



УДК 577.113.011.6:577.113.4

ИЗУЧЕНИЕ ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРЫ ОДНОЦЕПОЧЕЧНОГО ФРАГМЕНТА ДНК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РЕАКЦИИ САМОМОДИФИКАЦИИ

© 1997 г. Е. В. Биченкова, А. Адина-Зада, О. С. Федорова[#]Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН,
630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8

Поступила в редакцию 24.01.96 г.

С использованием электрофоретического анализа продуктов химической деструкции по остаткам модифицированных оснований определена позиционная направленность в реакции самоалкилирования 26-звенного фрагмента ДНК рТТGCCTTGAATGGGAAGAGGGTCAATT* (T26), содержащего ковалентно присоединенную на 5'-концевом фосфате 4-[N-метил-N-(2-хлорэтил)амино]бензиламидную группу (CIR-), как в отсутствие, так и в присутствии олигонуклеотида-эффектора (Phn-L)рTGACCCCTCr(L-Phn), где Phn – остаток N-(2-гидроксиэтил)феназиния, L – этилендиаминовый линкер. С помощью молекулярного моделирования по методу молекулярной механики/динамики (ММ/D) проведено изучение вторичной структуры конъюгата CIR-T26 и найдено объяснение изменения позиционной направленности реакции алкилирования им в присутствии эффектора.

Ключевые слова: олигонуклеотиды, алкилирование, структура, молекулярное моделирование.

Известно, что молекулы РНК имеют сложную вторичную и третичную структуры вследствие наличия в полинуклеотидной последовательности самокомплементарных участков. Аналогичным свойством обладают и одноцепочечные ДНК, например длинные синтетические олигонуклеотиды или фаговые ДНК. Так, ранее мы обнаружили [1], что даже додекануклеотид рССССТGTTTGGC образует шпильчатую структуру за счет формирования двух G·C-пар. При модификации одноцепочечных ДНК-мишеней алкилирующим производным дезоксирибоолигонуклеотида рТСТТСССА в составе комплементарных комплексов было показано, что с увеличением длины ДНК-мишени эффективная константа ассоциации реагента с мишенью уменьшается с увеличением длины мишени [2, 3]. Это являлось косвенным указанием на возможность вовлечения участка связывания реагента в формирование пространственной структуры.

Аналогичная ситуация имела место при исследовании получаемых из данных по модификации количественных характеристик кооперативного связывания алкилирующего производного олигонуклеотида (CIR)рТТСССА в присутствии эффекторов – дифеназиниевых производных (Phn-L)рТТСАAGGCTCr(L-Phn) (E₁) и (Phn-L)рTGACCCCTCr(L-Phn) (E₂), где CIR – 4-[N-метил-N-(2-хлорэтил)амино]бензиламидная группа, Phn – остаток (2-гидро-

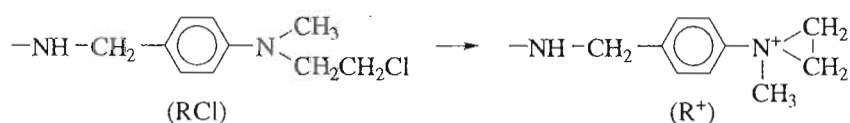
ксиэтил)феназиния, L – этилендиаминовый линкер – в составе тандемного комплекса с мишенью рТТGCCTTGAATGGGAAGAGGGTCAATT [4]. Рассчитываемые при этом величины эффективных параметров кооперативности, характеризующих взаимное влияние реагента и эффекторов при связывании их на соседних участках комплементарной мишени, свидетельствовали о том, что мишень как в отсутствие эффекторов, так и в присутствии одного из них образует структуру, препятствующую связыванию реагента.

Очевидно, что для детального изучения кинетических и термодинамических аспектов реакций, протекающих в составе тандемных комплексов, необходимо иметь наиболее полное представление о возможных вторичных структурах, формируемых компонентами в растворе. Качественную информацию о пространственной структуре одноцепочечных фрагментов ДНК можно получить с использованием реакции самомодификации исследуемых соединений путем введения в определенную точку ДНК какой-либо реакционноспособной группы. Ранее этот прием был предложен для исследования пространственной структуры тРНК [5, 6]. В настоящей работе этот подход продемонстрирован на примере реакции самоалкилирования 26-звенного фрагмента ДНК рТТGCCTTGAATGGGAAGAGGGTCAATT (T26), содержащего ковалентно присоединенную на 5'-концевом фосфате 4-[N-метил-N-(2-хлорэтил)амино]бензиламидную группу (CIR) (CIR-T26), как в

* В обозначениях дезоксирибоолигонуклеотидов префикс “d” везде опущен.

[#] Автор для переписки.

отсутствие, так и в присутствии олигонуклеотида-эффектора E_2 . С помощью электрофоретического анализа продуктов химической деструкции T26 по остаткам модифицированных оснований определена позиционная направленность в реакции самоалкилирования CIR-T26 самого, а также в системе CIR-T26· E_2 . Методом молекулярной механики (ММ) в газовой фазе осуществлено моделирование энергетически возможных вторичных структур T26, а также различных предреакционных состояний R^+ -T26 и R^+ -T26· E_2 в составе некоторых вторичных структур, где R^+ – остаток алкилирующей группировки в ионизованном состоянии. Сопоставление экспериментальных данных по распределению продуктов самомодифика-



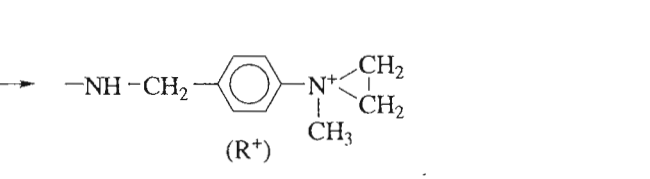
Этилениммониевый катион в нелимитирующей стадии алкилирует гетероциклические основания НК преимущественно по N7-атому остатков гуанозина с образованием ковалентного аддукта G^+-R [7]. Анализ продуктов модификации основан на последующей пиперидиновой обработке ковалентных аддуктов в стандартных условиях [8], приводящей к отщеплению модифицированных оснований и разрыву фосфодиэфирных связей в рибозофосфатном остове в области модифицированных нуклеотидных звеньев с образованием фрагментов $r(N_7)_p$. Первичная структура последних может быть установлена путем сопоставления соответствующих пятен радиоавтографа электрофоретического разделения продуктов модификации с пятнами, соответствующими аналогичным фрагментам мишени, получаемым в процессе ее химической деградации по методу Макса-Гилберта [8].

Анализ распределения продуктов самомодификации CIR-T26. На начальной стадии исследования был проведен анализ распределения продуктов самомодификации CIR-T26 по остаткам гуанозинов. Из рис. 1 видно, что в денатурирующих условиях, способствующих разрушению вторичной структуры T26, происходит слабая модификация остатка G^3 , находящегося вблизи реакционноспособной группы, а также незначительная модификация остатка G^{17} (сектор В). В различных экспериментах степень модификации по этим нуклеотидным звеньям колебалась от 6 до 14% для G^3 и от 0 до 10% для G^{17} , что находится в пределах ошибки эксперимента.

В буфере для комплексообразования помимо нуклеотидного звена G^3 (в различных параллельных экспериментах степень модификации его со-

ставляла $\approx 17\%$) существенному алкилированию подвергается остаток G^{17} (степень модификации колебалась от 9 до 24%), который значительно удален от реакционноспособной группы в первичной структуре T26 (сектор С рисунка). Кроме того, наблюдается незначительное алкилирование нуклеотидных звеньев G^{12} , G^{13} , G^{14} , а также G^8 . Однако суммарная степень модификации сайтов G^{12} – G^{14} не превышает 4–14%. Очевидно, что модификация нуклеотидных звеньев, локализованных в нуклеотидной цепи на существенном расстоянии от алкилирующей группы, свидетельствует о том, что в общем конформационном ансамбле T26 присутствует такая разновидность вторичной структуры, в которой 5'-концевой фрагмент олигонуклеотида пространственно сближен с нуклеотидными звеньями G^{12} , G^{13} , G^{14} и особенно с G^{17} .

Ранее было показано, что неадресованное алкилирование нуклеиновых кислот протекает преимущественно по остаткам гуанозинов, причем отношение скорости бимолекулярной реакции этилениммониевого катиона с гуанозиновым остатком к константе скорости мономолекулярной реакции взаимодействия с водой (фактор конкуренции) равно 10 M^{-1} [9]. Степень неадресованного алкилирования определенного остатка гуанозина в мишени может быть оценена по приближенному уравнению:



Следовательно, при концентрации мишени $2.5 \times 10^{-8} \text{ M}$, используемой в работе, степень модификации за счет бимолекулярной реакции пренебрежимо мала ($\sim 2.5 \times 10^{-5}\%$). Тем не менее для дополнительного доказательства того, что алкилирование указанных звеньев действительно

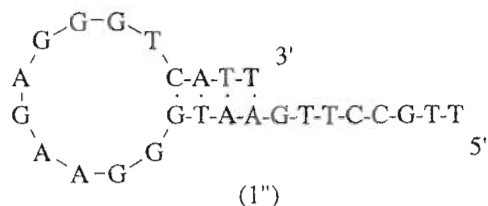
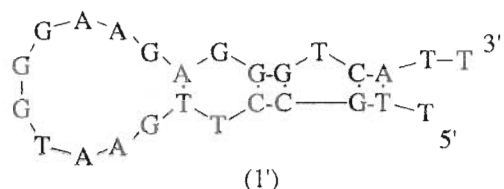
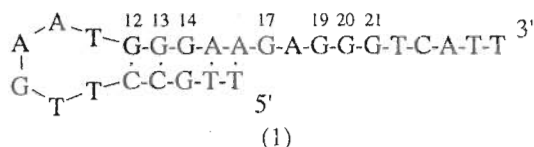
степень модификации = (фактор конкуренции) × (концентрация реагента).

Следовательно, при концентрации мишени $2.5 \times 10^{-8} \text{ M}$, используемой в работе, степень модификации за счет бимолекулярной реакции пренебрежимо мала ($\sim 2.5 \times 10^{-5}\%$). Тем не менее для дополнительного доказательства того, что алкилирование указанных звеньев действительно

осуществляется в составе внутренней вторичной структуры и является внутримолекулярным процессом, была исследована зависимость степени модификации по этим остаткам от концентрации CIR-T26 в диапазоне 2.5×10^{-8} – 2.0×10^{-7} М. Установлено (данные не приведены), что степень модификации не зависит от концентрации CIR-T26 в пределах ошибки эксперимента.

При проведении реакции самомодификации в буферных условиях и в присутствии олигонуклеотида-эфектора E₂ (сектор D) существенно (до 0–10%) снижается степень модификации нуклеотидного звена G¹⁷, при этом резко усиливается алкилирование остатков G¹²–G¹⁴ (степень модификации в параллельных экспериментах колебалась в диапазоне 30–36%). Этот результат согласуется с ранее полученными данными по алкилированию T26 реагентом (CIR)pTTCCCA, в соответствии с которыми отношение степеней модификации сайтов G¹²–G¹⁴ и G¹⁷ увеличивается в присутствии E₂ [10].

Расчет конформационных возможностей реакции самоалкилирования в составе R⁺-T26. Анализ последовательности нуклеотидов фрагмента ДНК pTTGCCTTGAATGGGAAGAGGGTTCATT позволяет предположить возможность формирования им в растворе различных типов вторичной структуры, таких, например, как шпильчатые структуры (1), (1') и (1'');



Расчет конформационных энергий для структур (1), (1') и (1'') показал, что структура (1') энергетически более выгодна ($E = -1245.2$ ккал/моль), чем структуры (1) ($E = -1212.3$ ккал/моль) и (1'') ($E = -1198.2$ ккал/моль). Следует отметить, что конформационные энергии структур, рассчитанные для газовой фазы, могут иметь лишь качественную корреляцию с вероятностью существования этих структур в растворе и, по всей вероятности,

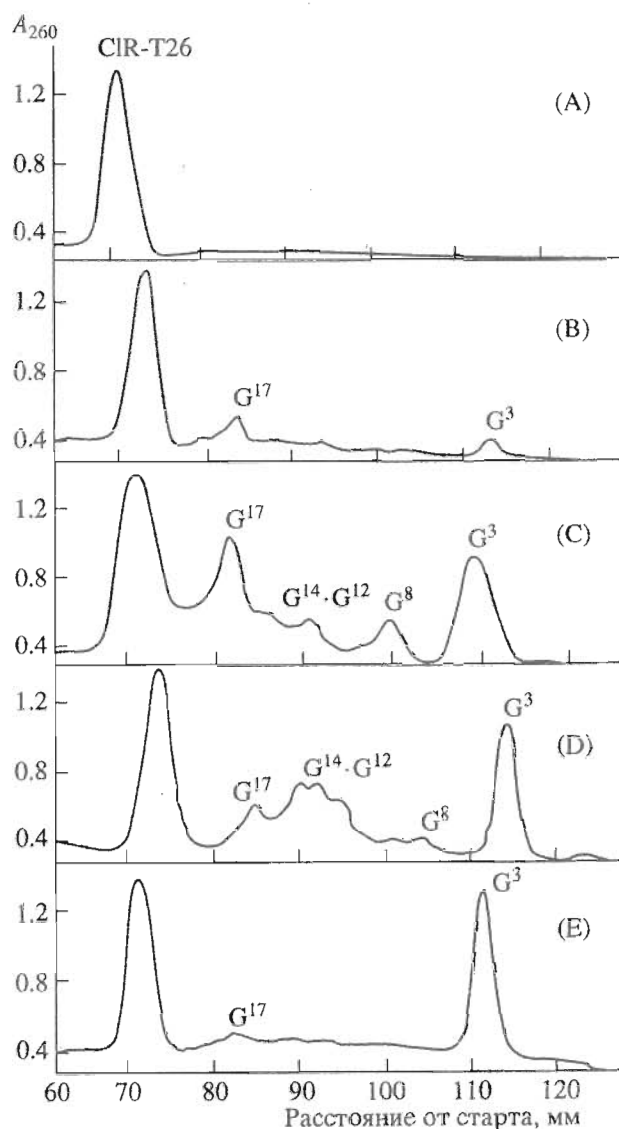


Рис. 1. Денситограммы различных дорожек радиоавтографа электрофоретического разделения продуктов самоалкилирования CIR-T26 после обработки образцов 1 М пиперидином. Условия реакции самомодификации: (A) – контрольный эксперимент, соответствующий исходному CIR-T26, обработанному пиперидином; (B) – модификация в денатурирующих условиях (7 М мочевины, отсутствие буфера); (C) – модификация в буферных условиях; (D) – модификация в буферных условиях в присутствии олигонуклеотида-эфектора E₂; (E) – модификация в буферных условиях в присутствии олигонуклеотида-эфектора E₁ и олигонуклеотида N6.

не отражают реального равновесного соотношения конформаций молекулы. Логично предположить, что наблюдаемое в эксперименте распределение сайтов внутримолекулярного алкилирования по нуклеотидным звеньям G¹², G¹³, G¹⁴ и G¹⁷ в составе 5'-фосфамидного производного олигонуклеотида (R⁺)-pTTGCCTTGAATGGGAAGAGGGTTCATT (R⁺-T26) связано с наличием структуры

Таблица 1. Структурные и энергетические характеристики различных предреакционных состояний олигонуклеотида R⁺-T26 в реакции самоалкилирования

Структура	$r_{(R^+)-N7(X)}, \text{Å}$					$E_{\text{полн}}$	ΔE
	X = G ³	X = G ¹⁷	X = G ¹⁴	X = G ¹³	X = G ¹²		
(2_0)						-1254.0	0.0
(2_1)	r_1 3.1 r_2 3.1 r_3 4.3	>6.0	>6.0	>6.0	>6.0	-1250.3	3.7
(2_2)	>6.0	r_1 3.0 r_2 3.1 r_3 4.2	>6.0	>6.0	>6.0	-1245.7	8.3
(2_3)	>6.0	>6.0	r_1 3.0 r_2 3.0 r_3 4.2	r_1 3.5 r_2 4.9 r_3 4.7	>6.0	-1242.3	11.7
(2_4)	>6.0	>6.0	r_1 5.8 r_2 5.1 r_3 4.7	r_1 3.5 r_2 3.4 r_3 4.0	r_1 5.9 r_2 5.9 r_3 7.2	-1239.5	14.5
(2_5)	>6.0	>6.0	>6.0	r_1 3.3 r_2 4.2 r_3 4.5	r_1 3.0 r_2 3.3 r_3 4.8	-1338.9	15.1

Примечание: X – нуклеотидный остаток, атакуемый алкилирующей группой; r_1 и r_2 – расстояния между углеродными атомами этилениммониевого катиона (C, C(R⁺)) и N7-атомом нуклеотидного звена X; r_3 – расстояние между кватернизованным атомом азота этилениммониевого катиона (N(R⁺)) и N7-атомом нуклеотидного звена X. Относительная энергия ΔE для каждого конформационного состояния определяется разностью между полной энергией данного состояния и полной энергией наиболее оптимальной конформации (2_0).

Несколько менее выгодна с энергетической точки зрения атака R⁺ по нуклеофильному центру остатка G¹⁷ (конформация 2_2). В этом случае атака осуществляется со стороны большой бороздки, формируемой двуспиральным участком стебля (рис. 2). Конформация (2_2) характеризуется малым расстоянием между N7(G¹⁷) и R⁺ ($r_1 = 3.0 \text{ Å}$, $r_2 = 3.1 \text{ Å}$).

Ориентация R⁺ вблизи остатков G¹⁴, G¹³ и особенно G¹² (конформации 2_3, 2_4 и 2_5 соответственно) вызывает некоторую деформационную напряженность двуспирального фрагмента структуры, что проявляется в изменении угла пропеллера (θ_p) между основаниями в комплементарных парах T¹ · A¹⁶ и T² · A¹⁵. Нарушение компланарности указанных оснований растет в ряду структур (2_3, 2_4 и 2_5) и приводит к ухудшению стэкинг-взаимодействия оснований стебля. Результатом этого является повышение конформационных энергий для структур (2_3) ($\Delta E = 11.7$, $E = -1242.3$ ккал/моль), (2_4) ($\Delta E = 14.5$, $E = -1239.5$ ккал/моль) и (2_5) ($\Delta E = 15.1$, $E = -1338.9$ ккал/моль). Интересно, что в итоговой структуре (2_3) алкилирующая группировка R⁺ занимает промежуточное положение между остатками G¹⁴ и G¹³, а в структуре (2_5) – между G¹² и G¹³. Действительно, в структуре (2_3) расстояние от N7(G¹⁴) до углеродных атомов эти-

лениммониевого катиона составляет 3.0 Å , а от N7(G¹³) до этих же атомов – 3.5 и 4.9 Å . В структуре (2_5) расстояния между N7(G¹²) и C,C(R⁺) составляют 3.0 и 3.3 Å , а между N7(G¹³) и C,C(R⁺) – 3.3 и 4.2 Å . В противоположность этому в структуре (2_4) R⁺ пространственно сближена (до расстояния $\sim 3.4 \text{ Å}$) только с нуклеотидным звеном G¹³; расстояние этой группы до остатков G¹⁴ и G¹² превышает 5 Å . Исходя из статистических оценок можно предположить, что алкилирование по остатку G¹³ более вероятно, чем по остаткам G¹² и G¹⁴. К сожалению, низкая степень модификации по этим нуклеотидным звеньям в составе R⁺-T26 не позволяет в этом случае провести корреляцию между экспериментальными и расчетными данными по избирательности алкилирования.

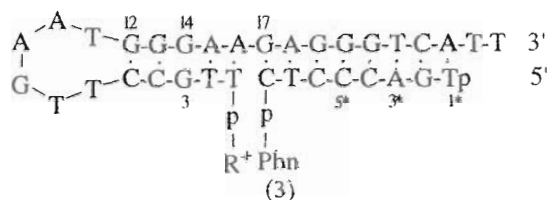
Обратим внимание на то, что энергия любого предреакционного состояния (структуры 2_1–2_5) в реакции алкилирования нуклеотидных звеньев G³, G¹⁷, G¹⁴, G¹³ и G¹² несколько превышает энергию наиболее оптимальной конформации R⁺-T26 (структура (2_0), табл. 1), которая была рассчитана с использованием МД-симуляции (600 К) с последующей геометрической оптимизацией, как описано в “Экспериментальной части”. Структура (2_0), соответствующая найденному энергетическому минимуму молекулы, характеризуется

тем, что алкилирующая группа R^+ экспонирована в раствор. На сегодняшний день нет никаких оснований считать, что предреакционное состояние молекулы (шпильчатой структуры или олигонуклеотидного комплекса, содержащих ковалентно присоединенную алкилирующую группировку R^+) самое стабильное по энергетике, т.е. преобладающее в популяции конформаций молекулы. Скорее можно допустить, что доля такой конформации в общем равновесном молекулярном ансамбле мала, но время жизни этилениммониевого катиона может быть достаточно велико в шкале быстрых внутримолекулярных/внутрикомплексных конформационных превращений. Иными словами, этилениммониевый катион может эффективно реагировать из состояния, пусть даже невыгодного с термодинамической точки зрения, но чрезвычайно выгодного с кинетической точки зрения. Эта проблема подробно обсуждалась в работах [11–13], где были введены понятия конформации “накопителя” – энергетически наиболее оптимального долгоживущего состояния молекулы, а также предреакционного ван-дер-ваальсова комплекса (ПВК), который характеризуется необходимым для реакции алкилирования взаимным расположением активной группы реагента относительно нуклеофильных центров. Согласно предлагаемой концепции, “накопителя” являются исходными, наиболее стабильными конформациями молекулы, из которых путем флуктуационных диффузионных движений активной частицы реагента молекула переходит в активные, более напряженные или “возбужденные” конформации – ПВК, непосредственно предшествующие акту алкилирования реакционноспособных центров [12, 13]. Вероятность протекания реакции по каждому возможному химически эквивалентному реакционному центру определяется разницей между конформационной энергией “накопителя” и энергией соответствующего ПВК (ΔE).

Таким образом, результаты конформационно-энергетического моделирования предреакционных состояний в реакции самоалкилирования в составе шпильчатой структуры (2) находятся в полном соответствии с экспериментальными данными по распределению сайтов модификации 26-звенного фрагмента R^+ -T26. Следовательно, алкилирование нуклеотидных остатков G^3 , G^{12} , G^{13} , G^{14} и G^{17} этого олигонуклеотида с большой вероятностью связано с формированием вторичной структуры (2).

Расчет конформационных возможностей реакции самоалкилирования в составе CIR -T26 · E_2 . Следующий этап исследований был связан с анализом конформационных возможностей внутримолекулярного алкилирования 5'-фосфамидного производного R^+ -T26 в присутствии олигонуклеотида-эффектора $pTGACCCTCr(Phn)$ (E_2), несущего на 3'-фосфатной группе остаток N -(2-гидроксиэтил)-

феназиния. В процессе расчетов предполагалось, что основным конформационным состоянием комплекса R^+ -T26 · E_2 является структура (3)



поскольку присутствие олигонуклеотида-эффектора E_2 должно стабилизировать предполагаемую шпильчатую структуру (2).

Очевидно, что конформационная энергия комплекса R^+ -T26 · E_2 определяется не только ориентацией алкилирующей группировки R^+ в структуре молекулы, но и пространственным расположением феназиниевого фрагмента Phn . В то же время на сегодняшний день не существует опубликованных экспериментальных данных по локализации ковалентно присоединенного к олигонуклеотиду феназиниевого фрагмента в эффекторных системах. Поэтому для корректного сравнения энергетических характеристик вероятных конформационных состояний комплекса R^+ -T26 · E_2 , различающихся ориентацией R^+ по отношению к нуклеотидным остаткам G^3 , G^{12} , G^{13} , G^{14} и G^{17} , необходимо было рассчитать наиболее энергетически выгодное расположение Phn в структуре дуплекса. Поиск энергетического минимума для феназиниевого остатка в составе структуры (3) проводили методом МД-симуляции, как описано в “Экспериментальной части”. В качестве стартовой структуры для фрагмента R^+ -T26 была использована структура (2_0). Было установлено (табл. 2), что существуют три типа энергетически оптимальных конформаций дуплекса (3) (конформации типа 3a, 3b и 3c), принципиально различающихся ориентацией остатка Phn . Первый тип конформаций (3a) характеризуется локализацией феназиниевого фрагмента в области большой бороздки, формируемой стебельным фрагментом шпильчатой структуры (рис. 3); энергия наиболее оптимальной конформации этого типа (3a_0) составляет $E = -1706.3$ ккал/моль.

В конформациях второго типа (3b) остаток Phn интеркалирует между парами оснований $T^1 \cdot A^{16}$ и $C^8 \cdot G^{17}$ с ориентацией оксиэтильного фрагмента в сторону растворителя (рис. 4). Оптимальная энергия такого состояния (3b_0) составляет $E = -1701.4$ ккал/моль, что на 4.9 ккал/моль выше значения энергии оптимальной конформации (3a_0). Заметим, что при таком типе локализации Phn в структуре молекулы возможна и другая ориентация плоскости гетероциклического кольца, при которой оксиэтильный фрагмент направлен “внутрь” структуры дуплекса фрагмента. Эту популяцию конформеров можно представить,

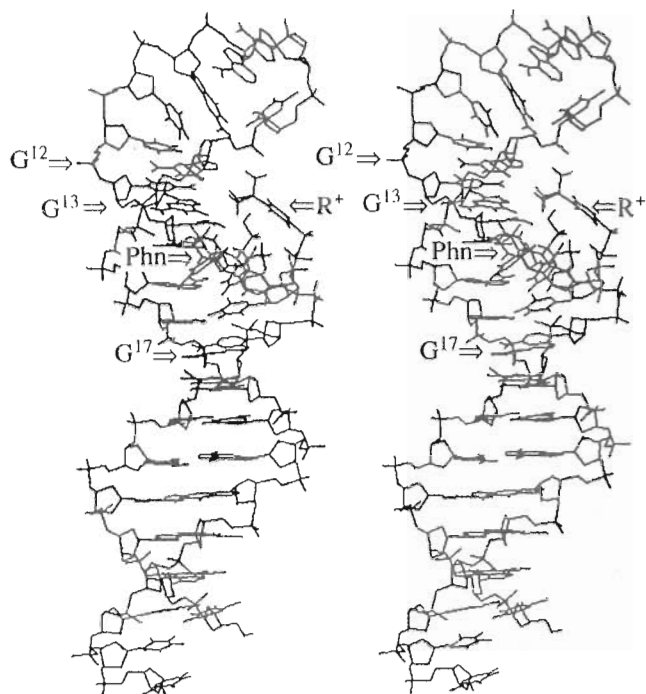


Рис. 3. Стереопара итоговой структуры (3a_4), в которой моделируется предреакционное состояние R^+ -T26 с расположением Phn в большой бороздке при атаке алкилирующей группировки R^+ нуклеотидного звена G^{13} .

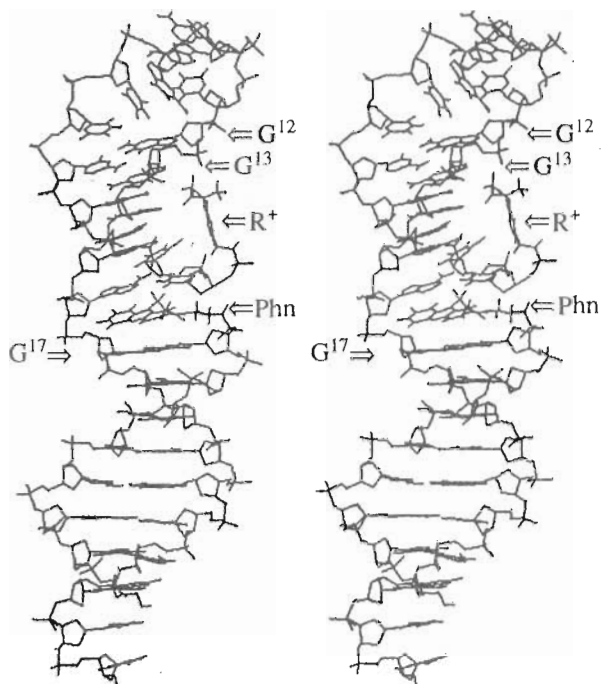


Рис. 4. Стереопара итоговой структуры (3b_4), в которой моделируется предреакционное состояние R^+ -T26 с расположением Phn между парами оснований $T^1 \cdot A^{16}$ и $C^8 \cdot G^{17}$ при атаке алкилирующей группировки R^+ нуклеотидного звена G^{13} .

повернув плоскость феназиниевого кольца в структуре (3b_0) на $\sim 180^\circ$ относительно связи $-C_2-N$. Однако оказалось, что минимальная энергия такого конформера ($E = -1681.3$ ккал/моль) на 20.1 ккал/моль выше, чем энергия структуры (3b_0), что позволило исключить эту конформацию из рассмотрения.

Наконец, третий тип конформаций молекулы (3c) определяется локализацией остатка Phn в области малой бороздки (рис. 5), формируемой эффектором и 3'-концевым фрагментом олигонуклеотида. При этом оксиэтильный фрагмент ориентирован в сторону растворителя. Такое расположение красителя наиболее энергетически выгодно, поскольку энергия оптимальной конформации этого типа (3c_0) составляет -1710.6 ккал/моль, что на 4.3 и 9.2 ккал/моль ниже, чем энергии оптимальных конформаций (3a_0) и (3b_0) соответственно.

Поскольку расчеты показали близкую по вероятности возможность существования конформаций типа (3a)–(3c), необходимо было провести три серии расчетов, с тем чтобы оценить структурно-энергетические возможности алкилирования нуклеотидных звеньев G^3 , G^{12} , G^{13} , G^{14} и G^{17} в каждом из трех вариантов локализации феназиниевого фрагмента в структуре молекулы.

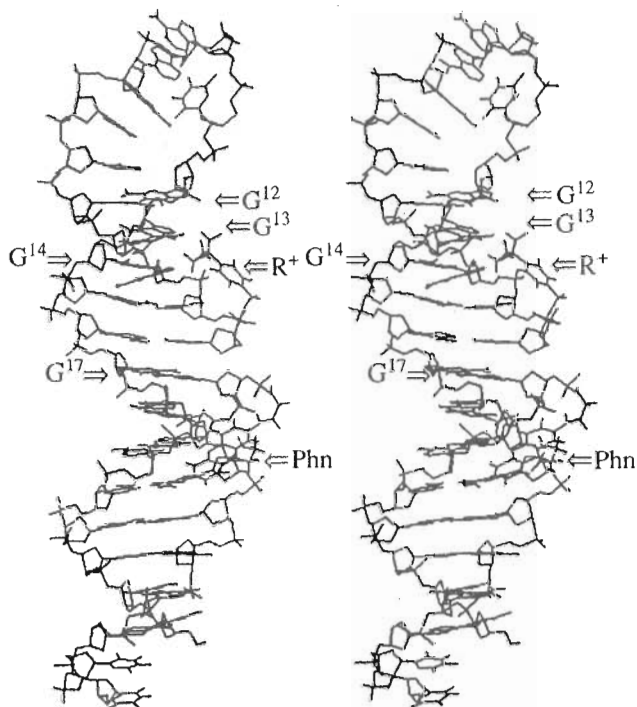


Рис. 5. Стереопара итоговой структуры (3c_4), в которой моделируется предреакционное состояние R^+ -T26 с расположением Phn в малой бороздке при атаке алкилирующей группировки R^+ нуклеотидного звена G^{13} .

Расчеты показали (табл. 2), что алкилирование нуклеотидных остатков G³, G¹⁴, G¹³ и G¹² в структурах типа (3a), (3b) и (3c) в случае эффекторной системы R⁺-T26 · E₂ должно проходить примерно с той же вероятностью, что и в случае безэфекторной системы R⁺-T26. Действительно, относительная энергия ΔE для каждого из этих состояний (3n₁), (3n₃), (3n₄) и (3n₅), оп-

ределяемая как разность между полной энергией данного состояния и полной энергией наиболее оптимальной конформации — “накопителя” (3n₀) (где n = a, b или c), в целом входит в тот же диапазон величин (3–16 ккал/моль), что и в случае безэфекторной системы R⁺-T26. При этом в каждой из структур (3n₁), (3n₃), (3n₄) и (3n₅) длина минимального контакта алкилирующей

Таблица 2. Структурные и энергетические характеристики различных предреакционных состояний эффекторной системы R⁺-T26 · E₂ в реакции самоалкилирования а) конформации типа (3a); Phn локализован в области большой бороздки

Структура	$r_{(R^+)-N7(X)}, \text{ \AA}$					$E_{\text{полн}}$	ΔE
	X = G ³	X = G ¹⁷	X = G ¹⁴	X = G ¹³	X = G ¹²		
(3a ₀)						-1706.3	0.0
(3a ₁)	r_1 3.0 r_2 3.1 r_3 4.3	>6.0	>6.0	>6.0	>6.0	-1692.9	13.7
(3a ₂)	>6.0	r_1 3.2 r_2 3.2 r_3 3.8	>6.0	>6.0	>6.0	-1670.3	36.0
(3a ₃)	>6.0	>6.0	r_1 3.2 r_2 3.2 r_3 4.1	r_1 3.7 r_2 5.0 r_3 4.6	>6.0	-1694.4	11.9
(3a ₄)	>6.0	>6.0	r_1 4.9 r_2 5.5 r_3 6.4	r_1 3.0 r_2 3.0 r_3 4.2	r_1 3.8 r_2 4.7 r_3 4.5	-1705.4	0.9
(3a ₅)	>6.0	>6.0	>6.0	r_1 3.5 r_2 4.3 r_3 4.9	r_1 3.3 r_2 3.4 r_3 3.8	-1701.3	5.0

б) конформации типа (3b); Phn интеркалирует между парами оснований T¹ · A¹⁶ и C^{8'} · G¹⁷

Структура	$r_{(R^+)-N7(X)}, \text{ \AA}$					$E_{\text{полн}}$	ΔE
	X = G ³	X = G ¹⁷	X = G ¹⁴	X = G ¹³	X = G ¹²		
(3b ₀)			r_1 7.1 r_2 7.1 r_3 8.2	r_1 3.5 r_2 3.6 r_3 4.6	r_1 6.2 r_2 6.0 r_3 6.6	-1701.4	0.0
(3b ₁)	r_1 2.9 r_2 3.0 r_3 4.2	>6.0	>6.0	>6.0	>6.0	-1690.6	10.8
(3b ₂)	>6.0	r_1 9.3 r_2 10.0 r_3 10.6	>6.0	>6.0	>6.0	-1683.7	17.7
(3b ₃)	>6.0	>6.0	r_1 3.0 r_2 3.3 r_3 4.4	r_1 4.0 r_2 4.3 r_3 5.1	>6.0	-1689.7	11.7
(3b ₄)	>6.0	>6.0	r_1 3.7 r_2 5.0 r_3 4.7	r_1 3.0 r_2 3.7 r_3 4.5	r_1 5.9 r_2 7.1 r_3 7.3	-1690.1	11.3
(3b ₅)	>6.0	>6.0	>6.0	r_1 3.1 r_2 3.5 r_3 4.5	r_1 4.6 r_2 4.5 r_3 5.9	-1698.0	3.4

Таблица 2. Окончание

с) конформации типа (3с); Phn локализован в области малой бороздки

Структура	$r_{(R^+)-N7(X)}, \text{Å}$					$E_{\text{полн}}$	ΔE
	$X = G^3$	$X = G^{17}$	$X = G^{14}$	$X = G^{13}$	$X = G^{12}$		
(3с_0)						-1710.6	0.0
(3с_1)	r_1 3.0 r_2 3.0 r_3 4.3	>6.0	>6.0	>6.0	>6.0	-1705.6	5.0
(3с_2)	>6.0	r_1 7.2 r_2 6.8 r_3 8.2	>6.0	>6.0	>6.0	-1702.5	8.1
(3с_3)	>6.0	>6.0	r_1 3.1 r_2 3.2 r_3 3.6	r_1 5.5 r_2 5.5 r_3 5.6	>6.0	-1700.5	10.1
(3с_4)	>6.0	>6.0	r_1 5.8 r_2 5.3 r_3 6.7	r_1 3.2 r_2 3.2 r_3 3.6	r_1 6.6 r_2 6.9 r_3 6.4	-1695.0	15.6
(3с_5)	>6.0	>6.0	>6.0	r_1 3.1 r_2 4.2 r_3 4.5	r_1 3.6 r_2 3.5 r_3 4.2	-1693.7	16.9

* См. примечание к табл. 1. Относительная энергия ΔE для каждого конформационного состояния определяется разностью между полной энергией данного состояния и полной энергией наиболее оптимальной конформации (3n_0) (где n = a, b или c).

группировки R^+ с соответствующим реакционным центром находится в диапазоне 3.0–3.4 Å. Исключение составляют структуры (3b_5) и (3с_5). Стартовые конформации этих структур изначально моделировали атаку N7-атома нуклеотидного звена G^{12} . Однако в процессе оптимизации наблюдалось постепенное удаление алкилирующей группы от этого остатка и ее сближение с нуклеотидным звеном G^{13} до минимального контакта длиной 3.1 Å. Важно отметить, что в структуре (3a_5) группа R^+ также занимает промежуточное положение между нуклеотидными звеньями G^{12} и G^{13} , а в структурах (3a_3) и (3b_3) – промежуточное положение между нуклеотидными звеньями G^{14} и G^{13} , тогда как в структурах (3a_4), (3b_4) и (3с_4) алкилирующая группа R^+ сближена только с остатком G^{13} (табл. 2). Эти данные, так же как и в случае безэффекторной системы (2), свидетельствуют о повышенной вероятности алкилирования остатка G^{13} (по сравнению с остатками G^{12} и G^{14}) и согласуются с экспериментальными данными (рис. 1).

В то же время, согласно полученным расчетным данным, присутствие эффекторного олигонуклеотида rTGACCCTCr(L-Phn) должно очень сильно снижать степень модификации нуклеотидного звена G^{17} независимо от расположения остатка Phn в структуре молекулы. Действительно, алкилирование нуклеотидного звена G^{17} в составе структуры (3b) стерически запрещено, так как подход алкилирующей группы к N7-атому этого остатка со стороны большой бороздки экраниро-

ван комплементарным ему основанием C^8 , а также диметилендиаминовым линкером феназиниевого фрагмента (рис. 4). По этой причине даже при конструировании стартовой структуры, моделирующей алкилирование этого остатка, атомы N7(G^{17}) и C,C(R^+) удалось сблизить только до расстояния 5 Å, несмотря на то что при этом использовались жесткие ограничения на указанные расстояния с силовой константой, равной 100 ккал/(моль Å). Как следствие высокого конформационного напряжения такой стартовой структуры, в процессе ее оптимизации наблюдалось удаление алкилирующей группировки от N7(G^{17}) до расстояния ~10 Å ($r_1 = 9.3$, $r_2 = 10.0$ и $r_3 = 10.6$ Å) в итоговой структуре (3b_2). Таким образом, очевидная удаленность R^+ от этого нуклеотидного звена, а также достаточно высокая конформационная энергия этой структуры ($\Delta E = 17.7$, $E = -1683.7$ ккал/моль) свидетельствуют о весьма малой вероятности алкилирования по G^{17} . Можно предположить, что атака по этому нуклеофильному центру была бы возможна в случае раскрытия комплементарной пары $C^8 \cdot G^{17}$ и выхода нуклеотидного звена C^8 из структуры стебельного фрагмента. Однако для дуплексных структур, стабилизированных интеркаляцией ядра Phn между основаниями [14], этот процесс маловероятен в шкале времен быстрых реакций такого активного соединения, как этилениммониевый катион.

В случае локализации остатка Phn в области большой бороздки (структура 3a) алкилирование

нуклеотидного остатка G^{17} также весьма затруднено из-за наличия комплементарной пары $C^8 \cdot G^{17}$. Кроме того, подход R^+ к $N7(G^{17})$ со стороны большой бороздки стерически блокируется локализованным в ней остатком Phn . В то же время процесс раскрытия комплементарной пары $C^8 \cdot G^{17}$ в этом случае более вероятен, чем в структурах типа (3b), что позволяет допустить некоторую вероятность формирования предреакционного комплекса (3a_2) (рис. 3, табл. 2). Структура (3a_2) – результат оптимизации стартовой конформации типа (3a), в которой алкилирующая группа R^+ была изначально сближена с G^{17} до расстояния 3 Å (силовые константы составляли 100 ккал/(моль Å)). Видно, что атака G^{17} реакционноспособной группой может происходить только при достаточно сильных изменениях пространственной структуры двуспирального фрагмента. В частности, в таком предреакционном состоянии нарушена компланарность оснований в комплементарной паре $C^8 \cdot G^{17}$. Следствием этого является разрыв водородных связей между этими основаниями и нарушение стэкинг-взаимодействий в стопке двуспирального участка. Столь существенные искажения структуры приводят к резкому повышению конформационной энергии молекулы ($\Delta E = 36.0$, $E = -1670.3$ ккал/моль), что позволяет сделать вывод о низкой доле такого состояния в общем ансамбле конформаций молекулы, даже если допустить возможность атаки алкилирующей группы нуклеотидного звена G^{17} в момент раскрытия $C^8 \cdot G^{17}$ -пары оснований.

При локализации остатка Phn в области малой бороздки (структура 3c) подход алкилирующей группы к G^{17} со стороны большой бороздки стерически осложняется только наличием комплементарной пары $C^8 \cdot G^{17}$. Видимо, поэтому вероятность алкилирования G^{17} при такой ориентации феназина несколько выше, чем в случае (3a) и (3b). В пользу этого свидетельствует относительно низкая конформационная энергия итоговой структуры (3c_2) ($\Delta E = 5.0$, $E = -1705.6$ ккал/моль), полученной в процессе энергетической оптимизации стартовой структуры, в которой R^+ и G^{17} были изначально сближены до расстояния ~ 3 Å. В то же время указанная итоговая структура (3c_2) характеризуется существенным (~ 7 Å) расстоянием между R^+ и G^{17} . Таким образом, расчеты показывают, что наличия комплементарной пары $C^8 \cdot G^{17}$ вполне достаточно, чтобы блокировать атаку атома $N7(G^{17})$ алкилирующей группировкой R^+ .

Итак, результаты молекулярного моделирования различных предреакционных состояний в эффекторной системе (3) свидетельствуют о том, что присутствие эффекторного олигонуклеотида $pTGACCCCTCp(L-Phn)$ должно уменьшать модификацию нуклеотидного остатка G^{17} . Качествен-

ная корреляция расчетных и экспериментальных данных, полученных для эффекторной системы, подтверждает тот факт, что наблюдаемое в эксперименте распределение продуктов модификации связано с формированием шпильчатой структуры (3). Далее, увеличение степени модификации сайта $G^{12}-G^{14}$, наблюдаемое в эффекторной системе, вероятно, свидетельствует о смещении конформационного равновесия в сторону формирования шпильчатой структуры (3), стабилизируемой эффектором-олигонуклеотидом. Модификация нуклеотидного звена G^8 (рис. 1, секторы C и D), которая, как показали расчеты, не может осуществляться в составе структуры (3), вероятно, протекает в составе другого конформационного состояния.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе были использованы T4-полинуклеотидкиназа (“Биопол”, Россия), $[\gamma-^{32}P]ATP$ (>3000 Ки/ммоль, “Биосан”, Россия), акриламид и N,N' -метиленабисакриламид (Serva, Германия). Остальные реагенты были получены от фирмы “Реахим” (Россия). Для экспонирования гелей использовали рентгеновскую пленку РМ-1 (“Тасма”, Россия). Радиоавтографы гелей сканировали с помощью лазерного денситометра Ultrascan XL (LKB, Швеция).

Олигонуклеотиды TTGCCTTGAATGGGAAG-AGGGTCAAT, TGACCCCTCp, TTCAAGGCp и pTTCCCA были синтезированы твердофазным фосфамидным методом на автоматическом синтезаторе “Виктория-6М” [15]. Перед синтезом алкилирующего производного CIR-T26 на 5'-конец TTGCCTTGAATGGGAAGAGGGTCAAT вводили ^{32}P по стандартной методике [16], используя T4-полинуклеотидкиназу (10–20 ед. акт.) и $[\gamma-^{32}P]ATP$.

Алкилирующую группу RCl присоединяли к 5'-концевой фосфатной группе меченого T26 как описано в [17]. Продукт выделяли с помощью ВЭЖХ на сорбенте LiChrosorb RP-18 (Merck, Германия), используя градиент CH_3OH в 0.05 М триэтиламмоний-ацетатном буфере (pH 7.5). Молярный коэффициент поглощения CIR-T26 на длине волны λ 260 нм принимали равным сумме вкладов олигонуклеотидной части [18] и группы RCl (14.7×10^3 М $^{-1}$ см $^{-1}$ [19]). Содержание активного хлора в CIR-T26 определяли по методике [20]; во всех случаях оно превышало 90%.

Олигонуклеотиды-эффекторы (Phn-L)pTTCAAGGCp(L-Phn) (E_1) и (Phn-L)pTGACCCCTCp(L-Phn) (E_2) синтезировали следующим образом: на первой стадии присоединяли этилендиаминовый линкер к 3'-концевому фосфату по методике [21]. На следующей стадии осуществляли присоединение по аминогруппе линкера N-(2-гидроксиэтил)феназина, как описано в работах [22, 23]. Затем с

использованием Т4-полинуклеотидкиназы вводили 5'-концевой фосфат, к которому присоединяли вторую группу (L-Phn), как описано выше. Вклад каждой группы Phn в молярный коэффициент поглощения полученного производного на длине волны λ 260 нм принимали равным $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [24, 25].

Реакцию самомодификации CIR-T26 проводили при 25°C в течение 25 ч, что соответствовало пяти периодам полуионизации связи C-Cl в CIR-T26 [26]. Во всех случаях (см. рис. 1, секторы А-Е) концентрация CIR-T26 составляла $2 \times 10^{-7} \text{ M}$. В случае проведения реакции в присутствии эффектора E₂ или E₁ и N6 концентрации последних составляли 1×10^{-5} , 1×10^{-5} и $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ соответственно. Буфер для комплексообразования имел следующий состав: 0.16 M NaCl, 0.02 M Na₂HPO₄, 0.1 mM EDTA, pH 7.5. Самоалкилирование CIR-T26 регистрировали гель-электрофорезом в денатурирующем 20% ПААГ по появлению продуктов деструкции олигонуклеотидной цепи в местах модифицированных оснований после обработки препаратов CIR-T26 в течение 15 мин 1 M водным пиперидином при 95°C [8]. Время и условия обработки пиперидином были подобраны таким образом, чтобы предотвратить разрыв фосфамидной связи во фрагментах R-p(N_i)_n. Степень модификации нуклеотидных звеньев рассчитывали как отношение интегральной интенсивности соответствующей полосы к сумме интегральных интенсивностей полос на дорожке радиоавтографа, считая скорость пиперидинолиза по различным модифицированным остаткам гуанозина одинаковой. Время экспонирования выбирали таким образом, чтобы интенсивности полос, соответствующие продуктам модификации T26, находились в линейном диапазоне чувствительности пленки. Статистическое расщепление CIR-T26 по остаткам G осуществляли в соответствии с методикой [8], уменьшив время обработки пиперидином до 15 мин.

Молекулярное моделирование и энергетическая минимизация. Построение стартовых структур, энергетическую минимизацию и МД-симуляцию проводили в газовой фазе с использованием программы AMBER 4.0 [27], любезно предоставленной проф. П.А. Кольманом. Все расчеты проводились на PC "Pentium"-90.

Стартовые координаты дуплексной части R⁺-T26 и R⁺-T26 · E₂ были получены с использованием модуля NUCGEN (AMBER 4.0) на основе координат правоспиральной В-ДНК Арнотта. Шпильчатые структуры (1), (1') и (1'') создавались в соответствии с подходом, разработанным в работе [28]. При энергетической минимизации олигонуклеотидных фрагментов R⁺-T26 и R⁺-T26 · E₂ в расчетах использовались стандартные параметры силового поля AMBER 4.0.

Структурные параметры, а также распределение зарядов на атомах для нестандартных фрагментов R⁺ и Phn-CH₂-CH₂-NH- были определены с использованием квантово-химического метода MNDO и включены затем в базу данных программы AMBER 4.0. Присоединение групп R⁺ и Phn-CH₂-CH₂-NH- к олигонуклеотидным фрагментам моделировалось с использованием программы SKIFF, разработанной В. Васильевым (НИБХ СО РАН). Визуализацию структур осуществляли с использованием программы DEMO, созданной С. Пачковским (НИБХ СО РАН).

Энергетическую оптимизацию структур проводили с использованием модуля SANDER (AMBER 4.0) до достижения RMS* величины 4.0×10^{-3} . В расчетах использовалась зависимость от расстояния диэлектрическая функция.

Для поиска наиболее оптимальной ориентации группировок R⁺ и Phn в структурах (2_0) и (3n_0) соответственно была проведена симуляция конформационного поведения указанных структур методом МД при постоянной полной энергии. В этих экспериментах в расчеты были включены только атомы модифицирующих группировок R⁺ и Phn; олигонуклеотидная часть молекулы оставалась "замороженной". Чтобы преодолеть достаточно высокие энергетические барьеры и исследовать по возможности более обширные области конформационного пространства, МД-симуляцию проводили при повышенной температуре (600 K). В течение 100-пс периода МД-симуляции через каждый пикосекундный интервал фиксировались координаты и энергии соответствующих конформаций. Далее каждая из отобранных в процессе МД структур была геометрически оптимизирована по всем структурным параметрам молекулы, включая олигонуклеотидную часть. Наиболее оптимальная по энергии конформация молекулы использовалась в качестве стартовой структуры в дальнейших расчетах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кнорре Д.Г., Кутявин И.В., Левина А.С., Пичко Н.П., Подуст Л.М., Федорова О.С. // Биоорганическая химия. 1986. Т. 12. С. 230-238.
2. Федорова О.С., Подуст Л.М., Горн В.В., Максаква Г.А. // Биоорганическая химия. 1992. Т. 18. С. 1496-1504.
3. Федорова О.С., Подуст Л.М., Максаква Г.А., Горн В.В., Кнорре Д.Г. // FEBS Lett. 1992. V. 302. P. 47-50.
4. Адина-Зада А., Федорова О.С. // Биоорганическая химия. 1995. Т. 21. С. 703-708.
5. Власов В.В., Гринева Н.И., Карпова Н.И. // Молекулярная биология. 1974. Т. 8. С. 752-761.

* Root Mean Square – градиент (градиент среднеквадратичного отклонения).

6. Grachev M.A., Rivkin M.I. // Nucl. Acids Res. 1975. V. 2. P. 1237–1260.
7. Everett W.C.I., Ross I. // J. Chem. Soc. 1949. P. 1972–1983.
8. Maxam A.M., Gilbert M. // Meth. Enzymol. 1980. V. 65. P. 499–560.
9. Knorre D.G., Vlassov V.V., Zarytova V.F., Lebedev A.V., Fedorova O.S. Design and Target Reactions of Oligonucleotide Derivatives. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1994. P. 67–71.
10. Федорова О.С., Одинаев А.Д., Горн В.В., Максаква Г.А., Перебоева О.С., Кнорре Д.Г. // Биоорганическая химия. 1994. Т. 20. С. 932–943.
11. Воробьев Ю.Н. // Биоорганическая химия. 1990. Т. 16. С. 69–82.
12. Воробьев Ю.Н. // Биоорганическая химия. 1990. Т. 16. С. 82–93.
13. Воробьев Ю.Н. // Биоорганическая химия. 1991. Т. 17. С. 197–222.
14. Биченкова Е.В., Зарытова В.Ф., Иванова Е.М., Лебедев А.В., Мальцева Т.В., Сальников Г.Е. // Биоорганическая химия. 1992. Т. 18. С. 398–412.
15. Грязнов С.М., Горн В.В., Зарытова В.Ф., Кумарев В.П., Левина А.С., Полищук А.С., Потанов В.К., Потемкин Г.А., Средин Ю.Г., Шабарова З.А. // Изв. СО АН СССР. Сер. хим. 1987. Вып. 1. С. 119–123.
16. Maniatis T., Fritsch E.E., Sambrook J. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
17. Годовикова Т.С., Зарытова В.Ф. // Биоорганическая химия. 1986. Т. 12. С. 475–481.
18. Handbook of Biochemistry and Molecular Biology. 3rd Ed. / Ed. G.D. Fasman. CRC Press, 1975. P. 589.
19. Богачев В.С., Веньяминова А.Г., Гринева Н.И., Ломакина Т.С. // Изв. СО АН СССР. Сер. хим. 1970. Вып. 6. С. 110–116.
20. Гринева Н.И., Ломакина Т.С., Тугеева Н.Г., Чимитова А.Т. // Биоорганическая химия. 1977. Т. 3. С. 210–214.
21. Годовикова Т.С., Зарытова В.Ф., Халимская Л.М. // Биоорганическая химия. 1986. Т. 12. С. 475–481.
22. Зарытова В.Ф., Кутявин И.В., Левина А.С., Мамеев С.В. // Докл. АН СССР. 1988. Т. 302. С. 102–104.
23. Зарытова В.Ф., Иванова Е.М., Кутявин И.В., Сергеев Д.С., Сильников В.Н., Шишкин Г.В. // Изв. СО АН СССР. Сер. хим. 1989. Вып. 6. С. 3–9.
24. Зарытова В.Ф., Кутявин И.В., Сильников В.Н., Шишкин Г.В. // Биоорганическая химия. 1986. Т. 12. С. 911–920.
25. Likhov S.G., Podymnugin M.A., Sergeev D.S., Silnikov V.N., Kutayvin I.V., Shishkin G.V., Zarytova V.F. // Bioconj. Chem. 1992. V. 3. P. 414–419.
26. Кнорре Д.Г., Зарытова В.Ф., Подуст Л.М., Федорова О.С. // Докл. АН СССР. 1988. Т. 300. С. 1006–1010.
27. Weiner P.K., Kollman P.A. // J. Comput. Chem. 1981. V. 2. P. 287.
28. Haasnoot C.A.G., Hilbers C.W., van der Marel G.A., van Boom J.H., Singh U.C., Pattabiraman N., Kollman P.A. // J. Biomol. Struct. Dyn. 1986. V. 3. P. 843.

Study of the Secondary Structure of a Single-Stranded DNA Fragment by the Use of a Selfmodification Reaction

E. V. Bichenkova, A. Adina-Zada, and O. S. Fedorova

*Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Siberian Division,
pr. Akademika Lavrent'eva 8, Novosibirsk, 630090 Russia*

Abstract—Electrophoretic analysis of the products of chemical destruction at modified base residues was used to determine the site-directedness of selfalkylation of the 26-mer DNA fragment pTTGCCTTGAATGGGAA-GAGGGTCATT (T26). This fragment possesses a 4-[*N*-methyl-*N*-(2-chloroethyl)amino]benzylamido group (CIR-), covalently attached to the 5'-terminal phosphate group both in the presence and in the absence of the oligonucleotide effector (Phn-L)pTGACCCTCp(L-Phn), where Phn is an *N*-(2-hydroxyethyl)phenazinium residue and L is an ethylenediamine linker. Molecular modeling with the method of molecular mechanics/dynamics (MM/D) was used to investigate the secondary structure of the CIR-T26 conjugate and to interpret the change of the alkylation site upon treatment with CIR-T26 in the presence of an effector.

Key words: oligonucleotides, alkylation, structure, molecular modeling.