



УДК 577.113.4

© 1991 г.

*Н. Б. Булычев, Ю. Н. Воробьев, А. А. Галль,
А. А. Кошкин, Г. В. Шихкин*

МОДИФИКАЦИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ РЕАКЦИОННО-СПОСОБНЫМИ ПРОИЗВОДНЫМИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ, НЕСУЩИМИ НА 5'-КОНЦЕ ОСТАТОК АЗОТИСТОГО ИПРИТА, КОВАЛЕНТНО ПРИСОЕДИНЕННЫЙ ЛИНКЕРАМИ РАЗНОЙ ДЛИНЫ. КОНФОРМАЦИОННАЯ ДИНАМИКА РЕАКЦИОННОСПОСОБНОЙ ГРУППЫ В КОМПЛЕМЕНТАРНЫХ КОМПЛЕКСАХ

*Новосибирский институт биоорганической химии СО АН СССР,
Новосибирск, 630090*

Чтобы повысить вероятность алкилирования оснований в комплементарном комплексе одноцепочечного дезоксирибополинуклеотида с реакционноспособными производными дезоксирибоолигонуклеотидов, методом молекулярной механики осуществлена оптимизация длины линкера, связывающего остаток азотистого иприта с 5'-концевой фосфатной группой дезоксирибоолигонуклеотида. Расчеты показали, что вставка двух дополнительных метиленовых звеньев в 4-[метил-(2-хлорэтил)амино]бензилфосфамидный остаток производного олигонуклеотида должна увеличивать вероятность такого направления реакции. Проведен синтез 5'-фосфамидного производного с оптимальной расчетной длиной линкера, и выполнены эксперименты по алкилированию модельных олигонуклеотидов. Найдено, что удлинение линкера вставкой двух метиленовых звеньев действительно приводит к увеличению в 2—3 раза вероятности алкилирования гуанина в двухцепочечной части комплекса в третьей позиции от концевой комплементарной пары. Относительная вероятность алкилирования в двухцепочечной части комплекса возрастает при модификации конформационно жестких НК-мишеней. На основе данных по позиционному распределению модификации обосновывается конформационная динамика реакционноспособной группы.

Реакционноспособные производные олигонуклеотидов (РПО), представляющие собой олигонуклеотид-адрес, к 5'- или 3'-концу которого ковалентно присоединена линкером активная химическая группа, являются агентами направленного воздействия на нуклеиновую кислоту-мишень. Разработка эффективных РПО — актуальная задача для целей воздействия на геном, а также химиотерапии вирусных заболеваний. Направленность воздействия РПО на НК-мишень обеспечивается образованием комплементарного комплекса мишень — РПО, в котором реакционноспособная группа пространственно приближена к мишени. Обзор химических и кинетических аспектов комплементарно-адресованной модификации НК см. в работах [1—3]. Модифицирующие свойства РПО зависят не только от строения реакционноспособной группы, но и от способа ковалентного присоединения активной группы к олигонуклеотиду-адресу. Настоящая работа посвящена теоретическому и экспериментальному исследованию влияния длины линкера на модифицирующие характеристики РПО.

Эффективными алкилирующими производными олигонуклеотидов являются 5'-фосфамидные производные 4-[метил-(2-хлорэтил)амино]бензиламина, далее обозначаемые как 5'-ФПО [2, 4]. Экспериментальные исследования алкилирующей способности 5'-ФПО, выполненные в работах [5, 6] на ДНК копии РНК вируса клещевого энцефалита, а в работах

Принятые сокращения: РПО — реакционноспособные производные олигонуклеотидов, 5'-ФПО — 5'-фосфамидные производные олигонуклеотидов, НК — нуклеиновая кислота, ПВК — предреакционный ван-дер-ваальсов комплекс.

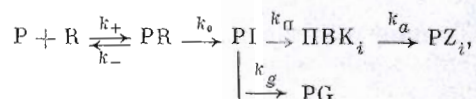
[7, 8] на олигонуклеотидных моделях, продемонстрировали, что 5'-ФПО эффективно, т. е. с высоким выходом, модифицируют НК-мишень. Позиционное распределение сайтов модификации зависит от нуклеотидной последовательности НК-мишени, однако сайтами преимущественной модификации остаются либо первое основание от концевой комплементарной пары комплекса [5, 7, 8], либо основания гуанина в двухцепочечной части комплементарного комплекса [6].

Для понимания фундаментальных структурных основ, определяющих эффективность алкилирующих реагентов, ранее была разработана методика моделирования комплементарных комплексов в реакции алкилирования методом молекулярной механики [9, 10]. Сопоставление результатов моделирования с экспериментальными данными позволяет интерпретировать их на структурно-энергетическом уровне и делать выводы о конформационной динамике реакционноспособной группы в комплементарном комплексе, что дает возможность конструировать РПО путем оптимизации химической структуры для наиболее эффективного алкилирования определенной позиции НК-мишени.

Из общих представлений о межмолекулярных взаимодействиях очевидно, что эффективность и региоспецифичность алкилирования определяется пространственным строением комплементарного комплекса мишень — РПО. Поскольку одноцепочечные участки НК *in vivo* с большой вероятностью вовлечены во вторичные структуры [11], нуклеофильные центры мишени, находящиеся вне комплементарного комплекса мишень — РПО, т. е. в «свисающих» концах, могут быть закрыты для атаки алкилирующим реагентом. В связи с этим кажется полезной разработка РПО с высокой способностью модификации нуклеофильных центров оснований мишени, находящихся в дуплексе мишень — РПО и экспонированных в бороздки двойной спирали, так как двухцепочечные участки существенно жестче одноцепочечных и их пространственное строение более консервативно. К тому же нуклеофильные сайты оснований в «свисающих» концах НК-мишени оказываются недоступными для нуклеофильной атаки в трехкомпонентных комплексах НК-мишень, РПО и дополнительный олигонуклеотид-«эффектор», комплементарный к НК-мишени встык с РПО [12].

Ранее было показано, что 5'-ФПО обладают способностью алкилирования нуклеофильных центров гуанина, экспонированных в большую бороздку [5, 6]. Моделирование методом молекулярной механики [13] показало, что присоединение к 5'-концу олигонуклеотида остатка 4-[метил-(2-хлорэтил)амино]бензиламина не обеспечивает оптимального формирования комплексов алкилирования «назад» оснований в двухцепочечной части дуплекса комплементарного комплекса из-за недостаточной длины линкера. Цель настоящей работы: а) определение методом теоретического моделирования длины полиметиленовой вставки в линкер, оптимизирующей вероятность алкилирования оснований в двухцепочечной части комплекса мишень — РПО; б) синтез и экспериментальное изучение позиционной направленности модификации модельных олигонуклеотидов 5'-ФПО с удлинённым линкером; в) изучение конформационной динамики комплементарных комплексов и реакционноспособной группы.

Методика оценки эффективности и селективности модификации сайтов НК-мишени РПО описана нами ранее [13] и состоит в следующем: основные превращения в комплементарном комплексе НК-мишень — РПО описываются схемой 1:



где P — биополимер, R — реагент РПО; PR — комплементарный комплекс мишень — РПО; PI — комплекс в наиболее стабильной конформации — «накопителе» начальных состояний с реагентом в форме этилениминовоего катиона, через которую обычно протекают реакции алкилиро-

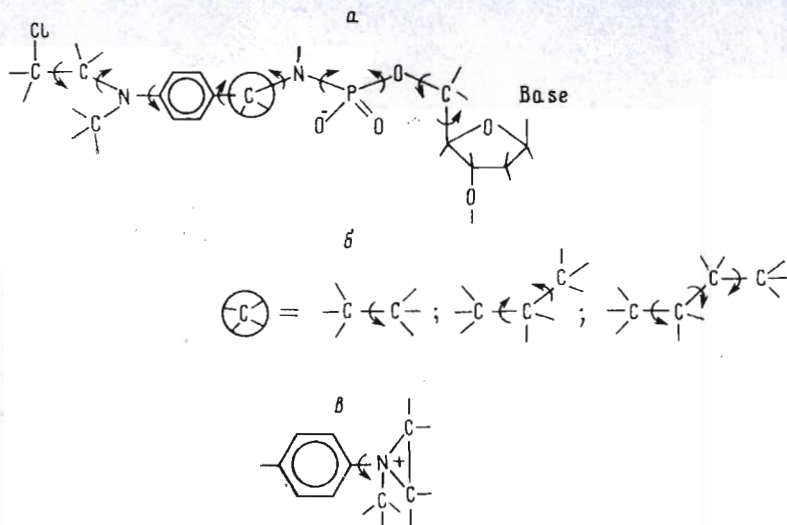


Рис. 1. Фрагменты структуры реакционноспособных производных олигонуклеотидов, несущие на 5'-конце остаток азотистого иприта, ковалентно связанный линкерами различной длины: а — стандартный способ связывания 4-[метил-(2-хлорэтил)амино]бензиламина; стрелками обозначены углы вращения; б — удлинение линкера осуществляется путем замены метиленовой группы, обозначенной в круге, на 2, 3 или 4 метиленовые группы; в — реагент в состоянии этилениммониевого катиона

вания ароматическими 2-хлорэтиламинами [2, 3]; PVK_i — комплементарный комплекс в конформации предреакционного ван-дер-ваальсова комплекса алкилирования i -го сайта НК-мишени; PZ_i — продукт алкилирования; PG — продукт реакций этилениммониевого катиона комплементарного комплекса с нуклеофилами буфера; k_+ , k_- , k_0 , k_p , k_a , k_g — константы скоростей соответствующих процессов. Комплементарные комплексы НК-мишени с РПО (PR и PI) в основном находятся в своих оптимальных конформациях «накопителях», из которых путем тепловых флуктуаций комплементарный комплекс переходит в более напряженные, или «возбужденные», конформации, непосредственно предшествующие акту алкилирования НК-мишени. Возбужденные конформации соответствуют структуре предреакционного ван-дер-ваальсова комплекса (ПВК) с необходимым для реакции алкилирования взаимным положением и ориентацией активной группы реагента относительно нуклеофильного центра НК-мишени. Величина Δ_i энергии напряжения при образовании ПВК или разность энергий ПВК и конформации «накопителя» PI определяет эффективность алкилирующего реагента. Большая величина Δ ведет к уменьшению эффективной константы скорости алкилирования k_a в $\exp(-\Delta/RT)$ раз и сдвигает процесс в сторону реакции с нуклеофилами буфера [13]. Разность между энергиями ПВК различных сайтов мишени определяет распределение вероятностей их алкилирования. Алкилирование РПО на основе ароматических 2-хлорэтиламинов протекает через лимитирующую стадию образования этилениммониевого катиона [2, 3], поэтому эффективность РПО и селективность алкилирования определяется концентрациями ПВК, в которых реагент находится в промежуточном состоянии этилениммониевого катиона. Расстояние между одним из атомов углерода метиленовых групп катиона и атакуемым нуклеофильным центром основания должно быть равно длине их ван-дер-ваальсова контакта. Поскольку раскрытие цикла этилениммониевого катиона может происходить различными способами и ввиду наличия вращательной степени свободы вокруг связи $C-N^+$, конформацию ПВК точнее характеризовать расстоянием атома N^+ до атакуемого нуклеофильного центра равным $\sim 4,1$ А. Расчеты выполнены методом молекулярной механики с учетом влияния раствора электролита в приближении статистической модели среды, параметризация которого представлена в работах [14—16]. Оптимизация энергий комплексов выполнена по конформационным пара-

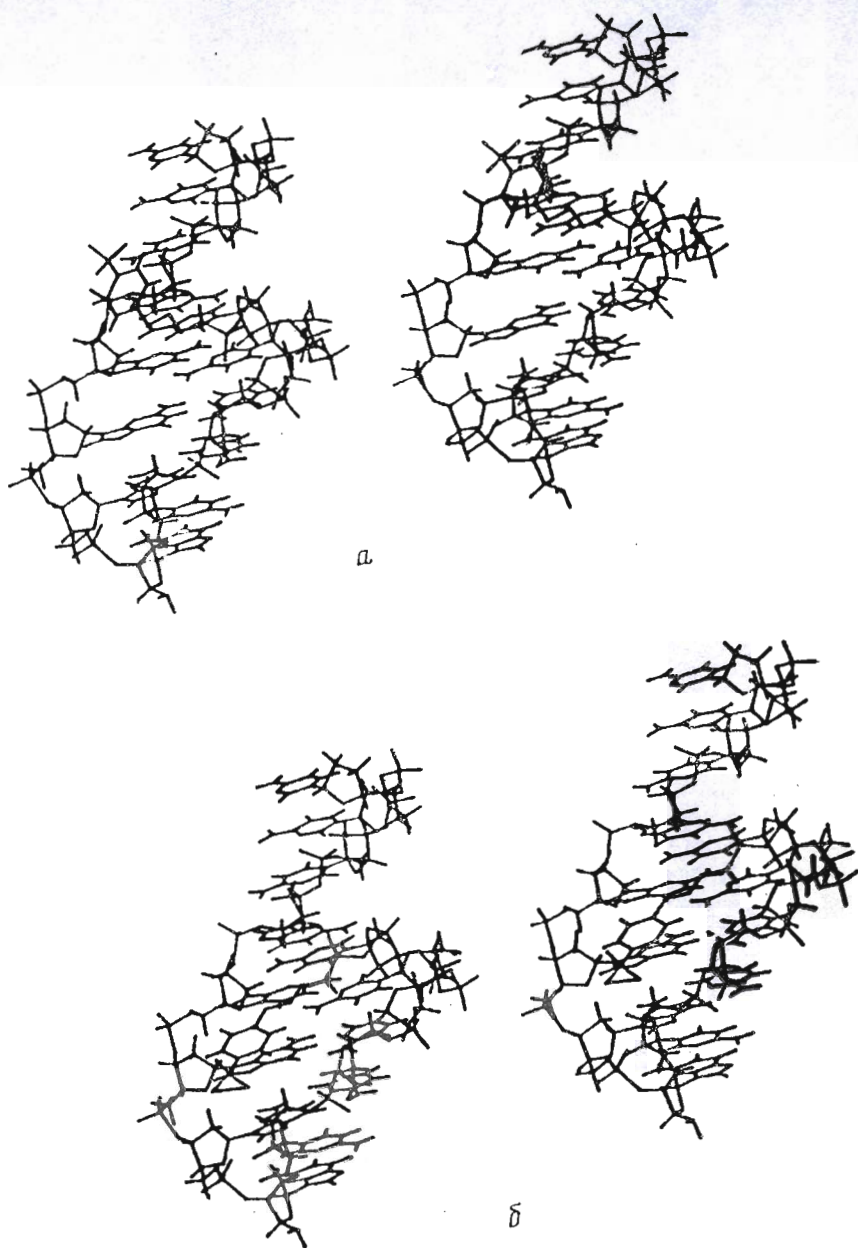


Рис. 2. Стереопары конформаций комплексов 5'-ФПО с удлиненным на 2 метиленовые группы липкером: а — конформация «накопитель» T1(5') или ПВК алкилирования по N3 Cyt(+1); б — конформация «накопитель» T2(5') или ПВК алкилирования по N7 Gua(-3)

метрам комплементарного комплекса и углам внутреннего вращения реагента.

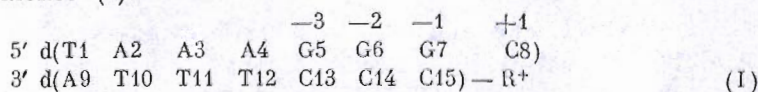
Исследование конформационных возможностей 5'-ФПО (рис. 1) в комплементарном комплексе [13] показало существование двух оптимальных состояний конформаций «накопителей» — T1(5') и T2(5'). В состоянии T1(5') активная группа реагента ориентирована «вперед» в сторону 3'-конца мишени (рис. 2), бензольное кольцо реагента находится в почти стопочном состоянии с терминальной парой оснований комплементарного комплекса. В конформации T2(5') активная группа ориентирована «назад» в сторону 5'-конца мишени, а реагент уложен в большую бороздку двойной спирали. Расчеты показывают [13], что конформация T1(5') и T2(5') близки по энергии, причем более энергетически выгодна (на 1—

Энергии ПВК 5'-ФПО в комплементарном комплексе (I) в зависимости от длины ΔN дополнительной метиленовой вставки в стандартный линкер 5'-ФПО
 Расчеты выполнены для ионной силы 0,2 М

ΔN	ПВК алкилирования	E_v	E_{el}	E_g	E_t	E_d	E_{tot}	Δ	$-\Delta ST$	ΔG_{31}
0	T1(5') C(+1)	-109,0	-43,2 (-42,2) *	-446,0	19,1	3,1	-576,0	0,4		
	T2(5') G(-3)	-108,7	-44,0 (-43,0) *	-447,5	20,0	6,1	-574,1	3,2		
	ΔH_{31}	0,3	-1,0	-1,5	0,9	3,1	-1,9	0,0	1,9	
1	T1(5') C(+1)	-109,3	-42,7	-444,0	19,3	2,2	-574,5	0,2		
	T2(5') G(-3)	-105,2	-43,6	-449,3	20,7	2,5	-574,9	0,7		
	ΔH_{31}	4,1	-0,9	-5,3	1,4	0,3	-0,4	0,6	0,2	
2	T1(5') C(+1)	-108,9	-42,4 (-41,7) *	-442,1	17,9	2,2	-573,3	0,0		
	T2(5') G(-3)	-105,9	-43,9 (-42,9) *	-446,4	18,5	2,2	-575,5	0,0		
	ΔH_{31}	2,9	-1,5	-4,3	0,6	0,0	-2,2	1,2	-1,0	
3	T1(5') C(+1)	-109,2	-42,3	-441,8	17,8	2,2	-573,3	0,0		
	T2(5') G(-3)	-106,7	-44,0	-446,0	18,7	2,2	-575,8	0,0		
	ΔH_{31}	2,5	-1,7	-3,2	0,9	0,0	-2,5	1,8	-0,7	

* Расчеты при концентрации NaCl 0,05 М. E_v — энергия ван-дер-ваальсовых взаимодействий; E_{el} — энергия электростатических взаимодействий; E_g — энергия гидратации; E_t — энергия внутреннего вращения; E_d — энергия деформации дуплекса; Δ — энергия дополнительного напряжения при образовании ПВК из оптимальных конформаций «накопителей»; ΔS — энтропийный вклад; ΔG_{31} — разность свободных энергий образования ПВК алкилирования позиций (-3) и (+1).

2 ккал/моль) конформация T2(5'). Переход конформации T1(5') в конформацию ПВК алкилирования по нуклеофильным центрам первого основания (атому N3 для Cyt и N7 для Gua) «свисающего» 3'-конца НК-мишени характеризуется малым дополнительным напряжением комплекса. Образование наиболее низкоэнергетических ПВК алкилирования оснований в двухспиральной части комплекса, структурно соответствующих конформации T2(5'), требует большего дополнительного напряжения комплекса, так что полная энергия ПВК алкилирования «назад» выше энергии ПВК алкилирования «вперед». Необходимость большего напряжения комплекса понижает вероятность алкилирования нуклеофильных центров НК-мишени, выходящих в большую бороздку дуплекса. Таким образом, стандартно присоединенный к олигонуклеотиду через фосфамид 4-[метил-(2-хлорэтил)амино]бензиламин (рис. 2) пригоден для образования ПВК алкилирования оснований в сторону 3'-конца мишени. Однако стандартный линкер оказывается коротким для образования ПВК алкилирования «назад» основания Gua(-3) в третьей позиции от 3'-конца дуплекса мишень — РПО из конформации T2(5'). Для оценки зависимости энергий образования ПВК от длины линкера были рассчитаны энергии ПВК алкилирования «назад» основания Gua(-3) из конформации T2(5') и ПВК алкилирования «вперед» основания Cyt(+1) в комплементарном комплексе (I):



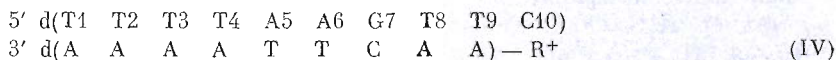
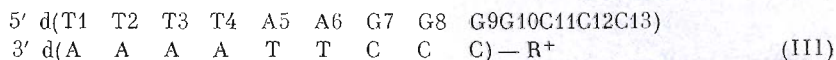
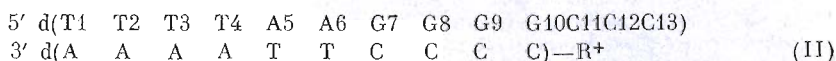
где R^+ — фосфамидный реагент в состоянии этилениммониевого катиона со стандартным линкером или удлинённым на одну, две и три метиленовые группы (рис. 1). Из табл. 1 видно, что удлинение линкера уменьшает энергию деформации дуплекса в ПВК алкилирования Gua(-3) и увеличивает вероятность его образования. Формирование ПВК алкилирования

Gua(-3) с линкером, содержащим две метиленовые вставки (рис. 2), уже не требует дополнительных деформаций дуплекса. Дальнейшее увеличение длины метиленовой вставки $\Delta N (\text{CH}_2) > 2$ нецелесообразно, так как длинный линкер ведет к увеличению локуса модификации, поскольку допускает алкилирование более удаленных пуринов, например Gua(-4), а также повышает вероятность алкилирования оснований Gua(-2), Gua(-1). Оптимальная длина линкера определяется двумя факторами — понижением энтальпии и увеличением потерь энтропии при образовании ПВК. Качественно для комплексов с разными линкерами потери энтропии пропорциональны длине полиметиленовой вставки [13]:

$$\Delta S = -\Delta N R \ln 3 = -\Delta N S_0,$$

где $S_0 = 2,2 \text{ кал} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ для полиметиленовой цепочки. Минимум свободной энергии определяет оптимальную длину линкера. В табл. 1 приведено изменение энтальпии ΔH и энтропии ΔS в зависимости от длины линкера. Видно, что полиметиленовая вставка при $\Delta N > 2$ нецелесообразна, так как при увеличении длины линкера падение энтальпии замедляется, а энтропийные потери линейно растут. Следовательно, длина метиленовой вставки, равная 2, приводит к оптимизации образования ПВК алкилирования «назад» основания Gua(-3) в двухцепочечной части комплекса. Расчеты, приведенные в табл. 1, показывают, что величина энергии дополнительного напряжения Δ , определяющая общую эффективность алкилирования, уменьшается до нуля для вставки из двух метиленовых групп.

Эксперименты по алкилированию олигонуклеотидов в комплементарных комплексах выполнены на нескольких моделях:



где R^+ — 5'-фосфамидный реагент, присоединенный различными линкерами. Комплементарный комплекс (II) в центральном участке соответствует комплексу (I), на котором было выполнено теоретическое моделирование образования ПВК алкилирования основания Gua в позиции (-3) и основания Cyt в позиции (+1). Комплекс (III) рассмотрен для того, чтобы выравнивать нуклеофильности оснований в позициях (-3) и (+1), по которым в основном модифицируется мишень 5'-ФПО. Совместное рассмотрение комплексов (II) и (III) позволяет экспериментально оценить разность реакционных способностей оснований Gua и Cyt в комплементарном комплексе. Ранее сообщалось об относительных реакционных способностях оснований Gua, Cyt, Ade, Thy в растворе в реакции алкилирования мононуклеотидов ароматическими производными хлорэтиламина [17]. Константы скоростей k_a (см. схему 1) алкилирования оснований Gua, Cyt, Ade, Thy при комнатной температуре соотносятся как 35 : 6 : 4 : 1. Это позволяет оценить относительные энергии активации ΔG^\ddagger в реакции алкилирования оснований:

$$\Delta G^\ddagger = RT \ln p, \quad (1)$$

где p — отношение констант скоростей реакции. Для оснований Gua и Cyt получаем $\Delta G_{Gc}^\ddagger = 1,2 \text{ ккал/моль}$.

Комплекс (IV) выбран так, чтобы иметь наиболее реакционноспособные основания только в позициях Cyt (+1) и Gua (-3), по которым происходит преимущественная модификация, и тем самым исключить минорную модификацию по соседним основаниям Gua или Cyt. Для исследования конформационной динамики активной группы в комплексах рассмотрены также результаты, полученные в работе [5] при алкилировании

Вероятности W (%) алкилирования сайтов НК-мишеней 5'-ФПО с линкерами разной длины ($\Delta N = 0$ и 2) в комплементарных комплексах (I)–(V)

Параметры	(II)		(III)		(IV)		(V)	(I) (расчет)	
	0	2	0	2	0	2	0	0	2
W	G7 16	16	A6 —	—	A 3	3	G 3	A —	—
	G8* 32	40	G7 16	25	G 54	71	G 17	G 23	84
	G9 16	25	G8 13	12	T 3	2	G 7	G 1	10
	G10 21	12	G9 14	11	T 3	2	T —	G 10 ⁻²	1
	G11** 15,0	7	G10 45	45	C 37	22	C 73	C 76	5
	C12 —	—	C11 10	5			A —		
W_{31}	2,1	6,6	0,32	0,55	1,5	3,1	0,23	0,26	17
$W_{31}(2)/W_{31}(0)$		3,1		1,8		2,0	~10***		60
ΔG_{31}	0,75	0,0	0,67	0,35	0,96	0,50	2,1	1,9	-1,0
$\Delta \Delta G_{31}$		-0,75		-0,32		-0,46		-2,9	

* Позиция (-3). ** Позиция (+1). *** Получена интерполяцией. W_{31} — отношение вероятностей модификации позиций (-3) к (+1); ΔG_{31} — разность свободных энергий в ккал/моль ПВК по позициям (-3), (+1); $\Delta \Delta G_{31}$ — изменение разности энергий ΔG_{31} при удлинении линкера. Комплексы (II)–(V) — экспериментальные данные, (I) — результаты моделирования методом молекулярной механики.

длинного 303-членного фрагмента ДНК копии РНК вируса клещевого энцефалита — комплекс (V).

Результаты экспериментов (табл. 2) показали, что во всех комплексах сайтами основной модификации мишени 5'-ФПО со стандартным линкером являются основания Cyt, Gua в позициях (+1) и (-3), что согласуется с результатами предыдущих работ [5, 7]. Алкилирование 5'-ФПО с линкером, содержащим вставку из двух метиленовых звеньев, дает измененное распределение вероятностей модификации. Степень алкилирования основных сайтов удобно характеризовать отношением W_{31} вероятностей алкилирования в позициях (-3) и (+1). В свою очередь отношение величин W_{31} для 5'-ФПО с разными линкерами ($\Delta N = 0,2$)

$$d = W_{31}(2)/W_{31}(0) \quad (2)$$

позволяет судить о степени зависимости распределения модификации от строения линкера. Из табл. 2 видно, что d для трех различных комплексов заключено в пределах $\sim 2-3$, т. е. удлинение линкера действительно ведет к возрастанию вероятности алкилирования гуанина в позиции (-3). Логарифм величины d , умноженный на тепловую энергию RT , дает изменение $\Delta \Delta G_{31}$ разности энергий образования ПВК алкилирования сайтов Gua(-3) и Cyt(+1) при увеличении линкера. Величины $\Delta \Delta G_{31}$ для разных комплексов составляют $-0,75 \div 0,3$ ккал/моль, т. е. близки к тепловой энергии RT (табл. 2). Теоретическая оценка величины $\Delta \Delta G_{31}^t = -2,9$ ккал/моль, приведенная в табл. 1, заметно выше. Большая величина теоретической оценки $\Delta \Delta G_{31}^t$ обусловлена прежде всего тем, что метод молекулярной механики не позволяет учесть вклад энтропийных и динамических явлений при расчете энергий определенных конформаций комплексов. Метод молекулярной механики моделирует положение и величины минимумов энергии на поверхности потенциальной энергии комплекса, что позволяет получить представление о реальной динамической картине в растворе только в первом приближении. Разность теоретической и экспериментальной величины $\Delta \Delta G_{31} \sim 2,5$ ккал/моль позволяет сказать, что энтропия ПВК алкилирования «вперед» оснований одноцепочечного участка мишени на ~ 8 э. е. выше, чем в комплексе алкилирования «назад» оснований в двухцепочечной части комплекса. Прежде всего это связано с различной подвижностью оснований в одно- и двухцепочечной частях комплексов. Можно грубо оценить разность энтропий оснований в одно- и двухцепочечной частях дуплекса исходя из отношения их персистентных длин, соответственно $a_s \sim 30-75$ и $a_d \sim 450-600 \text{ \AA}$ [11, 18, 19], поскольку последние определяются величиной тепло-

вых флуктуаций взаимного расположения оснований. Так как средний квадрат флуктуаций геометрических параметров, определяющих взаимное расположение оснований и изгиб оси спирали, обратно пропорционален персистентной длине [11], а число степеней свободы равно 6 на основание, получаем оценку разности энтропий ΔS_{sd} основания в одно- и двухцепочечных структурах:

$$\Delta S_{sd} = 6R \ln (a_d/a_s)^{1/2}. \quad (3)$$

Расчет дает $\Delta S_{sd} \sim 6-7$ кал/моль/град — величину, хорошо соответствующую оценке в 8 кал/моль/град, сделанной выше на основе расчетов методом молекулярной механики и экспериментальных значений ΔG_{31} .

Рассмотрение величин отношений W_{31} (табл. 2) и ΔG_{31} образования ПВК алкилирования позиций (−3), (+1), полученных с учетом относительной реакционной способности оснований Gua и Cyt, для разных комплементарных комплексов позволяет сделать выводы об их относительной конформационной подвижности. Видно, что энергии ΔG_{31} возрастают в ряду комплементарных комплексов (III) < (II) < (IV) < (V). Следовательно, наиболее конформационно-пластичным является олигонуклеотидный комплекс (III), содержащий тракт poly(dG)·poly(dC). Комплекс (IV), богатый АТ-парами, наименее подвижный из комплементарных олигодуплексов. Такой вывод о конформационной лабильности соответствует экспериментальным данным о большой конформационной жесткости В-формы трактов poly(dA)·poly(dT) [20, 21] и высокой конформационной пластичности трактов poly(dG)·poly(dC), совершающих переходы между В-, А-формами дуплексов при незначительных изменениях условий окружающей среды и имеющих незначительную (~0,3 ккал/моль на пару) разницу энергий дуплекса в А- и В-формах [21]. Теоретическое моделирование методом молекулярной механики также показывает большую конформационную лабильность последовательностей poly(dG)·poly(dC) по сравнению с poly(dA)·poly(dT) [16, 22].

Далее из табл. 2 следует, что максимальная энергия дополнительного напряжения образования ПВК алкилирования «назад» относительно оптимального ПВК алкилирования «вперед» (2 ккал/моль) соответствует алкилированию в комплексе (V) 303-членного фрагмента ДНК копии вируса клещевого энцефалита. Следовательно, можно предположить, что, несмотря на высокое содержание G·C-пар в окрестности сайта модификации, конформационная лабильность участка НК-мишени, встроенного в длинную последовательность, оказывается существенно пониженной из-за эффекта «закрепленности концов» модифицируемого участка в длинной последовательности НК-мишени по сравнению с подвижностью в коротком олигодуплексе. В связи с этим увеличение вероятности алкилирования нуклеофильных сайтов гуанина «назад» в позиции (−3) при увеличении длины линкера будет большим, чем на коротких олигодуплексах (II)–(IV).

Вероятности алкилирования минорных сайтов в позициях (−2) и (−1) в комплексах (II)–(IV), как видно из табл. 2, достаточно велики и практически не изменяются при удлинении линкера. Наблюдается очень слабая тенденция к уменьшению модификации минорных сайтов (сайтов кроме позиций (−3) и (+1)) при удлинении линкера. Теоретические оценки вероятностей модификации минорных сайтов по крайней мере на порядок ниже экспериментальных. Наибольшее соответствие с теоретическими оценками наблюдается для комплекса (V). Следовательно, в комплементарных комплексах алкилирования имеется сильная энтропийно-энтальпийная компенсация, характерная для макромолекулярных комплексов [11], ведущая к выравниванию свободных энергий образования ПВК разных сайтов и размыванию картины модификации. Максимальное размывание соответствует наиболее конформационно-динамичным комплексам.

Совместное рассмотрение комплексов (II) и (III) позволяет оценить разность энергий активации ΔG_{GC}^\ddagger стадии алкилирования нуклеофильных сайтов оснований Gua и Cyt. Отношения P_{GC} вероятностей алкили-

рования оснований в комплексах (III) и (II)

$$P_{GC} = W_{31}(\text{II})/W_{31}(\text{III}) \quad (4)$$

5'-ФПО с одинаковыми линкерами позволяет исключить энергию напряжения образования ПВК алкилирования «назад» и найти величину $\Delta\Delta G_{GC}^\#$ с помощью выражения (1). Из данных табл. 2 получаем значения $P_{GC}(0) = 7$, а $P_{GC}(2) = 12$ для алкилирования 5'-ФПО со стандартным и удлиненным на две метиленовые вставки линкерами. Видно, что при алкилировании 5'-ФПО со стандартным и удлиненным линкером наша оценка относительной реакционной способности оснований Gua, Cyt удовлетворительно соответствует оценкам в растворе мононуклеотидов ($P_{GC} \sim 6$) [17]. Средняя величина $\Delta\Delta G^\# \simeq 1,3$ ккал/моль.

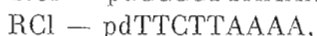
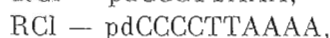
Теоретическое структурно-энергетическое моделирование механизма алкилирования фосфамидными реакционноспособными производными олигонуклеотидов, несущими на 5'-конце остаток азотистого иприта, и экспериментальное исследование алкилирования серии модельных олигонуклеотидов, выполненное в настоящей работе, позволяют сделать следующие выводы: а) комплементарные комплексы 5'-ФПО формируют два типа конформаций-«накопителей» — T1(5') со стопочным взаимодействием фенильной и активной групп реагента с концевой комплементарной парой комплекса и T2(5'), в которой реагент расположен в большой бороздке двойной спирали дуплекса и способен алкилировать атомы N7 гуанина «назад» на сторону 5'-конца мишени; б) удлинение стандартного линкера 5'-ФПО на две метиленовые группы позволяет уменьшить энергию напряжения при образовании ПВК алкилирования оснований «назад» по атому N7 гуанина и увеличить вероятность алкилирования основания Gua(-3) в несколько раз; в) экспериментальные данные по алкилированию модельных олигодуплексов показывают увеличение вероятности алкилирования «назад» в 2—3 раза; г) конформационно-динамические возможности реакционноспособной группы возрастают при переходе от дуплексов, богатых А·Т-парами, к дуплексам с G·C-парами; длинная НК-мишень 303-членной ДНК копии РНК вируса клещевого энцефалита обладает наименьшей конформационной подвижностью; д) для динамически заторможенных мишеней можно ожидать большего, чем для олигодуплексов, увеличения вероятности алкилирования «назад» 5'-ФПО с удлиненным линкером.

Экспериментальная часть

В работе использованы 2,2'-дитиодипиридин (Fluka AG, Швейцария) и трифенилфосфин (Chemapol, ЧСФР), дважды перекристаллизованный из толуола. Все олигодезоксирибонуклеотиды синтезированы В. В. Горном (НИБХ СО АН СССР) на синтезаторе «Виктория 5М» [23].

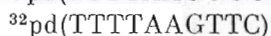
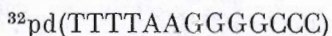
1-Амино-3-[4-[метил-(2-хлорэтил)амино]фенил]пропан (VI) синтезировали аналогично 4-[метил-(2-хлорэтил)амино]бензиламину восстановлением оксима 3-[4-[метил-(2-хлорэтил)амино]фенил]пропен-2-аль (VII) [24]. Оксим (VII) получен действием гидроксиламина на 3-[4-[метил-(2-хлорэтил)амино]фенил]пропен-2-аль (VIII) по аналогии с [24]. Альдегид (VIII) синтезировали по реакции Вильсмайера (винилформилирование) в условиях [25] действием реагента Юнга (1-метиланилинопропен-1-аль-3 — хлорокись фосфора) на N-метил-N-(2-хлорэтил)анилин. Строение реагента (VI) и промежуточных соединений доказано методами ЯМР, ИК-, УФ-, масс-спектроскопии и элементарным анализом. Подробная методика синтеза реагента (VI) будет опубликована в «Известиях Сибирского отделения АН СССР», сер. хим. наук.

Алкилирующие производные олигонуклеотидов



где RCl — реагент (VI), получали согласно [26] и выделяли продукты обращенно-фазовой хроматографией на колонке (0,4 × 25 см) с Lichro-

сorb RP-18. ^{32}P -Меченые олигонуклеотиды (мишени):



модифицировали в комплементарных комплексах (II)—(IV) с соответствующими алкилирующими производными. Концентрация мишени ($1-5$) $\cdot 10^{-6}$ М, концентрация 5'-ФПО $2\cdot 10^{-4}$ М. Модификацию проводили при 20°C в буфере $0,01\text{ M NaH}_2\text{PO}_4$ (рН 7,4), содержащем $0,08\text{ M NaCl}$ и $0,05\text{ mM EDTA}$. Продукты модификации обрабатывали 15% пиридином (1 ч , 95°C) и анализировали методом электрофореза в 20% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (7 M мочевины). Количественные данные позиционного распределения модификации получены измерением радиоактивности полос электрофореграмм и определением денситометрического профиля рентгеновской пленки после радиоавтографии на сканере ULTROSAN XL. Результаты распределения алкилирования оснований в комплементарных комплексах, усредненные по двум-трем сериям экспериментов в каждом случае, представлены в табл. 2.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Knorre D. G., Vlasov V. V. // Affinity Modification of Biopolymers. CRC Press, Boca Raton, 1988. P. 87.
2. Knorre D. G., Vlasov V. V., Zarytova V. F., Lebedev A. V. // Soviet Scientific Reviews. Sect. B: Chemistry Reviews. V. 10 / Ed. Volpin M. E. Harwood: Acad. Publ., 1988. P. 3—57.
3. Knorre D. G., Vlasov V. V. // Progr. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol. 1985. V. 32. P. 292—320.
4. Гринева Н. И., Ломакина Т. С. // Журн. общей химии. 1972. Т. 42. № 6. С. 1629—1634.
5. Бросалина Б. Е., Власов В. В., Кутявин И. В., Мамаев С. В., Плетнев А. Г., Подымигогин М. А. // Биооргани. химия. 1986. Т. 12. № 2. С. 240—247.
6. Vlasov V. V., Gaidamakov S. A., Gorn V. V., Grachev S. A. // FEBS Lett. 1985. V. 182. № 2. P. 415—418.
7. Зарытова В. Ф., Кутявин И. В., Сергеев Д. С., Сильников В. Н., Шишкин Г. В. // Рук. деп. ВИНТИ № 4276 — В89 от 29 июня 1989.
8. Амирханов Н. В., Зарытова В. Ф. // Биооргани. химия. 1989. Т. 15. № 3. С. 379—386.
9. Weiner S. J., Kollman P. A., Case D. A., Singh U. C., Ghio C., Alagona G., Prote-ta S., Weiner P. // J. Amer. Chem. Soc. 1984. V. 106. № 3. P. 765—784.
10. Lavery R., Sklenar H., Pullman B. // J. Biomol. Struct. Dyn. 1986. V. 3. № 6. P. 1015—1031.
11. Кантор Ч., Шиммель П. Биофизическая химия. М.: Мир, 1985. Т. 3.
12. Амирханов Н. В., Зарытова В. Ф., Левина А. С., Лохов С. Г. // Биооргани. химия. 1989. Т. 15. № 12. С. 1618—1626.
13. Воробьев Ю. Н. // Биооргани. химия. 1990. Т. 16. № 1. С. 69—82.
14. Воробьев Ю. Н. // Молекулярн. биология. 1989. Т. 23. № 1. С. 80—92.
15. Воробьев Ю. Н. // Молекулярн. биология. 1989. Т. 23. № 2. С. 545—555.
16. Воробьев Ю. Н. // Молекулярн. биология. 1990. Т. 24. № 2. С. 467—478.
17. Беликова А. М., Гринева Н. И., Карпова Г. Г. // Изв. СО АН СССР. Сер. хим. наук. 1970. № 6. С. 110—116.
18. Olson W. K. // Macromolecules. 1980. V. 13. № 3. P. 721—728.
19. Mingot F., Jorcano J., Davila C. // Biochim. et biophys. acta. 1976. V. 418. № 2. P. 315—321.
20. Зенгер В. Принципы структурной организации строения нуклеиновых кислот. М.: Мир, 1987. С. 292—302.
21. Minchenkova L. E., Schuol'kina A. K., Chernov B. K., Ivanov V. I. // J. Biomol. Struct. Dyn. 1986. V. 4. № 3. P. 463—476.
22. Полтев В. И., Теплухин А. В. // Молекулярн. биология. 1987. Т. 21. № 1. С. 102—115.
23. Грязнов С. М., Горн В. В., Зарытова В. Ф., Кумарев В. П., Левина А. С., Полишук А. С., Потапов В. К., Потемкин Г. А., Средин Ю. Г., Шабарова З. А. // Изв. СО АН СССР. Сер. хим. наук. 1987. № 1. С. 119—123.
24. Богачев В. С., Веньяминова А. Г., Гринева Н. И., Ломакина Т. С. // Изв. СО АН СССР. Сер. хим. наук. 1970. Вып. 6. № 14. С. 110—116.
25. Jutz C. // Chem. Ber. 1958. V. 91. № 4. S. 850—861.
26. Мишенина Г. Ф., Самуков В. В., Шубина Т. И. // Биооргани. химия. 1979. Т. 5. № 6. С. 886—894.

Поступила в редакцию
29.I.1990

После доработки
13.VI.1990

N. V. BULYCHEV, Yu. N. VOROBYEV*, A. A. GALL, A. A. KOSHKIN,
G. V. SHISHKIN

MODIFICATION OF NUCLEIC ACIDS BY REACTIVE DERIVATIVES
OF OLIGONUCLEOTIDES CARRYING A 5'-TERMINAL
4-[METHYL-(2-CHLOROETHYL)AMINO]BENZYLAMINE GROUP
ATTACHED THROUGH LINKERS OF VARIOUS SIZES. CONFORMATIONAL
DYNAMICS OF THE REACTIVE GROUP IN THE COMPLEMENTARY
COMPLEXES

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

By optimizing the length of a linker bearing 5'-terminal alkylating 4-[methyl-(2-chloroethyl)amino]benzylphosphoramidate residue, a reactive oligodeoxyribonucleotide derivative has been constructed with an optimal ability to alkylate nucleic bases in a double-stranded region of the complementary complex between a target NA and the addressed oligonucleotide. A such oligonucleotide could be useful for modifying the target NA if the nucleophilic sites of its single-stranded 3'-terminal region are protected due to a specific tertiary structure. A molecular mechanical modelling suggested that the insertion of two additional methylene groups into the standard linker provides an optimal increase in the efficiency of the modification of the base sites exposed into the major groove of the complementary complex. Synthesis of an oligonucleotide derivative with the modified linker and experiments on the target alkylation showed a 2-3 fold increase of the modifying ability as compared with the reagent having the standard linker. The conformational dynamics of the reactive group is discussed.

* Author to whom correspondence should be addressed.