.XII.1988

STUDY OF STRUCTURAL AND ENERGETICAL ASPECTS  
OF COMPLEMENTARY ADDRESSED MODIFICATION OF NUCLEIC ACIDS  
BY METHOD OF MOLECULAR MECHANICS. CONFORMATIONAL ABILITIES  
OF ALKYLATION BY 4-[N-(2-CHLOROETHYL), N-METHYL]  
AMINOBENZYL-5'-PHOSPHOAMIDE OLIGONUCLEOTIDE DERIVATIVES

VOROBYEV Yu. N.

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian  
Division of the Academy of Sciences of the USSR*

A method of modelling of structural and energetical aspects of complementary addressed modification of nucleic acids (NA) by means of molecular mechanics is developed. Calculation of conformational energy of NA complexes take into account the effect of environmental solvents on the properties of molecule with the help of original approximation of the solvent's statistical model.

Relative reactivities of the oligonucleotide derivatives carrying 4-[N-(2-chloroethyl), N-methyl]aminobenzyl groups at the 5'-terminal phosphates in the addressed modification of target NA are calculated. Complexes of target NA with addressed alkylating reagents (NAR) proved to have only two principal optimal conformations T1, T2 serving as stores of states for the formation of reactive conformations. The reagent's active group is oriented along the 3'-end of the target NA in T1 conformation, whereas in T2 conformation its orientation is opposite to that in T1 and along the 5'-end of the target NA. Correspondence of T1 and T2 to the reactive conformations of the NAR complexes determines the effectiveness of alkylations and the reactivity toward the buffer nucleophyle. The result of the model calculations qualitatively agree with experimental observations on the position selectivity of alkylation.