



УДК 577.113.4 : 537.194
© 1991 г.

Ю. Н. Воробьев

**ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОМ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МЕХАНИКИ
СТРУКТУРНО-ЭНЕРГЕТИЧЕСКИХ АСПЕКТОВ
КОМПЛЕМЕНТАРНО-АДРЕСОВАННОЙ МОДИФИКАЦИИ
НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ РЕАКЦИОННОСПОСОБНЫМИ
ПРОИЗВОДНЫМИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ, НЕСУЩИХ НА 3'-КОНЦЕ
4-[N-МЕТИЛ-N-(2-ХЛОРОЭТИЛ)АМИНО]БЕНЗИЛИДЕНОВУЮ
ГРУППИРОВКУ**

Новосибирский институт биоорганической химии СО АН СССР, 630090

В работе методом молекулярной механики выполнен анализ вероятностей алкилирования нуклеофильных сайтов НК-мишени в комплементарных комплексах с реакционноспособными производными олигонуклеотидов, несущих на 3'-конце 4-[N-метил-N-(2-хлорэтил)амино]бензилиденовую группировку (3'-БПО). Результаты моделирования показывают более высокую стабильность комплементарного комплекса со стереоизомером 3'-БПО, имеющим *R*-конфигурацию атома углерода диоксаланового цикла (в дальнейшем (*R*)-эпимер) по сравнению с комплексом со стереоизомером, имеющим *S*-конфигурацию диоксаланового углерода ((*S*)-эпимер). Кроме того, эти два диастереомера должны обладать существенно различными позиционными возможностями алкилирования НК. (*R*)-Эпимеры в основном алкилируют третье основание свисающего конца НК-мишени, тогда как (*S*)-эпимеры с наибольшей вероятностью алкилируют основание мишени в терминальной комплементарной паре либо соседнее неспаренное основание. Образование комплексов алкилирования сайтов мишени сопровождается разрыхлением в случае (*S*)- и раскрытием последней комплементарной пары дуплекса в случае (*R*)-эпимеров, что снижает эффективность реагентов 3'-БПО. Результаты моделирования рассмотрены вместе с экспериментальными данными и позволяют интерпретировать их на качественно более фундаментальном структурном уровне.

Направленное воздействие на генетический аппарат клетки — актуальная задача химиотерапии вирусных заболеваний. В последние годы ведется активный поиск реакционноспособных производных олигонуклеотидов (РПО), способных подавлять экспрессию генов за счет образования комплементарных комплексов с НК [1—4]. Направленность воздействия РПО на НК-мишень обеспечивается образованием комплементарного комплекса НК с РПО и дальнейшим протеканием химической реакции в комплементарном комплексе. В настоящее время известно большое количество различных РПО, обладающих способностью к комплементарно-адресованной модификации НК. Результаты исследования химических и кинетических аспектов комплементарно-адресованной модификации НК обобщены в обзорах [1—2], однако структурные основы химических реакций в комплементарных комплексах практически не исследованы.

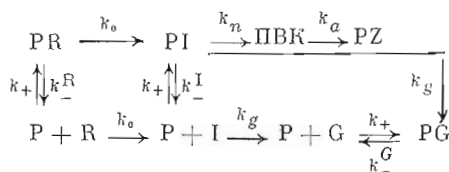
Реакционноспособные производные олигонуклеотидов, несущие на 3'-конце 4-[N-метил-N-(2-хлорэтил)амино]бензилиденовую группировку (3'-БПО), были первыми комплементарно-адресованными производными с достаточно высокой алкилирующей способностью [5—8]. Исследование конформационных перестроек, происходящих в комплементарном комплексе НК с 3'-БПО, особенно интересно, поскольку, с одной стороны, активная алкилирующая группа в 3'-БПО имеет короткий линкер и дос-

Сокращения: 3'-БПО — олигонуклеотиды, несущие на 3'-конце 4-[N-метил-N-(2-хлорэтил)амино]бензилиденовую группировку ($>RCl$), РПО — реакционноспособные производные олигонуклеотидов, ПВК — предреакционный ван-дер-ваальсов комплекс, СМС — статическая модель среды, ОЭ — олигонуклеотид-эффектор.

таточно жестко фиксирована диоксалановым циклом, с другой — основной точкой модификации НК-мишени является, как правило, достаточно удаленное основание в третьей позиции от терминальной комплементарной пары двухцепочечной части комплекса. Имеются также данные о модификации сильно удаленного основания от сайта комплементарного связывания 3'-БПО с НК [9]. Кроме того, неясно соотношение между алкилирующими возможностями двух эпимеров по хиральному атому углерода диоксаланового цикла 3'-БПО, обеспечивающих различную ориентацию алкилирующей группы в комплементарном комплексе [2]. Общая эффективность и региоспецифичность алкилирования тесно связаны с деталями пространственного строения комплементарного комплекса НК-мишени с РПО и конформационными возможностями реакционноспособной группы реагента образовывать конформацию предреакционного ван-дер-ваальсова комплекса (ПВК), являющуюся стартовым состоянием для химической стадии реакции, с необходимой ориентацией этой группы относительно нуклеофильного центра. Моделирование образования различных ПВК может быть выполнено методом молекулярной механики [10—12]. Структурно-энергетическое моделирование позволяет интерпретировать результаты экспериментов на более фундаментальном структурном уровне, что необходимо для понимания закономерностей протекания химических реакций в комплементарных комплексах и для построения общих моделей предсказания свойств и оптимальной химической структуры РПО.

Методика оценки вероятности модификации сайтов НК-мишени РПО на основе моделирования методом молекулярной механики описана нами ранее [12]. Метод молекулярной механики с учетом влияния раствора электролита в приближении статической модели среды (СМС) и его параметризация представлены в работах [13—16].

Реакцию комплементарно-адресованной модификации НК в растворе анализировали в соответствии со следующей кинетической схемой [1]:



где Р — биополимер-мишень; R — реагент; I — промежуточный этилениммониевый катион, образующийся из распада в лимитирующей стадии; ПВК_i — предреакционный ван-дер-ваальсов комплекс алкилирования *i*-го сайта мишени; PZ_i — продукт комплементарно-адресованной модификации; G — продукт гидролиза катиона I в растворе; PR, PI, PG — соответствующие комплексы с мишенью; k_+ , k_-^R , k_0 , k_n , k_a , k_g , k_-^R , k_-^I , k_-^G — константы скоростей реакций, указанных в схеме [1, 9, 12].

В растворе комплементарный комплекс НК с РПО находится в основном в своей оптимальной конформации — «накопителе», из которой путем флуктуаций возможен переход в более напряженные конформации ПВК, активные для реакции алкилирования. Энергия Δ дополнительного напряжения при образовании ПВК определяет общую эффективность алкилирующего производного, поскольку константа k_{ai} скорости алкилирования сайта *i* НК-мишени пропорциональна $\exp(-\Delta_i/kT)$; следовательно, при большой величине Δ_i увеличивается относительная вероятность реакции алкилирующей группы реагента с нуклеофилами буфера. Разность энергий между серией вероятных ПВК алкилирования сайтов, с учетом их относительной реакционной способности, определяет региоспецифичность модификации.

В настоящей работе представлены результаты расчетов вероятности образования ПВК алкилирования в комплементарных комплексах НК-мишени с 3'-БПО, которые алкилируют по механизму S_N1 через образование в лимитирующей стадии этилениммониевого катиона [1—2]. Как показано [12], эффективность и распределение алкилирования по нуклеофиль-

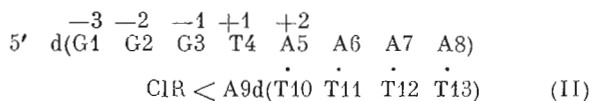
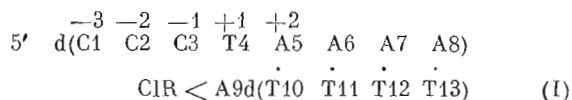
ным сайтам НК-мишени определяются концентрацией ПВК, в которых реагент находится в промежуточном состоянии этилениммониевого катиона, а расстояние между атомом N^+ катиона и атакуемым нуклеофильным центром составляет $\sim 4 \text{ \AA}$. Расчет энергии методом молекулярной механики выполнен оптимизацией по совокупности спиральных параметров, углов внутреннего вращения и валентных углов диоксаланового цикла комплементарных комплексов 3'-БПО с НК-мишени (подробно см. [12]).

Проведен анализ влияния дополнительных олигонуклеотидов-эффекторов, комплементарных к НК-мишени и примыкающих к 3'-концу 3'-БПО. В отличие от ситуации для комплементарных комплексов с 3'- и 5'-фосфамидных производных олигонуклеотидов, несущих 4-[N-метил-N-(2-хлорэтил)амино]бензильную группировку, присоединенную через фосфамидную связь [17], образование трехкомпонентных комплементарных комплексов НК-мишень—3'-БПО—эффектор не приводит к увеличению стабильности комплексов и повышению селективности алкилирования нуклеофильных центров НК-мишени.

Конформационные возможности 3'-бензилиденовых реакционноспособных производных олигонуклеотидов

Возможность направленного воздействия на НК впервые была показана с помощью 3'-БПО [2, 5, 6]. Особенностью 3'-БПО является конформационно жесткое присоединение реакционноспособной группы к олигонуклеотиду через диоксалановый цикл (рис. 1). Атом углерода диоксаланового цикла, связанный с фенилом, является хиральным. (*R*)- и (*S*)-Эпимеры обеспечивают различную ориентацию фенильной и активной групп реагента относительно диоксаланового цикла, рибозы и основания концевой нуклеотида. Стереизомер (*S*) дает *цис*-, а (*R*) — *транс*-конфигурацию бензилиденового катиона относительно рибозы и 3'-концевого основания олигонуклеотида [2].

Моделирование ПВК 3'-БПО выполнено для комплементарных комплексов I, II, чтобы выяснить возможности алкилирования пуринов и пиримидинов:



Результаты расчетов энергий ПВК комплементарных комплексов (*S*)-, (*R*)-стереоизомеров 3'-БПО с НК приведены в табл. 1. Прежде всего из табл. 1 видно, что стабильность комплементарных комплексов (*S*)- и (*R*)-стереоизомеров 3'-БПО различна. Более стабильные комплексы образуют (*R*)-стереоизомеры. Структуры наиболее энергетически выгодных конформаций-«накопителей» комплементарных комплексов стереоизомеров *S0*, *R0* приведены на рис. 2, а конформационные параметры *n*-диалкиламинобензилиденового остатка — в табл. 2. Этилениммониевый катион и фенильное кольцо реагента в конформации-«накопителе» *R0* стереоизомера (*R*) экспонированы в растворитель и слабо взаимодействуют с НК-мишенью. Напротив, в оптимальной конформации *S0* фенильная и активная группы реагента сближены со стороны малой бороздки дуплекса с основаниями в позициях (—1) и (+1) НК-мишени.

Анализ отдельных энергетических вкладов (см. табл. 1) показывает, что в конформации *S0* комплементарный комплекс имеет более выгодную ван-дер-ваальсову и электростатическую энергии по сравнению с их величинами в *R0*-конформации. Взаимодействие комплексов 3'-БПО с растворителем более оптимально в *R0*-конформации. Реагент в *S0*-конформации вытесняет молекулы воды от полярных атомов O2 и N3 оснований

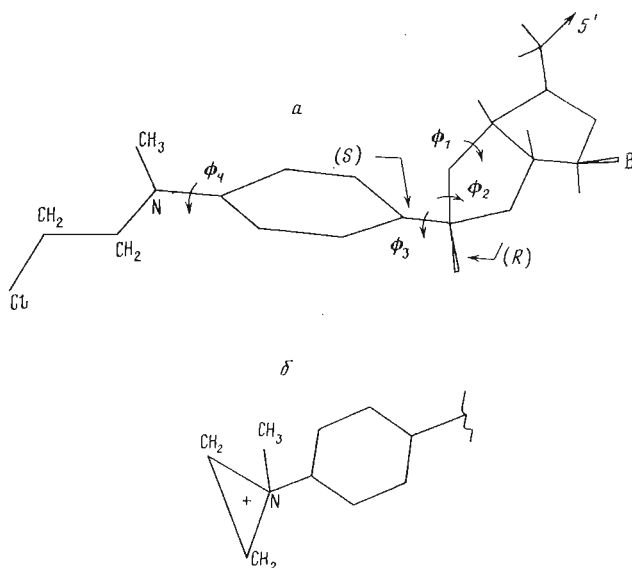


Рис. 1. Реакционноспособные 3'-бензилиденовые производные олигонуклеотидов: *a* — реагент RCl, присоединенный к рибозе 3'-концевого нуклеотида; *b* — ионизированная активная форма этилениммониевого катиона реагента RCl

в позициях +1, —1 НК-мишени, формирующих водный хребет в малой бороздке В-формы дуплекса [16, 18, 19]. Разница в стабильности комплементарных комплексов 3'-БПО в конформациях *R0*, *S0* зависит от последовательности оснований НК-мишени, поскольку различные последовательности НК гидратируются по-разному. Так как наиболее совершенный стабилизирующий водный хребет формируется в малой бороздке дуплекса poly(dA)·poly(dT) [16, 18—20], то следует ожидать, что наибольшая разность стабильностей между конформациями *R0* и *S0* будет соответствовать комплексам 3'-БПО с poly(dA) либо poly(dT).

Следует отметить, что в начальный момент времени после смешивания растворов НК-мишени с 3'-БПО и образования дуплекса 3'-БПО — мишень активная группа реагента RCl находится в неионизированной форме. Ионизация RCl происходит в комплементарном комплексе. Поскольку константа скорости (k_0) ионизации RCl мала ($k_0 \sim 10^{-4} \text{ с}^{-1}$), то в условиях, когда константа скорости диссоциации $k_d > k_0$, относительные концентрации комплексов в конформациях *R0* и *S0* будут определяться разностью энергий исходных комплементарных комплексов с неионизированным реагентом, так как комплексы не успевают диссоциировать за время реакции этилениммониевого катиона с нуклеофильным сайтом мишени [12]. Далее, так как константа скорости образования ПВК много больше k_d , равновесным является только распределение в семействе ПВК, относящихся к одному типу стереоизомера. Расчеты показывают, что в нейтральном состоянии реагента RCl относительная стабильность конформаций *R0* возрастает по сравнению с *S0*, так как отсутствует электростатическая стабилизация конформации *S0*, проявляющаяся в катионной форме.

Разница в стабильности комплементарных комплексов, образуемых (*S*)- и (*R*)-стереоизомерами 3'-БПО, приводит к относительному повышению концентрации более стабильных комплементарных комплексов стереоизомеров (*R*), поэтому алкилирование НК-мишени в условиях избытка реагента будет осуществляться преимущественно (*R*)-стереоизомерами 3'-БПО.

Расчеты, приведенные в табл. 1, показывают, что (*S*)- и (*R*)-стереоизомеры склонны к образованию ПВК алкилирования разных оснований НК-мишени. Из рис. 2 видно, что этилениммониевый катион в оптимальной конформации *S0* ориентирован в сторону малой бороздки комплементарного комплекса и сближен с атомами N3 C(−1), N3 A(+1) или O2

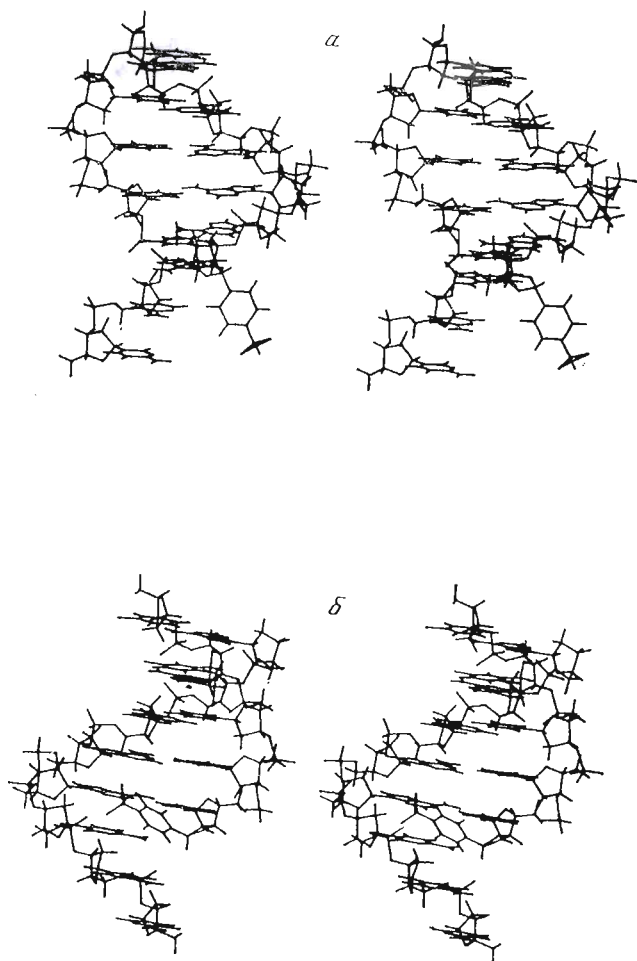


Рис. 2. Стереорисунки оптимальных конформаций комплексов 3'-БПО с НК: конформация-«накопитель» *R0* стереоизомера (*R*) (а) и *S0* стереоизомера (*S*) (б)

пиримидина в позиции (+1). Это предопределяет наивероятное алкилирование перечисленных нуклеофильных центров, экспонированных в малую бороздку дуплекса. Расчет энергий образования ПВК (*S*)-стереоизомерами 3'-БПО показывает, что наиболее вероятными сайтами алкилирования являются пиримидины в позициях (−1), (+1). Образование ПВК алкилирования по позиции (−1) сопровождается сильным разрывлением водородных связей в комплементарной концевой А·Т-паре (рис. 3). Образование ПВК алкилирования основания Т(+1) по атому О2 происходит с меньшим возмущением концевой комплементарной пары. Энергии образования ПВК алкилирования пиримидинов по мере удаления от позиции (−1) в сторону 5'-конца быстро увеличиваются, так как структуры комплексов, соответствующие этим ПВК, обладают полностью разрушенной концевой комплементарной парой и слабыми ван-дер-ваальсовыми и электростатическими взаимодействиями.

Из данных, приведенных в табл. 1, видно, что при образовании ПВК алкилирования (*S*)-стереоизомерами 3'-БПО минимальная энергия дополнительного напряжения Δ , определяющая эффективность РПО, равна 3—4 ккал/моль, т. е. заметно выше, чем для фосфамидных РПО [17]. Эффективность образования ПВК алкилирования (*S*)-стереоизомером 3'-БПО можно повысить, увеличивая длину линкера и конформационную подвижность активной группы реагента вставкой из двух метиленовых групп между диоксалановым циклом и фенилом (реагент $R'Cl$, см. табл. 1). Удлинение линкера позволяет практически исключить разрывление тер-

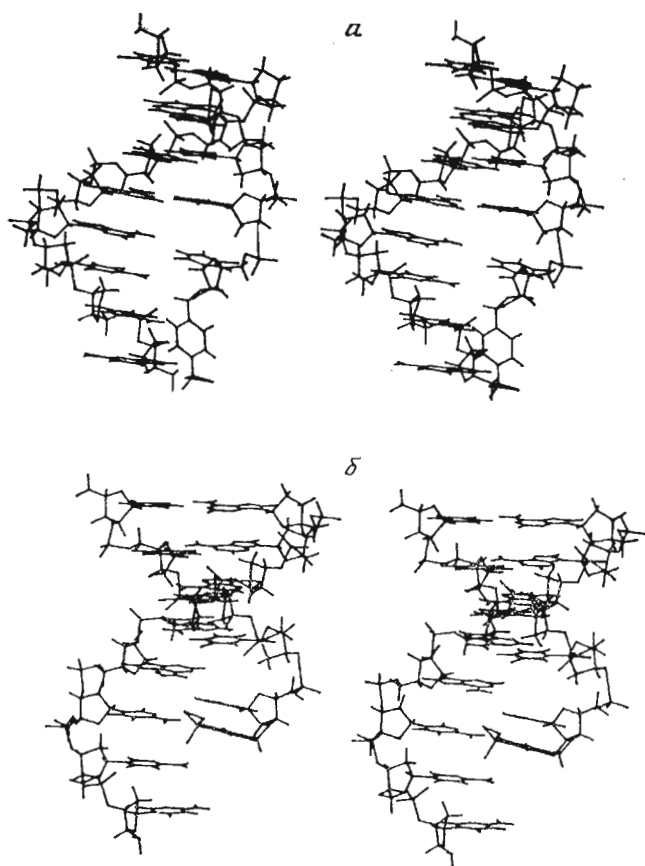


Рис. 3. Стереорисунки конформаций наиболее вероятных ПВК комплекса 3'-БПО с НК: *a* — ПВК алкилирования основания G(—3) по атому N7 стереоизомером (*R*); *б* — ПВК алкилирования C(—1) по атому N3 стереоизомером (*S*)

минальной комплементарной пары и деформацию дуплекса при образовании ПВК алкилирования оснований в позициях (+1), (—1) (рис. 4). Конформационные характеристики такого модифицированного 3'-БПО оказываются близкими к оптимальным, так как конформация-«накопитель» *S0* имеет хорошее структурное соответствие ПВК алкилирования, а энтропийные потери при замораживании двух степеней внутреннего вращения незначительны.

Направленность алкилирования (*R*)-стереоизомерами 3'-БПО совершенно иная по сравнению с (*S*)-стереоизомерами. Этилениммониевый катион в оптимальной *R0*-конформации (см. рис. 2*a*) ориентирован в направлении 5'-конца НК-мишени со стороны большой бороздки, что повышает вероятность алкилирования удаленных пуриновых оснований. Структура наиболее вероятного ПВК алкилирования основания G(—3) по атому N7 приведена на рис. 3*a*. Видно, что для сближения этилениммониевого катиона с атомом N7 при образовании ПВК необходим разрыв концевой комплементарной пары и включение степеней свободы концевого нуклеотида 3'-БПО, конформация которого существенно изменяется по сравнению с состоянием в В-форме. Это следствие слишком жесткого крепления реагента к олигонуклеотиду коротким линкером. Сближению этилениммониевого катиона с атомом N7 G(—3) способствует дополнительное закручивание оснований спирали на угол 15—20° с затратой энергии порядка *RT* на каждом шаге в свисающем конце мишени, так как одноцепочечные структуры обладают существенно большей конформационной подвижностью по сравнению с двухцепочечными [21, 22]. Расположение этилениммониевого катиона в окрестности атома N7 G(—3)

Энергия образования ПВК алкилирования нуклеиновых кислот (S)- и (R)-стереоизомерами 3'-БПО (ккал/моль) *

Комп-лекс	Конформер комплекса	E_v	E_{el}	E_g	E_{ws}	E_t	E_d	E_{tot}	Δ
	Конформация-«накопитель»								
(I)	S0	-91,9	-38,4	-406,5	-44,4	22,7	4,5	-554,0	
(I)	S0 **	-92,8	-38,6	-405,3	-44,3	22,7	4,5	-554,8	
(I)	R0	-87,3	-36,6	-414,3	-47,9	21,8	4,4	-559,9	
	ПВК								
(II)	R, G(-3)N7	-83,2	-34,7	-416,4	-48,1	26,3	5,7	-550,4	3,0 ***
(I)	S, C(-1)N3	-85,1	-35,4	-412,8	-46,6	22,8	6,8	-550,3	3,7
(I)	S, A(+1)N3	-85,2	-36,7	-410,1	-46,5	22,9	7,3	-548,4	
(I)	S, T(+1)N3	-88,3	-39,3	-408,2	-44,1	23,2	6,8	-549,8	4,2
(I)	S **, T(+1)N3	-90,1	-39,4	-406,7	-44,1	23,1	4,7	-552,4	2,4
(II)	R, G(-2)N7	-82,3	-34,2	-413,1	-47,3	26,4	6,3	-544,2	
(I)	S, C(-2)N3	-80,7	-33,8	-413,7	-46,0	25,5	6,4	-542,3	
(I)	S, C(-3)N3	-75,5	-30,5	-414,5	-49,1	25,1	6,3	-538,2	
(I)	R, C(-3)N3	-82,6	-31,7	-409,8	-46,2	26,1	6,7	-537,5	

* 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 (более подробно методику расчетов см. в [12]), Δ — энергия дополнительного напряжения при образовании ПВК из конформации-«накопителя».

** Реагент RCl с удлинённым на два метиленовых звена линкером.

*** Энергия образования с учетом увеличения энтропии (см. текст).

Таблица 2

Значения внутренних углов вращения * (градусы) в 3'-БПО для оптимальных конформаций-«накопителей»

Конформация-«накопитель»	Φ_1	Φ_2	Φ_3	Φ_4
S0	25,7	-17,6	109,0	82,9
R0	28,1	-23,9	100,9	91,4

* Углы вращения см. рис. 1.

электростатически выгодно, так как соседство атома N7 с 5'-фосфатной группой увеличивает отрицательный электростатический потенциал в его окрестности [22, 23] и оптимизирует электростатическую энергию катиона. Энергия ПВК алкилирования G(-2) повышается по сравнению с энергией ПВК алкилирования G(-3) на 6 ккал/моль (см. табл. 1). Оптимальным ПВК алкилирования пиримидиновых оснований свисающего конца НК-мишени является ПВК алкилирования N3 C(-3), причем энергия образования ПВК алкилирования удаленных пиримидиновых оснований выше, чем для пуринов (см. табл. 1). Это результат ослабления электростатических взаимодействий бензилденового катиона с НК-мишенью со стороны малой бороздки и уменьшения вклада растворителя в стабилизацию комплекса, так как фенильное кольцо реагента экранирует взаимодействие полярных атомов оснований C(-2) и C(-1) с молекулами воды.

Необходимость разрыва концевой комплементарной пары в комплексе (R)-стереоизомера 3'-БПО при образовании ПВК алкилирования как G(-3), так и других сайтов позволяет заключить, что свободная энергия образования этого ПВК алкилирования уменьшается в ряду комплексов с основаниями G, C, A, T(U) на 3'-конце 3'-БПО на ~2 ккал/моль. Разрыв А·Т-пары наиболее легок, а выведение пиримидинового основания из стопочных взаимодействий в 3'-БПО дает наименьшие потери энергии [22, 24].

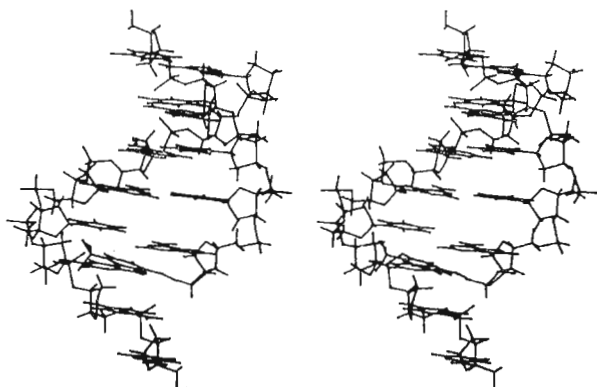


Рис. 4. Стереорисунок оптимального ПВК алкилирования T(+1)O2 (S)-стереоизомером 3'-БПО с удлинненным на две метиленовые группы реагентом R'Cl

Обсудим соответствие между результатами структурно-энергетического моделирования образования ПВК алкилирования и экспериментальными данными по алкилированию 3'-БПО (табл. 3). Экспериментальные результаты по направленности алкилирования в комплементарных комплексах дезоксиолигонуклеотидов получены в работах [25—27] и обобщены в обзорах [1, 2]. Алкилирование длинного одноцепочечного фрагмента копии ДНК вируса клещевого энцефалита смесью (S)- и (R)-стереоизомеров 3'-БПО при большом избытке реагента приводит в основном к модификации основания G(—3) [26]. Аналогичные результаты были получены при алкилировании модельного додекадезоксинуклеотида [24, 26], содержащего G в позиции (—3). Если в позиции (—3) находится пиримидин, то он также алкилируется с наибольшей вероятностью [27].

Более поздние эксперименты [28] по алкилированию двукратным избытком смеси диастереомеров 3'-БПО модельного дезоксиолигонуклеотида показали минорное алкилирование основания T в позиции (+1). Расчеты дают, что стереоизомер (R) 3'-БПО алкилирует нуклеофильные сайты оснований, удаленных от двухцепочечного участка. Следует отметить, что наблюдаемое преимущественное алкилирование 5'-концевой фосфатной группы мишени в позиции (—4) [23] не противоречит расчетам моделей ПВК, поскольку концевая 5'-фосфатная группа обладает большой конформационной подвижностью и легко приближается к атому N7 пуринов в позициях (—3) и (—4). Бензилиденный катион в конформации комплекса, близкой к ПВК алкилирования атома N7 Pur(—3), становится электростатической скрепкой, располагаясь между отрицательно заряженными группами — атомом N7 и OH-группой концевого фосфата. Преимущественная модификация концевого фосфата в данном случае объясняется недостаточной реакционной способностью атомов N7 оснований аденина в позициях (—3), (—4), компенсирующей некоторое повышение энергии при образовании ПВК алкилирования концевого фосфата относительно энергии ПВК алкилирования A(—3) по атому N7.

Таким образом, видно, что результаты моделирования ПВК алкилирования НК-мишени в комплементарных комплексах с 3'-БПО позволяют понять кажущуюся несогласованность результатов экспериментов по алкилированию НК-мишеней смесью диастереомеров [25—28] в условиях различной степени модификации мишени. При низкой степени модификации (менее 60%) более вероятно предположение о высокой скорости диссоциации комплементарных комплексов и выполнении условия $k_d > k_0$, при котором образование и распад комплементарных комплексов находится в условиях термодинамического равновесия [1, 9]. В этом случае преобладающая модификация основания G(—3) в комплексах V, VI (см. табл. 3), согласно расчетам, объясняется преимущественным образованием более прочных комплексов с (R)-стереоизомерами 3'-БПО по сравнению с (S)-стереоизомерами. В экспериментах с высокой степенью

Направленность алкилирования в комплементарных комплексах 3'-БПО

Комплекс	Структура	Основные сайты алкилирования *	Источник данных; стереоизомер
III	5' d(CCCA AAAA) R < rTd(TTTT)	A(+1) $\gg$ G(-3) 1 10 ⁻²	Расчет; (S)
IV	5' d(GGGA AAAA) R < rTd(TTTT)	G(-3) > PH(-3) $\gg$ G(2) 1 10 ⁻¹ 10 ⁻³	Расчет; (R)
V	5' d(GCCT AAAA) R < rAd(TTTT)	T(+1) > G(-3) 1 10 ²	Расчет; (S)
VI	5' d(GCCT AAAA) R < rAd(TTTT)	G(-3) > PH(-3) $\gg$ C(-2) 1 10 ⁻¹ 10 ⁻³	Расчет; (R)
VII	5' d(XXCC T GTTTGGC) R < rAd(CAAACCG)	X(-3) **	Эксп. [25—27], смесь стереоизо- меров
		X(-3)	Расчет; (R)
		T(+1)	Расчет; (S)
VIII **	5' d(TGAAT GGGAAA) ...*** R < rAd(CCCTTT)	G(-3)	Эксп. [26]; смесь стереоизо- меров
		G(-3)	Расчет; (R)
IX	5' d(AACCT GTTTGG) R < rAd(CAAACC)	Ph(-4) $\gg$ T(+1) 1 0,1	Эксп. [28]; смесь стереоизо- меров

* Под сайтами приведена относительная вероятность их алкилирования.

** Любое из оснований G, C, A, T.

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

модификации НК-мишени неравенство $k_d > k_0$, по-видимому, не выполняется, поэтому процесс образования комплементарных комплексов является неравновесным [29]. В этих условиях доля комплементарных комплексов из (S)-стереоизомеров, успевающих пройти все стадии реакции алкилирования и дать конечный продукт, возрастает, поэтому появляются продукты алкилирования основания T(+1) (S)-стереоизомерами 3'-БПО [28].

Комплементарные комплексы 3'-БПО с олигонуклеотидами-эффекторами

Олигонуклеотидом-эффектором (ОЭ) называется олигонуклеотид, комплементарный участку НК-мишени в стыке с комплементарным комплексом мишень—РПО. Результаты моделирования комплементарных комплексов 3'-БПО с ОЭ показывают, что специфичность строения ПВК не позволяет стабилизировать их взаимодействием с ОЭ, состыкованного с 3'-концом 3'-БПО. В оптимальной конформации «накопителя» S0 (см. рис. 2б) фенильное кольцо реагента выдвинуто в сторону малой бороздки и практически копланарно концевой комплементарной паре дуплекса НК-мишень—3'-БПО. Казалось бы, такое строение комплекса позволяет упрочнить его взаимодействием с эффектором, комплементарным мишени в позиции (-1) (см. рис. 2а), поскольку конформация «накопителя» S0 могла бы стабилизироваться стекинг-взаимодействием триплета, состоящего из концевой комплементарной пары и фенильного кольца реагента, с комплементарной парой комплекса мишень—эффектор. Однако моделирование показало, что стерические взаимодействия между диоксалановым циклом 3'-БПО и 5'-рибозой ОЭ (рис. 5а) ведут к дестабилизации всего комплекса. По-видимому, стабилизация конформации S0 3'-БПО может быть достигнута, если ОЭ имеет на 5'-конце гетероциклическую стабилизирующую группировку, например типа феназиниевых производных олигонуклеотидов [30], и комплементарен НК-мишени начиная с позиции (-1). В этом случае стабилизирующим фактором будет стопоч-

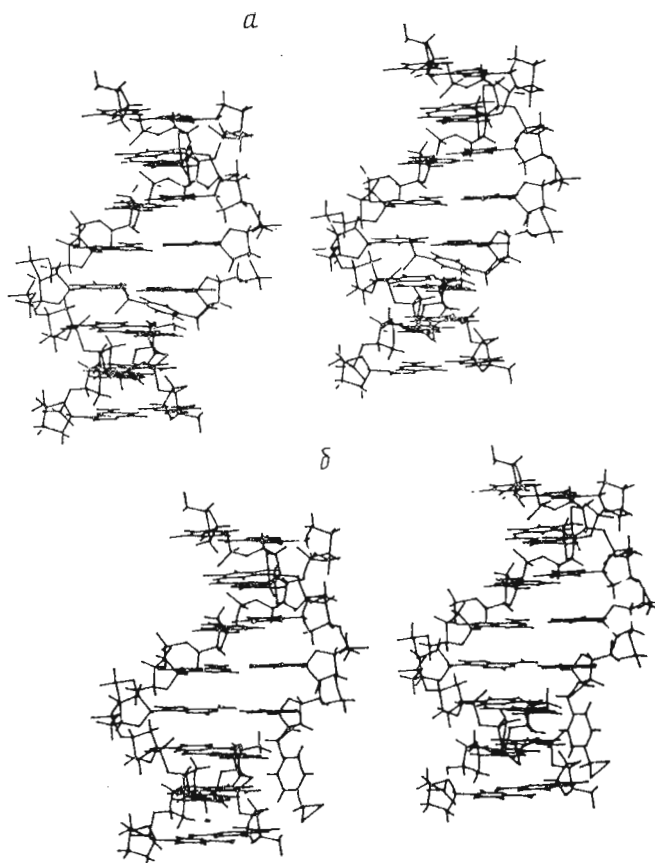


Рис. 5. Стереорисунки оптимальных конформаций комплекса 3'-ПБО с олигонуклеотидом-эффектором, плотно примыкающим к 3'-концу 3'-ПБО:
a — (*S*)-стереоизомер, *b* — (*R*)-стереоизомер

ное взаимодействие гетероциклической группировки, нитеркалирующей встык между двухцепочечными участками НК-мишень—3'-БПО и НК-мишень — ОЭ, с триплетом из терминальной пары и фенильного кольца реагента.

Далее, в оптимальной конформации *R0* реагент расположен со стороны цепи эффектора, комплементарной к НК-мишени, поэтому в трехкомпонентном комплексе реагент вытесняется олигонуклеотидом-эффектором в одну из бороздок. Более вероятно вытеснение реагента в большую бороздку с разрушением концевых комплементарных пар 3'-БПО и ОЭ с НК-мишени. Эти конформационные возмущения в трехкомпонентном комплексе (*R*)-стереоизомера 3'-БПО с эффектором понижают парциальную стабильность комплекса 3'-БПО с НК-мишени.

Выводы

Структурно-энергетическое моделирование механизма алкилирования реакционноспособными 3'-бензилиденовыми производными олигонуклеотидов, выполненное в настоящей работе, позволяет сделать выводы: 1) комплементарные комплексы из (*R*)- и (*S*)-эпимеров по хиральному атому оксаланового цикла 3'-БПО обеспечивают резко отличные ориентации реагента относительно НК-мишени и имеют по одной конформации «накопителю» *S0* и *R0* с разной стабильностью; 2) большая стабильность *R0*-конформации приводит к преимущественному формированию комплементарных комплексов и алкилированию (*R*)-стереоизомера 3'-БПО в условиях равновесного образования комплементарных комплексов, когда константа скорости диссоциации больше скорости лимитирующей стадии реакции алкилирования ($k_d > k_0$); 3) наиболее вероятно алки-

лирование (*R*)-стереоизомером 3'-БПО по G(−3) с разрывом концевой комплементарной пары комплекса; 4) (*S*)-стереоизомеры образуют ПВК алкилирования оснований в позициях (−1), (+1) по нуклеофильным сайтам, открытым в малую бороздку дуплекса; 5) образование ПВК алкилирования 3'-БПО сопровождается возмущением и напряжением В-формы двойной спирали на $\Delta \sim 3$ ккал/моль, поэтому эффективность 3'-БПО не оптимальна; 6) увеличение конформационной подвижности (*S*)-стереоизомера 3'-БПО вставкой двух метиленовых групп между фенилом и оксалановым циклом снижает деформацию дуплекса при образовании ПВК алкилирования позиций (−1), (+1) и повышает эффективность реагента; 7) олигонуклеотиды-эффе́кторы, комплементарные к 5'-концу НК-мишени, понижают стабильность комплементарных комплексов 3'-БПО и уменьшают их алкилирующую способность; 8) стабилизация ПВК алкилирования позиции (+1) (*S*)-стереоизомерами 3'-БПО возможна в трехкомпонентных комплексах с ОЭ, несущим на 5'-конце плоскую незаряженную гетероциклическую группировку и комплементарным 5'-концу НК-мишени, начиная с позиции (−1).

Автор выражает благодарность Д. Г. Кнорре и О. С. Федоровой за полезные замечания.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Knorre D. G., Vlasov V. V. Affinity modification of biopolymers. CRC Press, Boca Raton, 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. Agris C. H., Blake K. R., Miller P. S., Reddy M. P., Ts'O P. O. P. // Biochemistry. 1986. V. 25. № 20. P. 6268—6275.
4. Zon G. // J. Protein Chem. 1987. V. 6. № 2. P. 131—145.
5. Grineva N. I., Karpova G. G. // FEBS Lett. 1973. V. 32. P. 351—356.
6. Гринева Н. И., Карпова Г. Г. // Молекуляр. биология. 1974. Т. 8. № 2. С. 832—844.
7. Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Карпова Г. Г., Кнорре Д. Г., Пичко Н. П., Райт А. С., Стефанович Л. Е. // Биоорг. химия. 1981. Т. 7. № 10. С. 1512—1522.
8. Абрамова Т. В., Кнорре Д. Г., Лебедев А. В., Пичко Н. П., Федорова О. С. // Биоорг. химия. 1985. Т. 11. № 12. С. 1642—1649.
9. Власов В. В., Кнорре Д. Г., Кутявин И. В., Маммаев С. В., Подуст Л. М., Федорова О. С. // Биоорг. химия. 1987. Т. 13. № 9. С. 1221—1229.
10. 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.
11. Lavery R., Sklenar H., Pullman B. // J. Biomol. Struct. Dyn. 1986. V. 3. P. 1015—1031.
12. Воробьев Ю. Н. // Биоорг. химия. 1990. Т. 16. № 1. С. 69—82.
13. Воробьев Ю. Н. // Молекуляр. биология. 1989. Т. 23. № 1. С. 80—92.
14. Воробьев Ю. Н. // Молекуляр. биология. 1989. Т. 23. № 2. С. 545—555.
15. Vorobjev Yu. N. // Biopolymers. 1990. In press.
16. Воробьев Ю. Н. // Молекуляр. биология. 1989. Т. 23. № 1. С. 68—76.
17. Воробьев Ю. Н. // Биоорг. химия. 1991. Т. 17. № 2. С. 197—210.
18. Chuprina V. P. // Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. P. 293—311.
19. Букин В. А. // Молекуляр. биология. 1987. Т. 21. С. 615—629.
20. Poltev V. I., Terplukhin A. V., Chuprina V. P. // J. Biomolec. Struct. Dyn. 1988. V. 6. № 3. P. 575—586.
21. Mingot F., Jorcano J., Davila C. // Biochim. et biophys. acta. 1976. V. 418. P. 315—321.
22. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот. М.: Мир, 1987.
23. Perahia D., Pullman A., Pullman B. // Int. J. Quant. Chem. Biol. Symp. 6. 1979. P. 353—363.
24. Breslawer K. J., Frank R., Bloker H., Marky L. A. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. P. 3746—3750.
25. Горн В. В., Карпова Г. Г., Кнорре Д. Г., Кутявин И. В., Пичко Н. Н. // Биоорг. химия. 1982. Т. 8. № 9. С. 1225—1234.
26. Vlasov V. V., Zarytova V. F., Kutayavin I. V., Mamaev S. N., Podyminogin M. A. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 11. P. 4065.
27. Горн В. В., Карпова Г. Г., Кнорре Д. Г., Кутявин И. В., Пичко Н. Н. // Докл. АН СССР. 1983. Т. 270. № 3. С. 613—615.
28. Зарытова В. Ф., Кутявин И. В., Подыминогин М. А., Сильников В. Н., Шишкин Г. В. // Биоорг. химия. 1987. Т. 13. № 9. С. 1212—1220.

29. Кнорре Д. Г., Федорова О. С. // Докл. АН СССР. 1990. Т. 313. № 1. С. 222—224.
30. Зарытова В. Ф., Кутявин И. В., Левина А. С., Мамеев С. В., Подыминов М. А. // Докл. АН СССР. 1988. Т. 30. № 1. С. 102—105.

Поступила в редакцию
16.I.1990

Yu. N. VOROBJEV

MOLECULAR MECHANICAL STUDY OF STRUCTURAL-ENERGETICAL
ASPECTS OF THE COMPLEMENTARY ADDRESSED MODIFICATION OF
NUCLEIC ACIDS BY REACTIVE DERIVATIVES OF OLIGONUCLEOTIDES
CARRYING A 3'-TERMINAL
4-[N-(2-CHLOROETHYL)-N-METHYLAMINO]BENZYLIDEN GROUP

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

Calculations of probabilities of the complementary addressed modification of a target nucleic acid by derivatives of oligonucleotides carrying a 4-[N-(2-chloroethyl)-N-methyl]aminobenzylidene group attached to the 3'-end (3'-BDO) have been made. The results show that the complementary complex of a target NA with 3'-BDO having R-configuration of carbon atom of the dioxalane ring is more stable than the complex including the S-stereoisomer. The S- and R-epimeres of 3'-BDO have essentially different positional abilities for alkylation of the target. The R-epimer alkylates best of all the third base of the target NA from terminal complementary pair of the complex. The S-epimer has another site the most sensitive to alkylation, which is a terminal complementary base of the target NA or the adjacent nonpaired base. Formation of the alkylation complexes are accompanied with a loss or a breakdown of hydrogen bonds in the terminal complementary base pair, thus decreasing the efficiency of alkylation. The modelling results are considered along with experimental data on modification, which therefore can be interpreted on the fundamental structural level.