



УДК 577.113.4 : 541.124

© 1990 г.

*Н. Г. Долиная, А. В. Цытович, В. Н. Сергеев,
М. Н. Герцюк*, Э. А. Шабарова*

ХИМИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ В ДВУСПИРАЛЬНЫХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТАХ

Х. КИНЕТИКА КОНДЕНСАЦИИ ОЛИГОМЕРОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ СИНТЕТИЧЕСКИХ ВОДОРАСТВОРИМЫХ КАРБОДИМИДОВ

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
химический факультет;*

** Институт биоорганической химии АН УССР, Киев*

Рассмотрен структурно-кинетический аспект химического лигирования олигонуклеотидов в составе двуспиральных комплексов. При изучении реакционной способности 11 синтетических водорастворимых карбодимидов обнаружено сильное влияние заместителей у атомов N1 и N3 на скорость реакции. Показано, что в реакциях химического лигирования участвует линейная форма карбодимида. С помощью модельных систем оденена величина константы скорости активации фосфатной группы. Высказано предположение о том, что отношение кинетических констант реакции активированного производного по продуктивному и непродуктивному пути является характеристикой, отражающей конформацию реакционного узла. Показано, что этот параметр в одном и том же дуплексе практически не зависит от строения конденсирующего реагента.

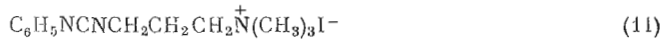
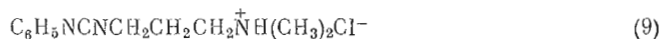
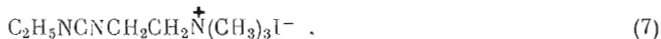
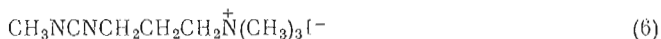
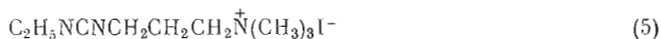
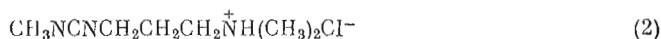
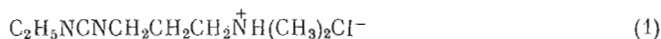
Интерес к химическим реакциям в пространственно организованных нуклеотидных системах, стимулированный работами по аутосплайсингу и ауторасщеплению РНК, в последние годы резко возрастает. К реакциям такого класса относится химическое лигирование (ХЛ) — ковалентное соединение олигонуклеотидных блоков на комплементарной матрице под действием химических реагентов. Изучение закономерностей ХЛ, поиск новых типов реагентов, активирующих концевую фосфатную группу олигонуклеотидов в водной среде, активно ведется в Московском университете [1]. Подобные исследования, лежащие на стыке ряда научных областей, таких, как органическая химия дуплексов нуклеиновых кислот, моделирование ферментативных систем и процессов, пребиотический синтез нуклеиновых кислот, позволяют получить важную информацию о реакционной способности и структуре этих биополимеров. Кроме того, эти исследования весьма перспективны и с точки зрения разработки неэнзиматических методов сборки протяженных двуспиральных ДНК, в том числе и с заданными модификациями.

Очевидно, что эффективность ХЛ будет связана со структурными факторами, т. е. с взаимным расположением активированных реагирующих групп в составе двойной спирали. Ранее в работах, посвященных изучению ХЛ под действием водорастворимого карбодимида (CDI) в коротких ДНК-дуплексах с одним участком лигирования, было показано, что локальное изменение структуры вблизи одноцепочечного разрыва, вызванное, например, наличием некомплемтарной пары или модифицированного остатка сахара, сильно влияет на скорость реакции [2]. Полученные результаты подтвердили определенную заторможенность реагирующих нуклеотидных звеньев в дуплексе, а также способность ХЛ дискриминировать отклонение их конформации от канонической.

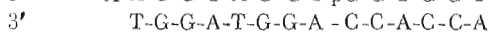
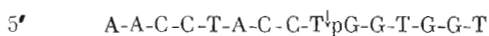
Сокращения: ХЛ — химическое лигирование, CDI — водорастворимый карбодимид.

В настоящем цикле работ сделана попытка определить взаимосвязь между кинетическими параметрами ХЛ и структурой реакционного узла. Для этого был введен параметр, представляющий собой отношение констант скоростей отдельных стадий реакции, величина которого обусловлена степенью сближения и ориентацией реагирующих групп. Предполагается, что этот параметр при неизменной структуре узла «сшивания» не должен зависеть от природы конденсирующего реагента. С другой стороны, он должен сильно меняться при изменении локальной структуры ДНК в месте одноцепочечного разрыва. Подобный структурно-кинетический подход позволит, на наш взгляд, на основании данных по ХЛ получить информацию о структурных особенностях нуклеотидных звеньев, в том числе и со структурными аномалиями, внутри двойной спирали.

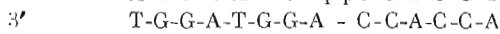
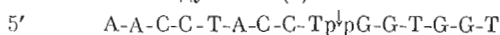
В первой работе этого цикла для характеристики структурных факторов, влияющих на кинетику ХЛ, варьировали строение химического реагента. Были использованы следующие специально синтезированные CDI, различающиеся природой заместителей при атомах N1 и N3:



Синтез и некоторые свойства этой серии соединений описаны в работе [3]. В качестве «субстратов» были использованы ранее изученные [4] ДНК-дуплексы (I) (синтез фосфодиэфирной связи) и (Ia) * (синтез пирофосфатной связи):



дуплекс (I)



дуплекс (Ia)

Существенно, что первичные структуры этих дуплексов одинаковы; они различаются только строением узла лигирования.

На основании полученных кинетических данных рассчитаны «структурные инварианты» дуплексов (I) и (Ia) для реагентов различного строения. Предварительно дано теоретическое описание кинетики конденсации двух олигонуклеотидов на комплементарной матрице. Проанализирована возможность определения констант скоростей отдельных стадий реакции и правомерность принятых допущений.

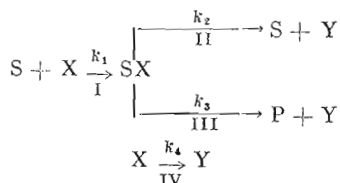
Кинетическое описание химического лигирования

Полное кинетическое описание матричных реакций под действием конденсирующих реагентов возможно только при использовании ряда допущений, позволяющих значительно упростить задачу. Общая кинетиче-

* Символ «d» здесь опущен; стрелка указывает место стыка олигонуклеотидных блоков.

ская схема ХЛ, индуцированного CDI, в приложении к конденсации гомоолигомеров в составе трехспирального комплекса была предложена С. Г. Поповым с соавт. [5]. Следует отметить, что такие олигомер-полимерные комплексы с нерегулярной взаимной ориентацией конденсируемых блоков оказались сложными и неадекватными моделями для характеристики матрично-зависимых процессов. Рассматриваемые нами ДНК-дуплексы (I) и (Ia) гетерогенного состава с одним одноцепочечным разрывом представляют гораздо более удачную модель, допускающую количественную интерпретацию экспериментальных данных. В нашем теоретическом рассмотрении мы положили за основу кинетическую схему С. Г. Попова (схема 1)

Схема 1



где S — двуспиральный комплекс с разрывом в одной из цепей, P — продукт конденсации (двуспиральный «сшитый» комплекс), X — активирующий агент, Y — продукт гидратации активирующего агента, SX — активированный аддукт.

При составлении схемы были сделаны следующие допущения:

1) в условиях реакции комплекс рассматривается как совершенная спираль; 2) реакции II (гидратация активированного аддукта) и IV (гидратация активирующего реагента) считаются реакциями псевдопервого порядка; 3) не учитывается модификация оснований олигонуклеотидов, входящих в состав комплекса; 4) считается, что межнуклеотидная связь не оказывает каталитического влияния на гидратацию активирующего реагента.

Данной схеме соответствует система из пяти уравнений, полное решение которой в аналитическом виде невозможно без введения дополнительных допущений. Рассмотрим один из возможных вариантов, когда скорость лимитирующими являются стадии I и IV, т. е. реакции с нуклеофилами. В таком случае концентрацию активированного аддукта, SX, можно считать квазистационарной. Кроме того, предполагается, что $k_1 [S] \ll \ll k_4$. На основании кинетических уравнений, преобразованных с учетом этих допущений, в работе [5] выведено уравнение, связывающее концентрацию реагирующих веществ с константами скоростей отдельных стадий реакции:

$$\ln \frac{[S]_0}{[S]} = \frac{k_1 [X]_0}{k_4} \cdot \frac{k_3}{(k_2 + k_3)} (1 - e^{-k_4 t}). \quad (1)$$

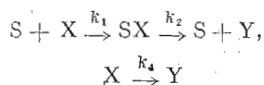
Скорость накопления продукта ХЛ определяется как соотношением $k_1 [S]$ и k_4 (это соотношение показывает, какая часть реагента расходуется на активацию фосфатной группы олигонуклеотида в дуэлексе по отношению к его количеству, которое подвергается гидратации), так и соотношением констант k_2 и k_3 , характеризующим долю активированного аддукта, SX, распадающегося по продуктивному пути.

Рассмотрим возможность определения констант скорости отдельных стадий ХЛ. k_4 определяется в независимом опыте. Константу скорости образования активированного аддукта (k_1) можно определить с помощью модельных систем, например мононуклеотида или фосфорилированного олигонуклеотида, фосфатная группа в которых не претерпевает дальнейших превращений. Использование таких простых модельных систем диктуется необходимостью создавать достаточно большую концентрацию нуклеотидного материала (S), чтобы на фоне собственной гидратации активирующего реагента (X) можно было вычлениить с достаточной точностью долю X, расходуемую на гидратацию, катализируемую фосфат-ионом. Следует отметить, что при интерпретации полученных данных необходимо

учитывать неадекватность моделирования структур типа дуплекса (I) мононуклеотидом. При использовании такой модели игнорируется, во-первых, экранирующее влияние дуплекса, а во-вторых, возможный полианионный эффект, что может значительно изменить локальную концентрацию реагента вблизи активируемой фосфомоноэфирной группы. Кроме того, не учитывается возможное каталитическое влияние на гидратацию реагента межнуклеотидного фосфата. Наиболее подходящей моделью для определения k_1 мог бы служить ДНК-дуплекс типа (I), содержащий в реакционном центре дидезоксианалог концевой акцепторного звена, т. е. нуклеотидный остаток без гидроксильных групп.

Общая схема реакции при использовании модельных систем упрощается (схема 2):

Схема 2



где S — моно- или олигонуклеотид с фосфомоноэфирной группой, X — активирующий агент, Y — продукт гидратации активирующего агента, SX — активированный аддукт.

Решение уравнений, соответствующих этой схеме, при условии, что лимитирующей является стадия образования аддукта, приводит к выражению

$$k_1[S]_0 + k_4 = \frac{1}{t} \ln \frac{[X]_0}{[X]}$$

Таким образом, зная тангенс угла наклона (α) прямой на графике в координатах $\ln [X] - t$, можно определить константу скорости образования активированного аддукта по формуле

$$k_1 = \frac{k^* - k_4}{[S]_0},$$

где $k^* = \operatorname{tg} \alpha$.

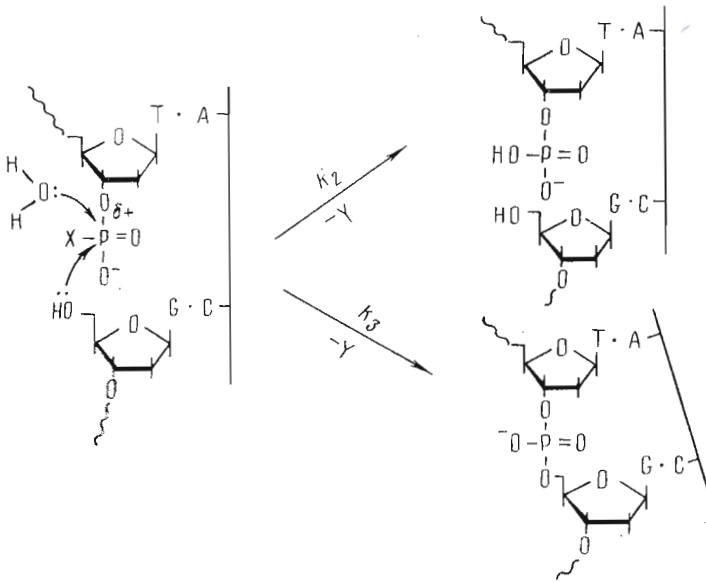
В пределах принятых допущений (лимитирующая стадия — образование SX) определить абсолютные значения констант скорости распада активированного аддукта (k_2 и k_3) невозможно. Однако, используя преобразованное уравнение (1)

$$\ln \frac{[S]_0 - [P]}{[S]_0} = \frac{k_3}{k_2 + k_3} \cdot \frac{k_1}{k_4} [X]_0 \cdot (e^{-k_4 t} - 1), \quad (2)$$

по тангенсу угла наклона прямой в координатах $\ln (([S]_0 - [P])/[S]_0) - \frac{1}{k_4} [X]_0 (e^{-k_4 t} - 1)$ можно определить эффективную константу скорости реакции химического лигирования $k_3 k_1 / (k_2 + k_3)$. Зная k_1 , легко рассчитать соотношение $k_3 / (k_2 + k_3)$, характеризующее долю активированного аддукта, распадающегося с образованием продукта ХЛ.

Проанализируем факторы, влияющие на это соотношение. В процессе распада SX (схемы 1, 3) активированный фосфат может участвовать в двух конкурирующих реакциях — с гидроксильной группой соседнего олигонуклеотида и с молекулой воды.

Очевидно, что значения k_2 и k_3 пропорциональны частичному положительному заряду на атоме фосфора и нуклеофильности реагирующих групп. При использовании различных конденсирующих реагентов абсолютные значения констант будут меняться, но если реакционная способность атакующих групп неизменна и не происходит существенных искажений в структуре узла «сшивания» соотношение констант $k_3 / (k_2 + k_3)$ для данного комплекса будет оставаться постоянным.



Результаты и обсуждение

Для получения кинетических параметров ХЛ использовали содержащие одноцепочечный разрыв ДНК-дуплексы (I) и (Ia), а в качестве конденсирующих реагентов — набор CDI (1)–(11). Донорами фосфатных групп, моделирующими системы для ХЛ, служили рdA, d(AAAAр), а также d(AAAA) (для оценки влияния межнуклеотидных фосфатов). За изменением концентрации веществ следили методом отбора проб: за превращением CDI — спектрофотометрически с применением количественной цветной реакции на $-N=C=N$ -группировку [6], за превращением олигонуклеотидов — электрофорезом в 20% ПААГ, используя ^{32}P -меченые олигонуклеотиды. Первичная структура продуктов химического лигирования подтверждена анализом по Максаму — Гилберту, природа образовавшейся пирофосфатной связи (дуплекс (Ia)) доказана ее селективным расщеплением, как описано в работе [7].

Прежде всего приведем экспериментальные данные, подтверждающие правомочность допущений, сделанных при составлении кинетического описания ХЛ.

1. Анализ кривых плавления дуплексов (I) и (Ia) в условиях ХЛ показал, что при температуре $< 10^\circ\text{C}$ можно пренебречь количеством неспаренных молекул. Температуры плавления дуплексов (I) и (Ia) равны $35,0$ и $34,5^\circ\text{C}$ соответственно, CDI в используемых для ХЛ концентрациях понижает температуру плавления нуклеотидных комплексов лишь на несколько градусов, причем дестабилизирующий эффект тем слабее, чем выше содержание G·C-пар [8].

2. Кинетические кривые гидратации CDI (1)–(11) хорошо линеаризуются в координатах $\ln [X] \div t$ [3], что подтверждает сделанное предположение о псевдопервом порядке реакции.

3. При проведении ХЛ в условиях устойчивости двойной спирали модификация нуклеотидного материала CDI (1) незначительна [2]. Отметим, что при использовании карбодимидов другого строения, особенно CDI (5)–(8), образование продуктов реакции сопровождается заметной модификацией целевого олигонуклеотида (на 10–20%).

4. В отличие от реакций в органических растворителях, где CDI расходуется и на взаимодействие с межнуклеотидным фосфатом [9], в водной среде нам не удалось обнаружить заметного влияния фосфодиэфирных групп на гидратацию CDI. Так, в присутствии $5 \cdot 10^{-4}$ М (на мономер)

CDI	0° С			
	$k_4 \cdot 10^2, \text{ч}^{-1}$	$k_1, \text{M}^{-1} \text{ч}^{-1}$	$\frac{k_1 k_3^{**}}{(k_2 + k_3)}$	$\frac{k_3^{**}}{(k_2 + k_3)}$
(1)	0,19±0,03	3,6±1,0	0,64±0,02	0,17±0,03
(2)	0,12±0,02	4,2±0,9	0,66±0,12	0,15±0,03
(5)	4,8±0,3	—	1,33±0,14	—
(6)	8,6±1,0	—	1,8±0,5	—
(7)	1,3±0,1	6,1±3,1	0,37±0,04	0,06±0,04
(8)	2,0±0,3	—	0,68±0,06	—

* Значения k_1 и k_4 взяты из работы [3].

** Синтез пирофосфатной связи в дуплексе (Ia) (условия в «Экспер. части»); приведены узле.

*** Синтез фосфодиэфирной связи в дуплексе (I). Условия в «Экспер. части».

d(AAAA) кривая гидратации CDI (1) практически совпадает с контрольной кривой, полученной в 0,05 M MES (буфер А). Скорости взаимодействия CDI (1) с 3'- и 5'-концевой фосфатной группой примерно равны. Об этом свидетельствует близость величин k_1 , определенных в буфере А, содержащем рdА или d(AAAAp), —3,2 и 3,3 $\text{ч}^{-1}\text{M}^{-1}$ соответственно.

Интересно, что в условиях ХЛ доля CDI (1), расходуемая на образование межнуклеотидной связи и на катализируемую фосфомоноэфирной группой гидратацию, ничтожно мала по сравнению с долей, расходуемой на некаталитическую гидратацию ($k_1 [\text{S}] \ll k_4$). Это было доказано в параллельных экспериментах, в которых следили за изменением концентрации CDI в присутствии и в отсутствие лигируемого дуплекса.

Кинетический анализ данных, полученных с использованием набора карбодимидов различного строения позволит, с одной стороны, выявить зависимость эффективности ХЛ от строения конденсирующего реагента, а с другой — оценить правомерность предположения о том, что соотношение констант $k_3/(k_2 + k_3)$ мало зависит от природы реагента.

При конструировании серии CDI (1)—(11) исходили из следующих соображений. Из литературных данных известна способность CDI (1) претерпевать в водных растворах таутомерное превращение в циклическую форму [10]. Внесенные нами структурные изменения — уменьшение размера цикла (за счет уменьшения числа метиленовых звеньев в заместителе при атоме N3), блокирование возможности образования цикла при замене третичного амина на остаток четвертичного — позволяют выявить роль обеих таутомерных форм в реакциях ХЛ. При наличии фенильного заместителя в CDI мы надеялись легко варьировать их реакционную способность, вводя электронодонорные или электроноакцепторные заместители в бензольное кольцо. Способность этих соединений к кольчаточной таутомерии и константы гидратации в отсутствие и присутствии донора фосфата — мононуклеотида — представлены в работе [3].

Анализ полученных результатов позволяет выявить следующие закономерности. CDI, содержащие два метиленовых звена вместо трех и концевую третичную аминогруппу, склонны к образованию прочного пятичленного цикла, затрудняющего взаимодействие соединений с нуклеофилами. CDI с четвертичной аммониевой группой существуют в водном буферном растворе исключительно в линейной форме. Введение фенильных радикалов резко ухудшает растворимость веществ в водных средах и делает их непригодными для использования в качестве конденсирующих агентов. Реакционноспособной формой CDI является линейная форма. Для таких короткоживущих в буфере А соединений (CDI (5), (6) и (8)) точное значение k_1 определить не удастся, так как на фоне быстрой собственной гидратации трудно достоверно вычленить составляющую, соответствующую взаимодействию CDI с фосфатной группой мононуклеотида (в статье [3] константе k_1 соответствует константа k_2 , а константе k_4 — константа k_1). Значения k_1 и k_4 для некоторых CDI, наиболее перспективных в качестве реагентов для ХЛ, приведены в таблице.

10° С			
$k_1 \cdot 10^2, \text{ч}^{-1}$	$k_1, \text{M}^{-1} \text{ч}^{-1}$	$\frac{k_1 k_3^{***}}{(k_2 + k_3)}$	$\frac{k_3^{***}}{(k_2 + k_3)}$
0,55±0,05	8,4±1,7	0,038±0,007	0,0046±0,0007
0,41±0,06	9,5±2,3	0,044±0,004	0,0046±0,0007
13,1±0,7	—	—	—
17,3±1,1	—	—	—
3,6±0,3	14,2±6,2	0,054±0,008	0,0038±0,0015
4,9±0,4	—	—	—

значения соотношения констант в расчете на одну фосфомоноэфирную группу в реакционном

В первую очередь активность СДИ оценивали по способности образовывать пирофосфатную связь в дуплексе (Ia). Выбор дуплекса (Ia) в качестве тест-системы объясняется высокой скоростью протекания реакции: как показано для СДИ (1) количественный выход продукта достигается через 24 ч инкубации. Это ускоряет и облегчает «отбраковку» СДИ по их активности.

Как видно из рис. 1, СДИ (3), (4), (9) и (10), а также СДИ (11) оказались неэффективны в реакциях ХЛ. Полученные результаты хорошо согласуются с общими закономерностями влияния структуры этих соединений на их реакционную способность. В реакцию ХЛ практически не вступают СДИ, образующие прочный пятичленный цикл (СДИ (3), (4)), а также фенилсодержащие СДИ (кроме плохой растворимости низкая активность этих СДИ может быть связана с внутримолекулярным сопряжением двойных связей —N=C=N-группировки и бензольного кольца). Для остальных СДИ получены кинетические кривые накопления продукта ХЛ с пирофосфатной связью (рис. 2). Следует отметить, что за стандартное время реакции (6 ч) даже самые активные конденсирующие реагенты подвергаются гидратации лишь на 20—40% (рис. 2).

Представленные на гистограмме (рис. 3) относительные эффективные константы скорости реакции (абсолютные значения эффективных констант приведены в таблице) позволяют оценить относительную реакционную способность различных СДИ. Параллельно приведены данные, отражающие скорость гидратации этих же СДИ в условиях ХЛ. Для нециклизующихся СДИ (5)—(8) видна однозначная корреляция между скоростью образования пирофосфатной связи и скоростью гидратации. Можно отметить следующую закономерность изменения реакционной способности в зависимости от строения СДИ: увеличение числа метиленовых звеньев между карбодимидной и четвертичной аммониевой группировками приводит к возрастанию кинетических констант (ср. СДИ (7) и (5), (8) и (6)). Аналогичный результат наблюдается при замене этильной группы — заместителя при N1 — на метильную (СДИ (5) и (6), (7) и (8)). При переходе от нециклизующихся к циклизующимся СДИ соотношение сравниваемых величин резко меняется: в то время как для СДИ (2), (1), (7) и (8) эффективные константы скорости «сшивания» — близкие величины (рис. 3), константа скорости гидратации СДИ (2) и (1) (для которых характерно образование цикла) существенно ниже, чем для линейных аналогов — СДИ (7) и (8). По-видимому, более сильный, чем компоненты буфера А, нуклеофил — фосфомоноэфирная группа олигонуклеотида — нивелирует разницу в реакционной способности СДИ сравниваемой группы.

Подтверждением этому служат кинетические данные, полученные при изучении взаимодействия СДИ (1), (2) и (7) с рdА, моделирующим систему для ХЛ [3]. Оказалось, что константы скорости реакции этих СДИ с фосфатной группой мононуклеотида при 0° С примерно равны: 3,6 ± 1,0 для СДИ (1), 4,2 ± 0,9 для СДИ (2) и 6,1 ± 3,1 M⁻¹ ч⁻¹ для СДИ (7). Для

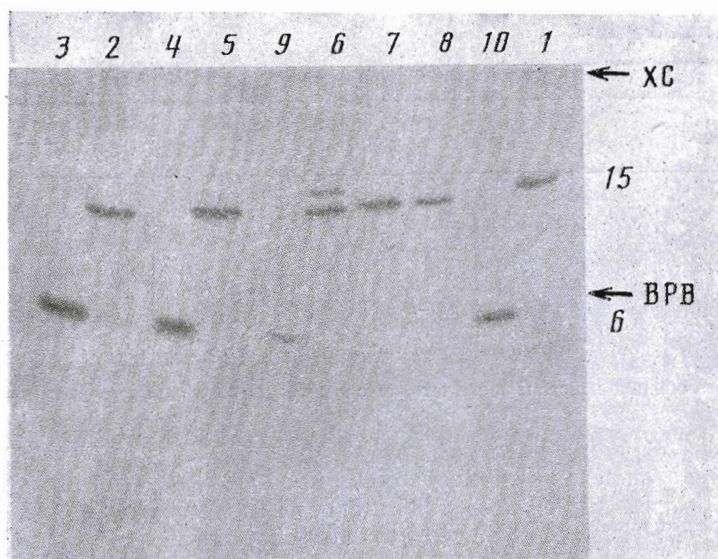


Рис. 1. Радиоавтограмма электрофореза в 20% ПААГ реакционных смесей, содержащих дуплекс (Ia) после 24 ч инкубации в буфере А при 0° С в присутствии 0,1 М СДИ различного строения. Номер дорожки соответствует номеру СДИ. Стрелками указано положение маркеров: бромфенолового синего (BPB) и ксиленианола FF (XC). Цифры сбоку обозначают длину олигонуклеотида

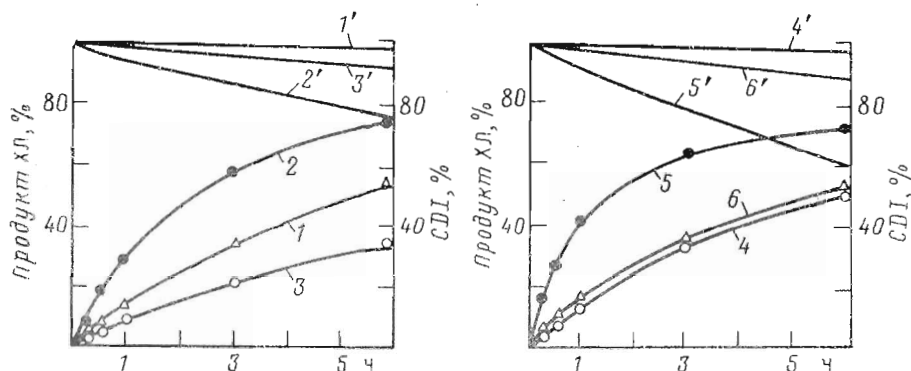


Рис. 2. Кривые накопления продукта ХЛ в дуплексе (Ia) под действием СДИ: 1 — (1), 2 — (5), 3 — (7), 4 — (2), 5 — (6), 6 — (8). Кривые гидратации соответствующих СДИ при 0° С в буфере А: 1' — (1), 2' — (5), 3' — (7), 4' — (2), 5' — (6), 6' — (8). Условия реакции и методы определения концентрации веществ см. в «Экспер. части»

короткоживущих в буфере А СДИ (5), (6) и (8) значение k_1 достоверно определить невозможно [3].

Эта же группа СДИ была использована в качестве конденсирующих реагентов при синтезе фосфодиэфирной связи в дуплексе (I) (рис. 4). Как и ожидалось, в случае линейных СДИ (5)—(8) из-за быстрой гидратации в условиях реакции эффективность образования межнуклеотидной связи оказалась низкой. Так, для наиболее активного СДИ уже через 1 сут наблюдается выход кривой накопления продукта на плато, поскольку за это время конденсирующий реагент распался более чем на 80% (рис. 5). Кроме того, активные СДИ (5)—(8) вызывают существенную модификацию нуклеотидного материала (дополнительные полосы на автордиограмме, рис. 4). Наиболее эффективными в реакциях ХЛ (образование фосфодиэфирной связи) оказались менее реакционноспособные, но более «долгоживущие» в реакционной смеси СДИ (1) и (2).

Данные по кинетике накопления продукта ХЛ в дуплексах (I) и (Ia) под действием СДИ (1), (2), (5)—(8) позволили определить эффективную константу реакции, $k_1 k_3 / (k_2 + k_3)$ (значения приведены в таблице). Ли-

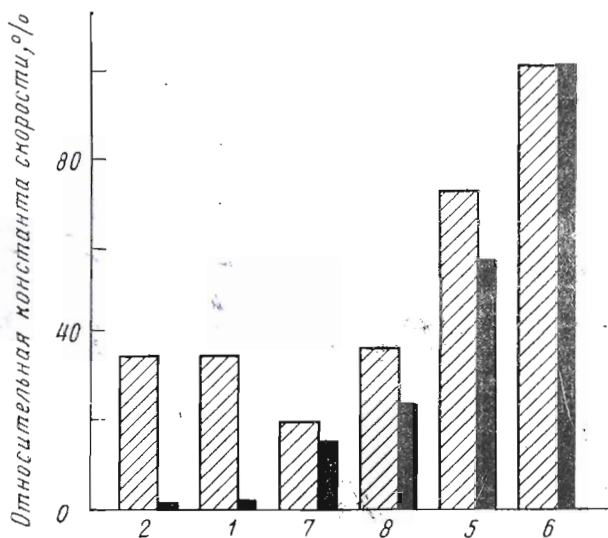


Рис. 3. Изменение эффективных констант скорости образования продукта ХЛ в дуплексе (Ia), $k_3k_1/(k_2 + k_3)$ (заштрихованные столбик) и констант скорости гидратации соответствующих CDI (черные столбик) в зависимости от природы CDI. Цифры внизу соответствуют номеру CDI. За 100% принята константа скорости для CDI (6)

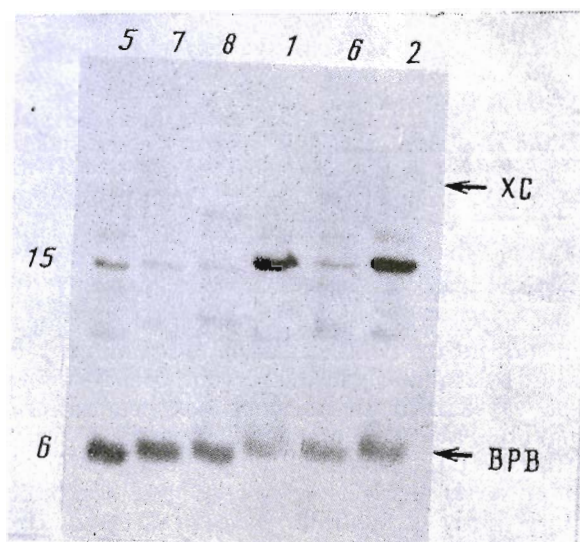


Рис. 4. Радиоавтограмма электрофореза в 20% ПААГ реакционных смесей содержащих дуплекс (I), после 5 сут инкубации в буфере А при 10° С в присутствии 0,2 М раствора CDI различного строения. Обозначения как на рис. 1

неаризация кривых указывает на адекватность рассмотренной кинетической схемы. Оценить величину соотношения констант $k_3/(k_2 + k_3)$ оказалось возможным только для CDI (1), (2) и (7), для которых достоверно определена константа скорости образования активированного аддукта (k_1). В качестве примера на рис. 6 представлены линейные анаморфозы кривых накопления продукта ХЛ в дуплексе (I) (в результате реакции образуется фосфодиэфирная связь). В случае дуплекса (Ia) (образование пирофосфатной связи) учитывали наличие в реакционном узле двух фосфатных групп. Поэтому для корректного сравнения данных в двух сериях экспериментов полученное из линейных анаморфоз значение $k_3/(k_2 + k_3)$ делили пополам. Результаты суммированы в таблице.

Анализ полученных данных позволяет сделать следующие выводы.

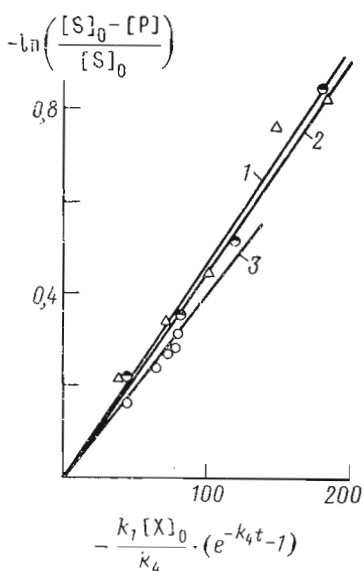
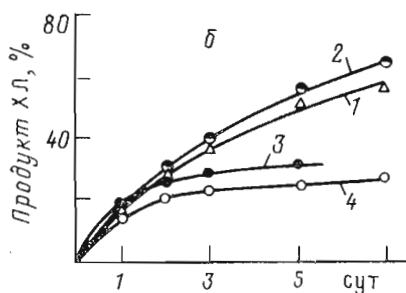
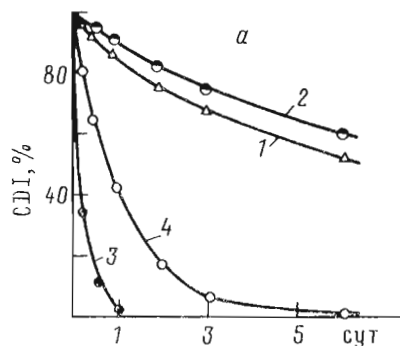


Рис. 5. а — кривые гидратации СДИ различного строения при 10° С в буфере А: 1 — (1), 2 — (2), 3 — (6), 4 — (7). б — кривые накопления продукта ХЛ в дуплексе (I) под действием СДИ: 1 — (1), 2 — (2), 3 — (6), 4 — (7). Условия реакции и методы определения концентрации веществ см. в «Экспер. части»

Рис. 6. Линейные анаморфозы кривых накопления продукта ХЛ в дуплексе (I) под действием СДИ: 1 — (1), 2 — (2), 3 — (7)

1. Налицо явная взаимосвязь между строением СДИ (и связанной с ним способностью переходить в циклическую форму), природой заместителя при N1 и числом метиленовых звеньев, с одной стороны, и кинетическими параметрами реакций с участием этих СДИ — константами скорости гидратации и эффективными константами реакции ХЛ — с другой.

2. Значения $k_3/(k_2 + k_3)$ для одного и того же дуплекса, но разных СДИ близки (учитывая большую ошибку при определении k_1 для СДИ (7)): ~0,004 для дуплекса (I) — образование фосфодизэфирной связи; ~0,13 для дуплекса (Ia) — образование пиррофосфатной связи. Это подтверждает предположение, сделанное нами при теоретическом описании кинетики реакции ХЛ: соотношение констант, характеризующее распад активированного аддукта по продуктивному и непродуктивному пути, мало зависит от природы активизирующего реагента и может служить инвариантом данного дуплекса. Очевидно, что это справедливо только в том случае, когда активное производное по фосфатной группе олигонуклеотида не нарушает структуры реакционного узла.

3. Лишь незначительная часть водорастворимого СДИ расходуется на активацию фосфомоноэфирных групп: ~7% для способных к циклизации СДИ (СДИ (2) и (1)) и 1,3% для нециклизуемых СДИ (СДИ (7)). Значения приведены для начального момента реакции, когда концентрация фосфомоноэфирных групп максимальна. В процессе ХЛ с образованием пиррофосфатной связи ~13% активированного аддукта распадается по продуктивному пути. В то же время при образовании фосфодизэфирной связи эта доля уменьшается до 0,4%. Полученные результаты позволяют судить об относительной нуклеофильности атакующих активированный фосфат гидроксильной и фосфомоноэфирной групп (различается в 30 раз, что не противоречит литературным данным [5]).

В заключение можно сформулировать требования к идеальному конденсирующему реагенту карбодимидной природы. Он не должен обрабатывать прочных циклических структур, содержать фенильный радикал, сопряженный с карбодимидной группировкой, и должен быть достаточно устойчив в условиях химического лигирования.

Экспериментальная часть

Олигодезоксирибонуклеотиды синтезировали фосфотриэфирным блочным методом в растворе, как описано в работе [11]. 3'-Фосфорилированные тетра- и нонануклеотиды получали окислением 3'-концевого рибозена в $d(\text{AAAA})\text{U}$ и $d(\text{AACCTACCT})\text{U}$ соответственно по методике [12].

В работе использовали 1-этил-3-(3-диэтиламинопропил)карбодимид, гидрохлорид (CDI (1), Merck, ФРГ), остальные водорастворимые CDI синтезировали; их синтез описан в работе [3]; 2-морфолиноэтансульфокислоту (MES), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Merck, ФРГ); акриламид, N,N' -метиленабисакриламид, персульфат аммония, EDTA (Reanal, ВР); АТФ, N,N,N',N' -тетраметилэтилендиамин, бромфеноловый синий, ксиленцианол (Serva, ФРГ); $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТФ}$ (1000 Ки/ммоль, «Изотоп»), Т4-полинуклеотидкиназу (КФ 2.7.1.68; НИКТИ БАВ, г. Бердск).

Использованы следующие буферные растворы: 0,05 М MES (рН 6,0), 0,02 М MgCl_2 (А); 0,05 М трис-борат (рН 8,3), 1 мМ EDTA (Б); 1 М ацетат калия (рН 8,0) (В).

5'-Концевую ^{32}P -метку в олигонуклеотиды вводили фосфорилированием этих олигонуклеотидов $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТФ}$ с помощью ТК-полинуклеотидкиназы по стандартным методикам.

Электрофорез олигонуклеотидов проводили в 20% плоском ПААГ толщиной 0,4 мм в присутствии 7 М мочевины в буфере В при постоянном напряжении 1000 В. После проведения автордиографии определяли радиоактивность вырезанных из геля зон, соответствующих ^{32}P -меченым олигонуклеотидам, по Черенкову на счетчике Delta-300 (Tracor, Нидерланды). Выход в реакциях конденсации рассчитывали по отношению радиоактивности продукта к суммарной радиоактивности исходного олигонуклеотида и продукта. Элюцию олигодезоксирибонуклеотидов из геля проводили экстракцией буфером В.

Оптические измерения осуществляли на спектрофотометре Spectronic 2000 (Bauch and Lomb, США), плавление олигонуклеотидных комплексов — на спектрофотометре Cary-219 (Varian, США) в термостатированных кварцевых кюветках с длиной оптического пути 1 мм.

Гидратацию CDI (1) изучали в буфере А, а также в буфере А, содержащем рdА, $d(\text{AAAA})$ или $d(\text{AAAAp})$ в концентрации $5 \cdot 10^{-4}$ (на мономер). Исходная концентрация CDI (1) 0,2 М. Растворы выдерживали при 0 и 10° С в криостате фирмы Desaga (ФРГ), отбирали аликвоты через определенные промежутки времени и устанавливали в них содержание CDI с помощью цветообразующей реакции по методике [3, 6].

Химическое лигирование в дуплексах (I) и (Ia) под действием CDI (1) — (11) проводили в буфере А, объем реакционной смеси 10 мкл; $[5'\text{-}^{32}\text{P}] \cdot d(\text{pGGTGGT})$ — донор фосфата — брали в 1,5-кратном недостатке. Нуклеотидная концентрация (на мономерное звено) 10^{-3} М, концентрация CDI 0,2 М для дуплекса (I) и 0,1 М для дуплекса (Ia). Реакционные смеси выдерживали в темноте, температура инкубации варьровалась в различных экспериментах. Через определенные промежутки времени отбирали аликвоты реакционных смесей, олигонуклеотидный материал осаждали 2% раствором LiClO_4 в ацетоне и анализировали электрофорезом в 20% ПААГ.

Статистическую обработку данных проводили по методу наименьших квадратов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Shabarova Z. A.* // Biochimie. 1988. V. 70. № 10. P. 1323—1334.
2. *Долынная Н. Г., Грязнова О. И., Соколова Н. И., Шабарова З. А.* // Биоорганическая химия. 1986. Т. 12. № 7. С. 921—928.

3. Герцок М. Н., Сергеев В. Н., Цытович А. В., Долинная Н. Г., Кухарь В. П. // Биоорган. химия. 1990. Т. 16. № 9. С. 1268—1276.
4. Аширбекова Д. Т., Соколова Н. И., Долинная Н. Г., Шабарова З. А. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. № 2. С. 166—174.
5. Меламед Н. В., Попов С. Г., Шамоцкий Г. Г. // Изв. СО АН СССР. Сер. хим. наук. 1974. № 12. Вып. 5. С. 90—98.
6. Jacobson B. S., Fairman K. R. // Anal. Biochem. 1980. V. 106. P. 114—117.
7. Долинная Н. Г., Грязнова О. И., Соколова Н. И., Шабарова З. А. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 6. С. 755—763.
8. Бадашкева А. Г., Горбунов Н. П., Шамоцкий Г. Г., Шубина Т. Н. // Изв. СО АН СССР. Сер. хим. наук. 1974. № 2. Вып. 1. С. 96—102.
9. Зарьтова В. Ф. // Итоги науки и техники. ВИНТИ. Сер. Биоорган. химия. Механизм реакций фосфорилирования, используемых в биорганической химии. 1984. С. 90—129.
10. Tenforde T., Fawcuz R. A., Freeman N. K. // J. Org. Chem. 1972. V. 37. № 21. P. 3372—3374.
11. Цытович А. В., Орецкая Т. С., Долинная Н. Г., Соколова Н. И., Шабарова З. А. // Химия природ. соединений. 1987. № 3. С. 421—425.
12. Krynetskaya N. F., Zaykina G. V., Oretskaya T. S., Volkov E. M., Shabarova Z. A. // Nucleosides and Nucleotides. 1986. V. 5. № 1. P. 33—43.

Поступила в редакцию
30.X.1990

N. G. DOLINNAYA, A. V. TSYTOVICH, V. N. SERGEEV,
M. N. GERTZUK *, Z. A. SHABAROVA

CHEMICAL REACTIONS IN DOUBLE STRANDED NUCLEIC ACIDS.
X. KINETICS OF OLIGOMER CONDENSATION BY SYNTHETIC
WATER SOLUBLE CARBODIIMIDES

Department of Chemistry, Lomonosov State University, Moscow;

**Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev*

Chemical ligation of oligonucleotides in double stranded complexes has been considered in its structural-kinetic aspect. In a study of the reactivity of eleven synthetic water-soluble carbodiimides the reaction rate has been found to be strongly affected by the substituents at N1 and N3 atoms. The chemical ligation appears to involve the linear form of carbodiimide. Model systems have been used to assess the rate constant for the phosphate activation. The ratio of kinetic constants for the productive and nonproductive reactions of the activated derivate apparently reflects the reactive site conformation; for a given duplex this parameter is virtually independent of the condensing agent structure.