



УДК 577.113.4 : 539.194

© 1991 г.

Ю. Н. Воробьев

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОМ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МЕХАНИКИ
СТРУКТУРНО-ЭНЕРГЕТИЧЕСКИХ АСПЕКТОВ
КОМПЛЕМЕНТАРНО-АДРЕСОВАННОЙ МОДИФИКАЦИИ
НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ РЕАКЦИОННОСПОСОБНЫМИ
4-[N-МЕТИЛ-N-(2-ХЛОРОЭТИЛ)АМИНО]БЕНЗИЛ-3'- ИЛИ
5'-ФОСФАМИДНЫМИ ПРОИЗВОДНЫМИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

Новосибирский институт биоорганической химии СО АН СССР, 630090

Методом молекулярной механики выполнен анализ вероятностей алкилирования нуклеофильных сайтов НК-мишени в комплементарных комплексах с реакционноспособными производными олигонуклеотидов, содержащими на 5'- или 3'-конце остаток азотистого иприта. Показано, что физико-химической основой высокой эффективности п позиционной направленности модификации, зависящей от последовательности НК-мишени, является структурное соответствие энергетически наиболее выгодной конформации активной группы реагента в комплексе конформациям предреакционного комплекса, имеющим необходимую для реакции алкилирования ориентацию активной группы реагента относительно нуклеофильного центра. Найдено, что 3'-фосфамидные производные олигонуклеотидов (3'-ФПО) обладают наибольшей зависимостью эффективности и позиционной направленности от последовательности НК-мишени. Наиболее эффективно модифицируется цитидин в первой позиции свисающего конца мишени. Для 5'-фосфамидных производных олигонуклеотидов (5'-ФПО) исследована способность алкилирования в зависимости от длины метиленовой вставки в линкер, связывающий активную группу реагента с олигонуклеотидом. Вставка двух метиленовых звеньев обеспечивает оптимальное увеличение вероятности алкилирования НК-мишени «назад» в сторону 3'-конца. Рассмотрено алкилирование в трехкомпонентных комплементарных комплексах, образованных НК, реагентом-олигонуклеотидом и олигонуклеотидом-эффектором. Показано, что дополнительная стабилизация и повышение региоспецифичности алкилирования достигается за счет стекинг-взаимодействий фенильного кольца реагента при его интеркаляции между олигонуклеотидами реагента и эффектора в трехкомпонентных комплементарных комплексах 3'-ФПО и 5'-ФПО, в которых эффект комплементарен соответственно к 3'- или 5'-концу НК-мишени, начиная со второй позиции от концевой пары дуплекса мишень — реакционноспособное производное олигонуклеотида.

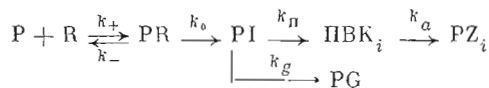
Реакционноспособные производные олигонуклеотидов (РПО) — перспективные препараты для направленного воздействия на геном, а также химиотерапии вирусных заболеваний. Направленность воздействия РПО на НК-мишень обеспечивается образованием комплементарного комплекса мишень—РПО и дальнейшим протеканием химической реакции в комплексе. Химические и кинетические аспекты комплементарно-адресованной модификации НК обобщены в работах [1—3].

Эффективными алкилирующими производными олигонуклеотидов являются 5'- или 3'-фосфамидные производные, несущие 4-[N-метил-(2-хлороэтил)амино]бензильную группировку, присоединенную к 5'- или 3'-концевому фосфату олигонуклеотида через фосфамидную связь (5'-ФПО или 3'-ФПО) [2, 4]. Экспериментальное исследование алкилирующей способности 5'-ФПО было выполнено в работе [5] на копии фрагмента из 303 нуклеотидов ДНК вируса клещевого энцефалита, а в [6, 7] — на олигонуклеотидных моделях. Модификация с помощью 3'-ФПО изучена менее ши-

Сокращения: РПО — реакционноспособные производные олигонуклеотидов, 3'- и 5'-ФПО — 3'- и 5'-фосфамидные производные олигонуклеотидов, ПВК — предреакционный ван-дер-ваальсов комплекс, ОЭ — олигонуклеотид-эффектор.

роко, только на олигонуклеотидной модели [7]. В этих работах продемонстрировано, что 5'-ФПО и 3'-ФПО достаточно эффективно, т. е. с большим выходом, модифицируют НК-мишень. Распределение сайтов модификации 5'-ФПО существенно варьирует для разных последовательностей НК-мишени, хотя сайтом основной модификации всегда остается первое основание мишени от последней комплементарной пары комплекса. Для 3'-ФПО основным сайтом модификации также является первое основание свисающей poly(dC)-последовательности [5] на 5'-конце мишени. Для понимания фундаментальных основ, определяющих эффективность упомянутых алкилирующих реагентов, в настоящей работе выполнено моделирование основных стадий реакции алкилирования методом молекулярной механики [8, 9]. Сопоставление результатов моделирования с экспериментальными данными позволяет интерпретировать их на структурно-энергетическом уровне, что необходимо для понимания закономерностей протекания химических реакций в комплементарных комплексах, построения общих моделей предсказания характеристик РПО, оптимизации химической структуры РПО по заданному свойству, а также для конструирования комплексов НК-мишень с РПО, обеспечивающих эффективное и высокоспецифичное воздействие на НК-мишень.

Основными характеристиками РПО, исследуемыми экспериментально, являются эффективность модификации или доля НК-мишени, подвергающаяся модификации, размер участка модификации и распределение алкилирования по нуклеофильным сайтам НК-мишени. Методика оценки эффективности и селективности модификации сайтов НК-мишени РПО описана нами ранее [10]. Основные превращения в комплементарном комплексе НК-мишень—РПО описываются схемой [1, 10]:



где P — биополимер; R — РПО; PR — комплементарный комплекс мишень—РПО; PI — комплекс в конформации «накопителя» с реагентом в состоянии этилениммониевого катиона, поскольку алкилирование РПО на основе ароматических 2-хлорэтиламинов протекает через лимитирующую стадию образования этилениммониевого катиона [2, 3]; $ПВК_i$ — конформация комплементарного комплекса в конформации предреакционного ван-дер-ваальсова комплекса алкилирования i -го сайта НК-мишени; PZ_i — продукт алкилирования; PG — продукт гидролиза реагента нуклеофилами буфера в комплементарном комплексе; k_+ , k_- , k_0 , k_{Π} , k_a , k_g — константы скоростей соответствующих процессов. Комплементарный комплекс НК-мишени и РПО в основном находится в своих оптимальных конформациях «накопителях», из которых путем флуктуаций комплементарный комплекс переходит в активные, более напряженные или «возбужденные» конформации, непосредственно предшествующие акту алкилирования НК-мишени. Эти активные 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 дополнительной энергии напряжения при образовании $ПВК$ или разность энергий $ПВК$ и конформации «накопителя» определяет эффективность алкилирующего реагента, поскольку большая величина Δ ведет к уменьшению эффективной константы скорости алкилирования в комплементарном комплексе k_{ai} в $\exp(-\Delta/RT)$ раз и сдвигает процесс в сторону побочной реакции с нуклеофилами буфера [10]. Разность между энергиями различных $ПВК$ определяет распределение вероятностей алкилирования различных сайтов мишени. Так как алкилирование РПО на основе ароматических 2-хлорэтиламинов протекает через лимитирующую стадию образования этилениммониевого катиона [2, 3], эффективность РПО и региоселективность алкилирования определяются относительной концентрацией $ПВК$, в которых реагент находится в актив-

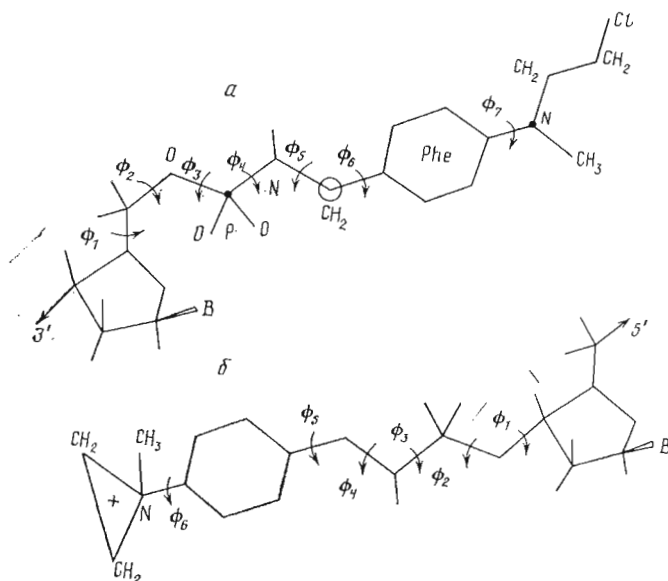


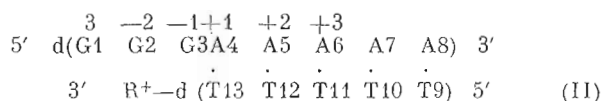
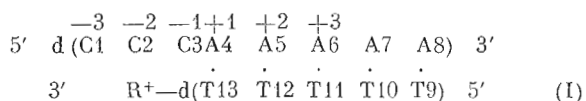
Рис. 1. Реакционноспособные производные олигонуклеотидов: а — 5'-фосфамидные; б — 3'-фосфамидные

ном состоянии этилениммиевого катиона с расстоянием между атомом N^+ катиона и атакуемым нуклеофильным центром основания $\sim 4 \text{ \AA}$. Метод молекулярной механики с учетом влияния раствора электролита в приближении статистической модели среды [10, 11] и его параметризация представлены в работах [11—13]. Энергию оптимизировали по конформационным параметрам комплементарного комплекса и углам внутреннего вращения реагента [10].

Исследование конформационных возможностей 5'-ФПО в комплементарном комплексе начато в работе [10]. В настоящей работе определены структурно-энергетические основы эффективности и закономерностей зависимости направления алкилирования 5'-ФПО и 3'-ФПО от последовательности оснований НК-мишени.

Конформационные возможности 3'-фосфамидных реакционноспособных производных олигонуклеотидов

Строение реакционноспособных групп 3'-ФПО и 5'-ФПО приведено на рис. 1. Моделирование ПВК алкилирования нуклеофильных центров пиримидинов и пуринов рассмотрено в комплементарных комплексах (I) и (II):



Результаты расчетов энергий ПВК комплексов 3'-ФПО с НК-мишенью приведены в табл. 1, конформационные параметры реагента — в табл. 2, а стереопары ряда характерных структур ПВК показаны на рис. 2, 3. Комплементарные комплексы (I) и (II) имеют конформацию В-формы с параметрами, близкими к описанным в литературе (более подробно см. [10]). Анализ конформационных возможностей комплементарного комплекса (I) НК-мишени с 3'-ФПО показывает, что комплекс имеет одну оптимальную конформацию «накопитель» T1(3') (рис. 2a). В этой конформации этилениммиевый катион и фенильная группа реагента находятся в сте-

Эnergии (ккал/моль) конформаций комплементарных комплексов 3'-ФПО *

Комплекс	ПВК алкилирования	E_V	E_{el}	E_g	E_{ws}	E_t	E_d	E_{tot}
(I)	T1(3') **	-97,4	-43,0	-429,4	-42,2	19,3	3,3	-589,4
	C(-1)N3	-97,2	-43,0	-429,4	-42,2	19,3	3,5	-589,1
	C(-2)N3	-92,3	-40,0	-428,6	-40,6	18,5	3,7	-579,3
	C(-3)N3	-86,0	-40,6	-431,0	-43,1	18,6	3,9	-578,2
	A(+1)N3	-89,8	-43,2	-428,1	-41,2	19,5	3,3	-578,5
(II)	T1(3') **	-108,3	-44,1	-442,7	-49,8	17,8	3,3	-623,8
	G(-3)N7	-92,3	-40,7	-449,7	-50,9	17,7	3,8	-612,1
	G(-1)N7	-98,1	-42,1	-446,0	-50,1	20,5	4,5	-615,8
	G(-2)N7	-92,5	-41,3	-447,2	-48,8	18,4	4,3	-614,9
	A(+1)N3	-102,1	-42,3	-441,6	-49,7	17,9	3,6	-614,2

* E_V — ван-дер-ваальсова энергия, E_{el} — энергия электростатических взаимодействий, E_g — энергия гидратации, E_{ws} — энергия системы водных скрепок, E_d — энергия деформации фосфодиэфирных связей, E_t — энергия торсионная, E_{tot} — общая энергия; более подробно методику расчетов см. в работах [10—13].

** Конформация-«накопитель».

Таблица 2

Значения внутренних углов вращения (град) в реагентах 3'- и 5'-ФПО для оптимальных конформаций-«накопителей»

РПО	Конформация-«накопитель»	φ_1	φ_2	φ_3	φ_4	φ_5	φ_6	φ_7
5'-ФПО	T1(5')	44,9	140,4	317,6	214,2	132,4	29,3	83,5
5'-ФПО *	T2(5')	41,3	113,4	217,2	209,7	201,7	-40,1	96,5
	T1(5')	51,8	187,8	275,9	278,1	123,1	177,8	86,7
						179,5 *		
3'-ФПО	T2(5')	52,7	120,5	196,3	184,8	176,9 *	180,4	95,3
						204,1		
						182,4 *		
	T1(3')	182,1	252,1	151,0	228,4	179,1 *	84,7	

* Данные для реагента с линкером, удлинённым на два метиленовых звена; звездочкой отмечены углы вращения в метиленовой вставке удлинённого линкера.

кинге с последней парой двухцепочечного участка комплекса и формируют вместе с первым неспаренным основанием НК-мишени C(+1) электростатически связанную пару, которая дополнительно стабилизирует комплементарный комплекс. Замена пиримидинов на пурины в свисающем 5'-конце мишени, т. е. переход к комплексу (II), не изменяет абсолютной стабильности конформации T1 (3').

Наиболее замечателен тот факт, что глобальная конформация-«накопитель» T1 (3') в случае комплекса (I) одновременно является конформацией ПВК алкилирования по атому N3 или O2 пиримидинов в позиции (-1) НК-мишени. Поэтому расчетная вероятность алкилирования пиримидиновых оснований мишени в позиции (-1) в комплементарных комплексах 3'-ФПО максимальна. Этот вывод соответствует экспериментальным данным по направленности алкилирования 3'-ФПО в комплексе (I) [7].

Расчеты ПВК алкилирования по атому N3 оснований C в позициях (-2), (-3) комплекса (I) показывают, что энергии соответствующих ПВК заметно выше (на ~10 ккал/моль) по сравнению с энергией ПВК алкилирования C (-1). Причина этого в том, что образование ПВК алкилирования удаленных оснований C(-2) и C(-3) сопровождается разрывом водородных связей в концевой комплементарной паре комплекса (рис. 26). Разрыв концевой пары дуплекса ведет к росту энтропии приблизительно на 24 э. е. вследствие увеличения числа степеней свободы [10], что повышает свободную энергию на ~7 ккал/моль при 300 К. Следовательно, сво-

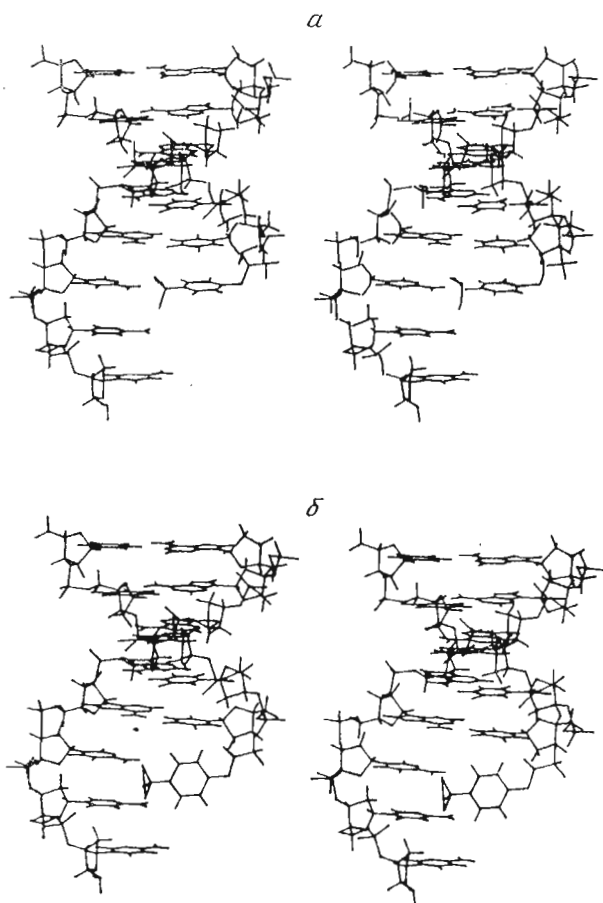


Рис. 2. Стереорисунки конформаций комплементарных комплексов НК-мишени с 3'-ФПО: а — конформация-«накопитель» Т1(3'); б — ПВК алкилирования по атому N3 основания С(—2)

бодная энергия ПВК алкилирования оснований С(—2) и С(—3) в комплексе (I) увеличивается на ~ 3 ккал/моль по сравнению с энергией ПВК алкилирования по С(—1), а вероятности алкилирования оснований С(—1), С(—2), С(—3) относятся как $1 : 10^{-2} : 10^{-2}$. Необходимость раскрытия концевой комплементарной пары комплекса при алкилировании удаленных оснований приводит к увеличению примерно в 10 раз относительной вероятности алкилирования основания С(—1) в случае более прочной концевой G·C-пары по сравнению с A·T, так как разность свободных энергий разрыва G·C- и A·T-пар $\Delta G \sim 1,5-2,0$ ккал/моль [14].

Расчеты структуры и энергии ПВК алкилирования оснований G(—1), G(—2), G(—3) по атомам N7 в комплексе (II) показывают, что оптимальная конформация-«накопитель» Т1(3') не соответствует ПВК алкилирования G(—1) по атому N7. Для формирования ПВК G(—1) необходимо большое ($> 30^\circ$) увеличение угла спирального вращения на шаге G(—1)—A(+1), что ведет к ослаблению стекинг-взаимодействий. Образование ПВК G(—2), G(—3) сопровождается разрывом концевой комплементарной пары (рис. 3а). Энергии ПВК алкилирования G(—1), G(—2), G(—3), как видно из табл. 1, близки между собой в пределах 3 ккал/моль. Плавление концевой пары дуплекса и образование ПВК G(—2) и G(—3) ведет к увеличению энтропии комплекса, поэтому разность свободных энергий ПВК G(—1), G(—2) и G(—3) уменьшается. Таким образом, можно сделать вывод, что в комплексе (II) с пуриновой последовательностью в свисающем конце НК-мишени селективность алкилирования позиций (—1), (—2), (—3) незначительна. Для образования ПВК алкилирования основания в позиции (—4) НК-мишени необходимо разрушение комплементарного спа-

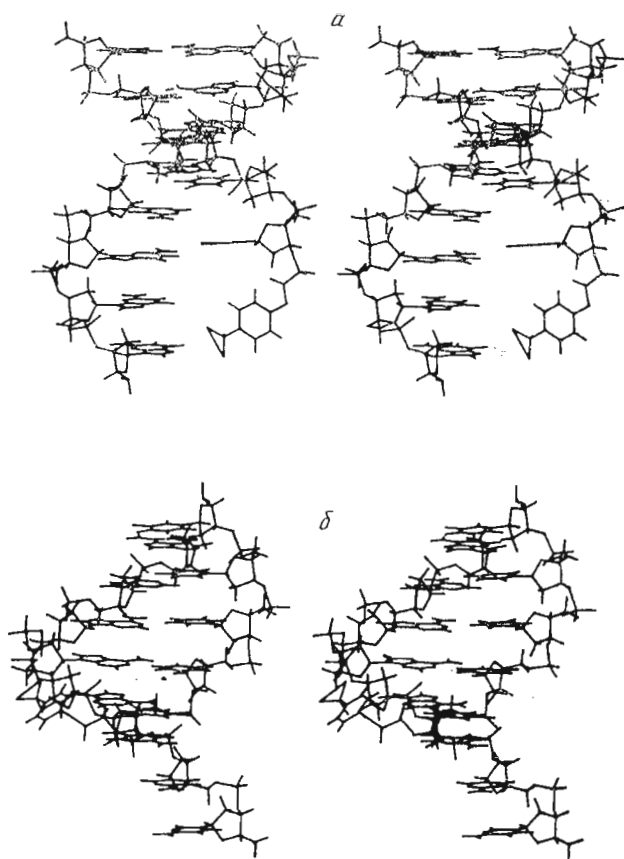


Рис. 3. Стереорисунки конформаций ПВК алкилирования 3'-ФПО G(-3) N7 (а) и A(+1) N3 (б)

рирования в двух последних парах дуплекса, поэтому вероятность алкилирования основания в этой позиции уменьшается по крайней мере в 10 раз по сравнению с вероятностью алкилирования позиции (-3).

Комплексы 3'-ФПО способны образовывать с небольшой вероятностью ПВК алкилирования оснований A(+1) НК-мишени (рис. 3б). Расчет энергии ПВК алкилирования оснований A(+1) (см. табл. 1) показывает, что этилениммиевый катион в этом случае сближен с атомами N3, а его энергия близка к энергии ПВК алкилирования удаленных оснований C(-2) в комплексе (I) или G(-2) в комплексе (II). Энергия ПВК алкилирования A(+2) увеличивается по сравнению с ПВК алкилирования A(+1). Так как реакционная способность атома N3 аденина на порядок ниже реакционной способности N7 гуанина [15], вероятность алкилирования оснований A(+1), A(+2) будет дополнительно уменьшаться относительно вероятности алкилирования G(-3). Моделирование показывает, что выход этилениммиевого катиона в большую бороздку дуплекса 3'-ФПО — мишень запрещен. Сравнение расчетов с экспериментальными данными приведено в табл. 3. Видно, что для комплекса (I) наблюдается качественное соответствие между расчетными и экспериментальными вероятностями алкилирования сайтов.

Подведем итог расчетам конформационных возможностей 3'-ФПО: а) имеется только одна стабильная конформация «накопитель» T1(3'), в которой в основном и находится реагент в комплементарном комплексе НК-мишень—3'-ФПО; б) конформация T1(3') практически совпадает с конформацией ПВК алкилирования атома N3 основания C(-1), поэтому алкилирование этого основания наиболее вероятно; в) наличие пурина в позиции (-1) приводит к уменьшению селективности алкилирования (алкилирование возможно по позициям (-1), (-2), (-3), (+1)); г) эффективность 3'-ФПО максимальна при алкилировании пиримидинов в сви-

**Направленность алкилирования в комплементарных комплексах 5'-ФПО и 3'-ФПО
(расчетные и экспериментальные величины)**

Комплекс	Вероятности алкилирования сайтов	Источник
5' d(CC C AAAAA) 3' R-d(TTTTT)	$C(-1) \gg C(-2) \sim C(-3) \sim A(+1)$ 1 10^{-2} 10^{-2} 1 0,15 0,07 0,07	Расчет Эксп. [7]
5' d(GGGAAAA) 3' R-d(TTTTT)	$C(-1) \sim G(-2) \sim G(-3) > A(+1)$	Расчет
5' d(GGCAAAAA) 3' R-d(TTTTT)	$C(-1) \gg G(-3) > G(-2) > A(+1)$ 1 10^{-2} 10^{-2} 10^{-2}	Расчет
5' d(AAAA A C C C) 3' d(TTTT T)-R	$C(+1) > C(+2) > C(+3)$ 1 10^{-1} 10^{-2} 1 0,20 0,04	Расчет Эксп. [7]
5' d(AAAAACGG) 3' d(TTTTT)-R	$G(+1) \gg G(+2) \gg G(+3)$ 1 10^{-2} 10^{-4}	Расчет
5' d(AAAAAGGG) 3' d(TTTTT)-R	$G(+1) > G(+2) > G(+3)$ 1 10^{-1} 10^{-2}	Расчет
5' d(AAAAGGGC) 3' d(TTTTCCC)-R	$C(+1) > G(-3)$ 1 10^{-1}	Расчет
5' d(AAAAGGGC) 3' d(TTTTCCC)-R *	$C(-2) > C(+1)$ 1 10^{-1}	Расчет
5' d(AGAGAGGTCAC)- 3' d(TCTCTCCA)-R	$C(+1) > G(-3) > G(-2) \sim C(+3) \sim G(-4)$ 1 0,22 0,1 0,07 0,03	Эксп. [5] **

* Реагент с линкером, удлинненным на две метиленовые группы.

** Длинная НК-мишень фрагмента ДНК вируса клещевого энцефалита.

саящем конце НК-мишени ($\Delta \simeq RT$, см. табл. 1, тогда как для алкилирования пуринового конца мишени $\Delta \sim 3$ ккал/моль).

Свойства 5'-ФПО с метиленовой вставкой в линкере

Расчеты, выполненные в работе [9] для 5'-ФПО, показывают, что для него существуют два оптимальных состояния конформации-«накопителя» — T1(5') и T2(5'). В состоянии T1(5') активная группа реагента ориентирована вперед, в сторону 3'-конца мишени, тогда как в состоянии T2(5') активная группа ориентирована назад, в сторону 5'-конца мишени, а реагент уложен в большую бороздку двойной спирали. Расчеты в работе [10] показывают, что конформации T1(5') и T2(5') близки по энергии, причем более стабильна (на 1—2 ккал/моль) конформация T2(5'). Однако переход конформации T1(5') в конформацию ПВК алкилирования по нуклеофильным центрам первого основания (атому N3 для С и N7 для G) свисающего 3'-конца мишени сопровождается малым дополнительным напряжением комплекса, тогда как образование наиболее низкоэнергетического ПВК алкилирования оснований в двухспиральной части комплекса, структурно соответствующих конформации T2(5'), требует большего дополнительного напряжения комплекса. Необходимость напряжения комплекса понижает вероятность алкилирования нуклеофильных центров НК-мишени, выходящих в большую бороздку дуплекса. Таким образом, стандартный способ связывания фенилхлорэтильной группы реагента с помощью фосфамидной связи (рис. 1) удовлетворителен для образования ПВК алкилирования оснований мишени в сторону ее 3'-конца. Однако стандартный линкер оказывается коротким для образования ПВК алкилирования «назад» (основание G(-3)) из конформации T2(5') без дополнительных напряжений двойной спирали в комплементарном комплексе (III). Повышение эффективности алкилирования «назад» пуринов по позициям (-3), (-2) в двухспиральной части комплементарного комплекса

Энергии (ккал/моль) ПВК 5'-ФПО в комплементарном комплексе (III)
в зависимости от числа метиленовых звеньев (n) в линкере
Расчеты выполнены для ионной силы 0,2 M NaCl

n	ПВК алкили- рования *	F_D	E_{el}	E_g	E_{ws}	E_t	E_d	E_{tot}	Δ ***
0	C(+1)	-109,0	-43,2	-417,0	-29,0	19,1	3,1	-576,0	0,4
	G(-3)	-108,7	-42,2 **	-418,0	-29,5	20,0	6,1	-574,1	3,2
1	ΔE_{T2-T1}	0,3	-1,0	-1,0	-0,50	0,9	3,1	1,9	
	C(+1)	-109,3	-42,7	-415,5	-28,5	19,3	2,2	-574,5	0,2
	G(-3)	-105,2	-43,6	-418,2	-31,1	20,7	2,5	-574,9	0,7
	ΔE_{T2-T1}	4,1	-0,9	-2,7	-2,6	1,4	0,3	-0,4	
2	C(+1)	-108,9	-42,4	-415,0	-27,1	17,9	2,2	-573,3	0,0
			-41,7 **						
	G(-3)	-105,9	-43,9	-416,0	-30,4	18,5	2,2	-575,5	0,0
			-42,9 **						
3	ΔE_{T2-T1}	2,9	-1,5	-1,0	-3,3	0,6	0,0	-2,2	
	C(+1)	-109,2	-42,3	-414,8	-27,0	17,8	2,2	-573,3	0,0
	G(-3)	-106,7	-44,0	-416,2	-29,8	18,7	2,2	-575,8	
	ΔE_{T2-T1}	2,5	-1,7	-1,4	-1,80	0,9	0	-2,5	0,0

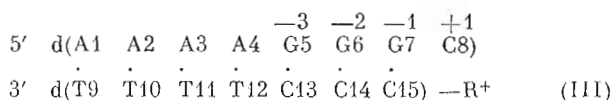
* ПВК алкилирования C(+1) и G(-3) по структуре совпадают с конформацией-«накопителем» T1(5') и T2(5') соответственно. ΔE_{T1-T2} — разность энергий ПВК, соответствующих конформациям-«накопителям» T2 и T1.

** Расчеты при [NaCl] 0,05 M.

*** Δ — энергия дополнительного напряжения при образовании ПВК.

представляется важным в ряде практических случаев воздействия на специальные участки третичной структуры НК или в комплексах с олигонуклеотидом-эффектором, комплементарным к 3'-концу НК-мишени и повышающим прочность комплементарного комплекса [16].

Были рассчитаны энергии ПВК алкилирования «назад» основания G(-3), образующиеся из конформации T2(5'), и ПВК алкилирования «вперед» основания C(+1) в комплементарном комплексе (III):



для стандартного и удлиненных на одну, две и три метиленовые группы линкеров. Результаты расчетов приведены в табл. 4. Из этой таблицы видно, что удлинение линкера уменьшает энергию деформации дуплекса в ПВК алкилирования по G(-3) и увеличивает вероятность его образования. Формирование ПВК алкилирования по G(-3) с линкером, содержащим две метиленовые вставки (рис. 4), уже не требует дополнительных деформаций дуплекса. Дальнейшее увеличение длины вставки нецелесообразно, так как длинный линкер допускает алкилирование более удаленных пуринов G(-4), а также повышает вероятность алкилирования оснований G(-2) и G(-1), если они присутствуют в этих позициях. Оптимальная длина линкера определяется двумя факторами — понижением энтальпии и энтропии при образовании ПВК. Качественно изменение энтропии пропорционально количеству метиленовых звеньев (n) во вставке [10]:

$$\Delta S = -S_0 n,$$

где $S_0 = 2,2$ э. е. для полиметиленовой цепочки. Минимум свободной энергии определяет оптимальную длину линкера. На рис. 5 приведено изменение энтальпии ΔH и энтропии ΔS от длины линкера. Из рис. 5 видно, что вставка из более чем двух метиленовых звеньев нецелесообразна, так как падение энтальпии замедляется, а энтропийные потери линейно растут. Таким образом, оптимальная длина метиленовой вставки, равная двум, ведет к оптимизации образования ПВК алкилирования «назад» (основание

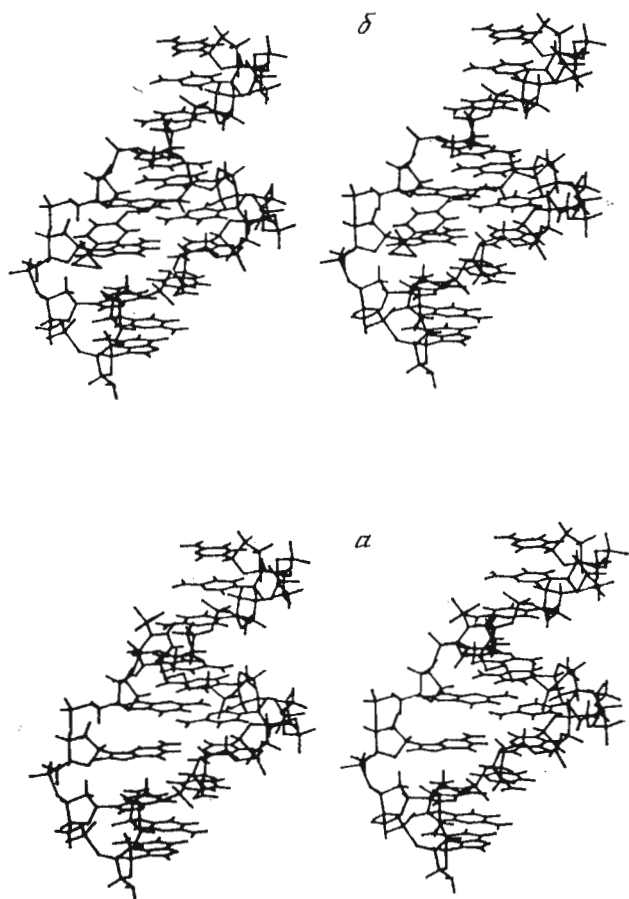


Рис. 4. Стереорисунки конформаций комплексов 5'-ФПО с удлиненным на две метиленовые группы линкером: а — конформация-«накопитель» Т1(5') или ПВК алкилирования по С(+1) N3; б — конформация-«накопитель» Т2(5') или ПВК алкилирования по G(-3) N7

G(-3)) в двухцепочечной части комплекса. Из расчетов, приведенных в табл. 4, также следует, что величина энергии напряжения Δ , определяющая общую эффективность алкилирования, уменьшается до нуля для вставки из двух метиленовых групп.

Сравнение конформационных возможностей 3'- и 5'-ФПО в комплементарных комплексах

Обсудим причины различной эффективности алкилирования в комплементарных комплексах 3'- и 5'-ФПО. Комплементарный комплекс НК-мишени с 5'-ФПО имеет две устойчивые конформации-«накопителя»: Т1(5') и Т2(5'). В конформации Т1(5') фенильное кольцо и активная группа реагента находятся в стеклинг-взаимодействии с 5'-концевой комплементарной парой комплекса и стабилизируют его. Кроме того, конформация Т1(5') удовлетворительно соответствует ПВК алкилирования оснований НК-мишени С(+1) по атому N3 и G(+1) по атому N7. Таким образом, строение и природа стабилизации конформаций-«накопителей» Т1(3') и Т1(5') для комплементарных комплексов НК-мишени с 3'- или 5'-ФПО оказываются подобными соответственно с 3'- и 5'-концов.

Энергии образования ПВК алкилирования 5'-ФПО нуклеофильных сайтов N3 и N7 оснований С и G возрастают от позиции +1 к позиции +3. Зависимость энергии образования ПВК от последовательности оснований в свисающем 3'-конце мишени определяется тем, что для образования ПВК алкилирования N3 оснований С требуется малое (на 5—7°) дополнительное закручивание спирали, тогда как для образования ПВК ал-

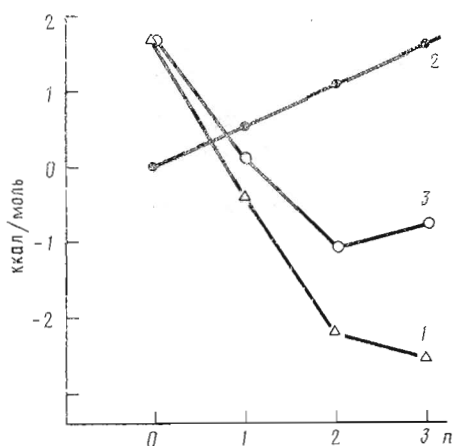


Рис. 5. Зависимость разности энергий образования ПВК C(+1) и G(-3) от числа метиленовых звеньев (n) в линкере 5'-ФПО: 1 — энтальпия; 2 — энтропия в предположении максимальной подвижности линкера; 3 — свободная энергия

килирования оснований G по атомам N7 необходимо более значительное (на 15°) раскручивание спирали на каждом шаге 3'-конца мишени. Противоположность изменения углов вращения при образовании ПВК алкилирования пиримидинов и пуринов позволяет заключить, что максимальная селективность алкилирования оснований C(+1) достигается в гетеропоследовательности C(+1)G(+2)G(+3), а максимальная селективность алкилирования основания G(+1) соответствует последовательности G(+1)C(+2)C(+3). Наименьшая селективность алкилирования соответствует гомогенным последовательностям CCC и GGG в свисающем 3'-конце мишени. Сравнение расчетов вероятностей алкилирования сайтов мишени с экспериментальными данными приведено в табл. 3.

В случае 5'-ФПО образование ПВК алкилирования оснований в позициях +2, +3 НК-мишени сопровождается только изменением относительного закручивания оснований 3'-конца мишени в пределах $+10^\circ$ для C и -20° для G, что по оценкам требует затрат энергии порядка тепловой ввиду большой лабильности одноцепочечных участков НК (персистентная длина порядка 40—75 Å [17, 18]).

В комплексах 3'-ФПО образование ПВК алкилирования удаленных позиций C(-2), C(-3) приводит к разрушению концевой комплементарной пары дуплекса. Поэтому вероятность алкилирования 3'-ФПО первой позиции (C(-1)) свисающего конца мишени выше, чем соответствующей позиции C(+1) для 5'-ФПО. В целом результаты моделирования свидетельствуют, что 5'-ФПО имеют большие по сравнению с 3'-ФПО возможности образовывать ненапряженные ПВК алкилирования удаленных оснований из конформации «накопителя» T1(5').

Комплементарные комплексы НК с 5'-ФПО в отличие от комплексов 3'-ФПО имеют вторую конформацию «накопитель» T2(5') с расположением алкилирующего реагента в большой бороздке В-формы двойной спирали, имеющую значительное структурное соответствие ПВК алкилирования основания G(-3) в сторону 5'-конца мишени. Множественность возможностей образования ПВК в комплексах 5'-ФПО с мишенью уменьшает направленность алкилирования по сравнению с комплексами 3'-ФПО. Селективность алкилирования в комплексах НК с 3'-ФПО имеет большую, чем в комплексах с 5'-ФПО, зависимость от природы оснований (пурин или пиримидин) в свисающем конце НК-мишени (табл. 3). Общие стереохимические причины различной способности алкилирования 5'- и 3'-ФПО следующие: а) активная группа реагента в 3'-ФПО имеет на одну степень свободы меньше, чем в 5'-ФПО, и, следовательно, ПВК с участием 3'-ФПО энтропийно выгодное; б) закономерности строения В-формы дуплекса ограничивают конформационную подвижность реагента в 3'-ФПО; в) конформации «накопителя» T1(3') и T1(5') структурно хорошо соответствуют ПВК алкилирования атомов N3 ближайших оснований C(-1) и C(+1) соответственно.

Малая величина энергии дополнительного напряжения Δ определяет высокую эффективность 5'- и 3'-ФПО при алкилировании пиримидинов.

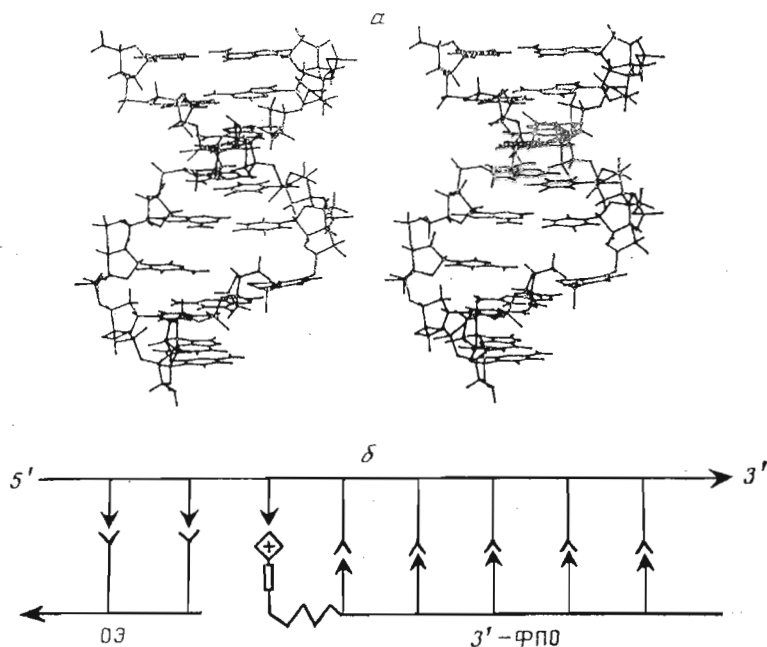


Рис. 6. Стереорисунок оптимальной конформации комплекса НК-мишени с 3'-ФПО и олигонуклеотидом-эффектором, комплементарным начиная с позиции -2 к НК-мишени (а), и схематическое представление этого тройного комплекса (б)

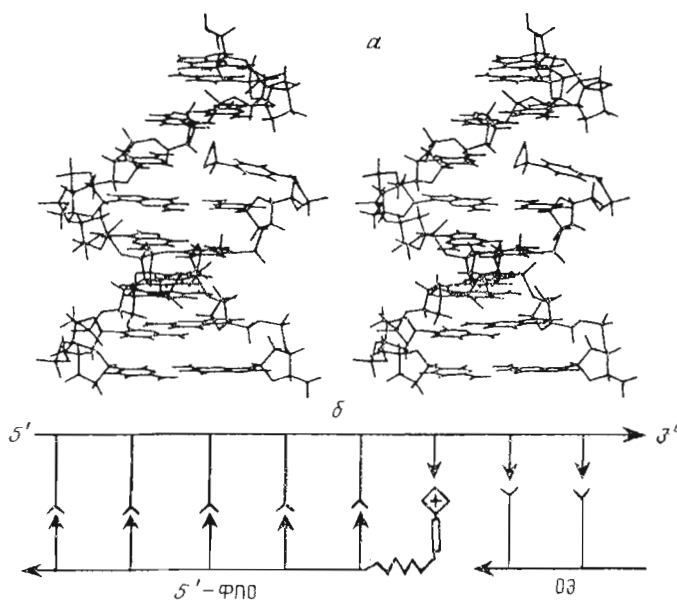


Рис. 7. Стереорисунок оптимальной конформации комплекса НК-мишени с 5'-ФПО и олигонуклеотидом-эффектором, комплементарным начиная с позиции $+2$ к НК-мишени (а), и схематическое представление этого комплекса (б)

При переходе к пуриновым основаниям в первой позиции свисающего конца НК-мишени 5'-ФПО образуют ПВК с меньшим дополнительным напряжением Δ , поэтому теоретически их эффективность на этих последовательностях выше, чем у 3'-ФПО. Однако экспериментально это увеличение эффективности может не фиксироваться, если фактор конкуренции p , равный отношению констант скорости алкилирования нуклеофильного сайта к скорости реакции этилениммониевого катиона с нуклеофилами

буфера, большой (для остатков гуанозина p равна ~ 550 [19]) и если полная степень модификации сильно зависит от константы ассоциации НК-мишени с РПО [2, 15].

Комплементарные комплексы 3'- и 5'-ФПО с олигонуклеотидом-эффектором

Олигонуклеотидом-эффектором (ОЭ) называется олигонуклеотид, комплементарный к участку НК-мишени в стыке с реакционноспособным производным олигонуклеотида (рис. 6). Показано, что образование трехкомпонентного комплекса НК-мишени—РПО—ОЭ увеличивает прочность связывания РПО с мишенью [15, 19] за счет дополнительного стеккинг-взаимодействия в стыке РПО с ОЭ, а в конечном счете выход или эффективность модификации, которые прямо коррелируют с прочностью комплексов [1—3].

Результаты структурного моделирования показывают, что возможно конструирование специальных трехкомпонентных комплексов с ОЭ—РПО—мишень, которые позволяют не только стабилизировать комплементарный комплекс, но и управлять направленностью модификации мишени. Конформации-«накопители» T1(3'), T1(5') 3'- и 5'-ФПО стабилизируются в трехкомпонентном комплексе с ОЭ, комплементарным к НК-мишени с позиции (—2) в случае 3'-ФПО и с позиции (+2) в случае 5'-ФПО (рис. 6, 7). В таких трехкомпонентных комплексах резко увеличивается энергетическая предпочтительность образования ПВК алкилирования оснований в позициях (—1) и (+1) 3'- и 5'-ФПО соответственно, поскольку фенильное кольцо и этилениммониевый катион реагента интеркалируют в одну из цепей двойной спирали и оказываются «зжатыми» в почти правильной ориентации предреакционного ван-дер-ваальсова комплекса между основаниями олигонуклеотидов мишени и эффектора. Максимальное проявление эффекта усиления направленности алкилирования наблюдается для оснований С в позиции (—1) в комплексах с 3'-ФПО и для основания С в позиции (+1) в комплексах с 5'-ФПО, так как соответствующие ПВК практически совпадают с оптимальными конформациями T1(3') и T1(5'). Оценки энергии стабилизации дают величину 3—5 ккал/моль.

Далее, результаты моделирования приводят к выводу, что ОЭ, плотно примыкающий к 5'-концу 5'-ФПО, т. е. комплементарный к 3'-концу НК-мишени, начиная с позиции (+1) гасит алкилирование основания в позиции (+1). Действительно, если в этой позиции находится пиримидин, то его сильнейший нуклеофильный центр экранирован комплементарной парой ОЭ. Если в позиции (+1) находится основание С, то образование ПВК алкилирования G(+1) по атому N7 запрещено, так как этилениммониевый катион 5'-ФПО с наибольшей вероятностью атакует основания 3'-конца НК-мишени со стороны малой бороздки двойной спирали (рис. 6). Атака атомов N7 пуринов «вперед» со стороны большой бороздки стерически затруднена в неискаженной В-форме дуплекса. Следовательно, эффектор, плотно примыкающий к 5'-ФПО с 3'-конца НК-мишени, оставляет возможность только для образования ПВК алкилирования «назад» по атомам N7 пуринов из конформации T2(5').

Эффектор, плотно примыкающий к 3'-концу 3'-ФПО и комплементарный 5'-концу НК-мишени, начиная с позиции (—1) подавляет алкилирующую способность 3'-ФПО, поскольку, если в позиции (—1) мишени находится пиримидин, его сильнейший нуклеофильный центр N3 экранирован комплементарной парой ОЭ. Если в позиции (—1) находится пурин, образование ПВК алкилирования по атому N7 стерически затруднено, так как активная группа реагента в 3'-ФПО не имеет выхода в большую бороздку дуплекса к атомам N7, если дуплекс находится в В-форме. Образование ПВК алкилирования G(—1) по атому N7 возможно при переориентации основания G(—1) в *син*-конформацию, однако это сильно возмущает В-форму дуплекса. Возможно образование ненапряженного ПВК с менее реакционноспособными атомами N3 пуринов или O2 пиримидинов в позиции

(—1), экспонированными в малую бороздку дуплекса, однако это тоже ведет к подавлению эффективности модификации из-за повышения вероятности реакции с нуклеофилами буфера.

Выводы

Структурно-энергетическое моделирование промежуточных продуктов алкилирования фосфамидными реакционноспособными производными олигонуклеотидов (3'- и 5'-ФПО), выполненное в настоящей работе, позволяет сделать следующие выводы: 1) 3'- и 5'-ФПО обеспечивают удовлетворительную подвижность реагента и способны формировать ПВК алкилирования практически без возмущения конформации В-формы комплементарного комплекса; 2) комплементарные комплексы с 3'-ФПО имеют один тип конформации-«накопителя» Т1(3') со стекинг-взаимодействием фенильной и активной групп реагента с концевой комплементарной парой комплекса и высокой степенью структурного соответствия с ПВК алкилирования ближайшего пиримидинового основания С(—1) или Т(—1); 3) комплементарные комплексы 5'-ФПО формируют два типа конформаций-«накопителей» — конформацию Т1(5') со стекинг-взаимодействием фенильной и активной групп реагента с концевой комплементарной парой комплекса и конформацию Т2(5'), в которой реагент расположен в большой бороздке двойной спирали дуплекса; 4) удлинение линкера 5'-ФПО на две метиленовые группы позволяет уменьшить энергию напряжения при образовании ПВК алкилирования оснований «назад» по атомам N7 пуринов, экспонированным в большую бороздку дуплекса, и увеличить вероятность алкилирования основания G(—3); 5) высокая селективность алкилирования 5'- и 3'-ФПО обусловлена структурным соответствием конформаций-«накопителей» с предреакционными ван-дер-ваальсовыми комплексами алкилирования нуклеофильных центров мишени; 6) олигонуклеотиды-эффекторы, комплементарные к свисающему 3'-концу мишени с позиции (+2), стабилизируют ПВК и увеличивают региоспецифичность алкилирования 5'-ФПО основания в позиции (+1); 7) эффекторы, комплементарные к свисающему 5'-концу мишени (начиная с позиции (—2)) в комплексе с 3'-ФПО увеличивают стабильность и селективность алкилирования пиримидинового основания в позиции (+1); 8) эффектор, комплементарный к 3'-концу мишени с позиции (+1), в трехкомпонентных комплексах 5'-ФПО—ЭО—мишень разрешает образование только ПВК алкилирования оснований мишени «назад», причем образование таких ПВК более эффективно для 5'-ФПО с линкером, удлиненным на две метиленовые группы; 8) эффектор, комплементарный к 5'-концу мишени, начиная с позиции (—1) в трехкомпонентных комплексах 3'-ФПО—ЭО—мишень подавляет их способность к алкилированию.

Моделирование конформационных возможностей алкилирующих реагентов способствует более глубокому пониманию механизма реакций в комплементарном комплексе в зависимости от последовательности НК-мишени и помогает определить пути усиления положительных качеств реагентов и подавления побочных эффектов.

Автор считает своим долгом выразить благодарность Д. Г. Кнорре и О. С. Федоровой за ценные 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. Volpin M. E. Harwood Acad. Publ., 1988.
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. С. 1629—1634.
5. Бросалина Б. Е., Власов В. В., Кутявин И. В., Мамаев С. В., Плетнев А. Г., Подыминов М. А. // Биоорг. химия. 1986. Т. 12. № 2. С. 240—247.
6. Зарытова В. Ф., Кутявин И. В., Сергеев Д. С., Сильников В. Н., Шишкин Г. В. // Рук. Деп. ВИНТИ № 4276—В89 от 29 июня 1989.

7. Амирханов Н. В., Зарытова В. Ф. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. № 3. С. 379—386.
8. Weiner S. J., Kollman P. A., Case D. A., Singh C. U., Chio C., Alagona G. // J. Amer. Chem. Soc. 1984. V. 106. P. 765—784.
9. Lavery R., Sklenar H., Pullman B. // J. Biomol. Struct. Dyn. 1986. V. 3. P. 1015—1031.
10. Воробьев Ю. Н. // Биоорган. химия. 1990. Т. 16. № 1. С. 69—82.
11. Воробьев Ю. Н. // Молекулярн. биология. 1989. Т. 23. В. 1. С. 80—92.
12. Воробьев Ю. Н. // Молекулярн. биология. 1989. Т. 23. В. 2. С. 545—555.
13. Воробьев Ю. Н. // Молекулярн. биология. 1990. Т. 24. В. 2. С. 467—477.
14. Breslauer K. J., Frank R., Bloker H., Marky L. A. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. P. 3746—3750.
15. Беликова А. М., Гринева Н. И., Карпова Г. Г. // Изв. СО АН СССР. Сер. хим. наук. 1970. В. 6. С. 110—116.
16. Зарытова В. Ф., Кутявин И. В., Подыминовин М. А., Сильников В. Н., Шинкин Г. В. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 9. С. 1212—1219.
17. Mingot F., Jorgano J., Davila C. // Biochim. et biophys. acta. 1976. V. 418. P. 315—321.
18. Беликова А. М., Вахрушева Т. Е., Власов В. В., Гринева Н. И., Кнорре Д. Г., Курбатов В. А. // Молекулярн. биология. 1969. Т. 3. № 2. С. 210—219.
19. Olson W. K. // Macromolecules. 1980. V. 13. P. 721—728.
20. Амирханов Н. В., Зарытова В. Ф., Левина А. С., Лохов С. Г. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. № 12. С. 1618—1626.

Поступила в редакцию
16.1.1990

Yu. N. VOROBJEV

MOLECULAR MECHANICAL STUDY OF STRUCTURAL-ENERGETICAL ASPECTS OF THE COMPLEMENTARY ADDRESSED MODIFICATION OF NUCLEIC ACIDS BY REACTIVE

4-[N-(2-CHLOROETHYL)-N-METHYLAMINO]BENZYL 3'- OR 5'-PHOSPHOROAMIDO DERIVATIVES OF OLIGONUCLEOTIDES

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

Calculations of probabilities of the complementary addressed modification of target NA by 3'- or 5'-reactive derivatives of oligonucleotides carrying a 4-[N-(2-chloroethyl)-N-methyl]aminobenzyl group attached to the 3'- or 5'-terminal phosphates through a phosphoroamide linkage have been made. It is shown that the structural basis of the high efficiency and positional specificity depending on the NA target base sequence is the extent of structural correspondence of the energetically optimal conformation of the active group in the complex to the mutual arrangement of the active group and nucleophilic site needed for the chemical reaction. The 3'-derivative has the highest dependence of efficiency and positional specificity of the alkylation on the target NA base sequence. The maximal positional specificity of the alkylation is found for the modification of the cytidine at the first position from the terminal complementary base pair at the 5'-end of the target NA. For the 5'-derivative, the alkylating ability was determined to depend on the insertion of additional methylene bridges into the standard phosphoroamide linker: two methylene groups provide for the maximal increase of the modification ability of the nucleophilic site of the target NA in the double-stranded part of the complex. The efficiency of alkylation of a target NA in a three component complex with oligonucleotide-effector also complementary to the target NA have been studied. It was found that formation of the three-component complex lead to an additional stabilization of the conformation needed for the reaction of the active group, in comparison with two-component complex, by means of the intercalation of the phenyl group of the reagent in the gap between the oligonucleotide derivative and the oligonucleotide effector.