



УДК 577.113.4+541.127

АНОМАЛЬНАЯ ТЕМПЕРАТУРНАЯ ЗАВИСИМОСТЬ ЭФФЕКТИВНОСТИ КОМПЛЕМЕНТАРНО-АДРЕСОВАННОЙ МОДИФИКАЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫМИ РЕАГЕНТАМИ, ОБРАЗУЮЩИМИ АКТИВНЫЕ ПРОМЕЖУТОЧНЫЕ ЧАСТИЦЫ

© 1998 г. Н. В. Амирханов[#], Н. В. НероноваНовосибирский институт биоорганической химии СО РАН,
630090, Новосибирск, просп. Академика Ливрентьева, 8

Поступила в редакцию 24.06.97 г. Принята к печати 28.07.97 г.

При модификации 22-звенной ДНК-мишени $rTGCCTGGAGCTGCTTGATGCC$ (I) комплементарным додекадезоксирибонуклеотидным реагентом $GCATCAAGCAGCp(N(CH_3)CH_2RCl)$ (II), содержащим на 3'-конце алкилирующую группировку ($RCl = -C_6H_4N(CH_3)(CH_2CH_2Cl)$), обнаружен аномальный, колоколообразный характер зависимости предельной степени модификации от температуры. На основе анализа кинетической схемы процесса модификации дается возможное объяснение данного экспериментального факта.

Ключевые слова: модификация нуклеиновых кислот, олигонуклеотидные реагенты, кинетические уравнения, стабильность комплементарных комплексов.

Одной из типичных особенностей комплементарно-адресованной модификации нуклеиновых кислот (НК) олигонуклеотидными реагентами, образующими в лимитирующей стадии активные промежуточные частицы, является S-образный характер зависимости предельной степени модификации мишени (ϵ_∞) от температуры [1–6].

Такой характер зависимости эффективности модификации от температуры косвенно отражает процесс термической денатурации комплементарного комплекса, образованного НК-мишенью и олигонуклеотидной частью реагента. Это указывает на прямую зависимость эффективности модификации от стабильности соответствующего комплементарного комплекса и, таким образом, может служить подтверждением того, что химическая модификация биополимера реагентом проходит в комплементарном комплексе.

В настоящей работе исследована температурная зависимость предельной степени модификации ДНК-мишени $rTGCCTGGAGCTGCTTGATGCC$ (I) додекадезоксирибонуклеотидным реагентом $GCATCAAGCAGCp(N(CH_3)CH_2RCl)$ (II), содержащим на 3'-конце алкилирующую группировку ($RCl = -C_6H_4N(CH_3)(CH_2CH_2Cl)$). При этом

Сокращения: НК – нуклеиновая кислота, ϵ_∞ – предельная по времени (при $t \rightarrow \infty$) степень модификации (алкилирования) НК-мишени. Префикс “d” в обозначениях олигодезоксирибонуклеотидов опущен.

[#] Автор для переписки.

обнаружен аномальный, колоколообразный характер зависимости предельной степени модификации от температуры, что не согласуется с указанными выше представлениями об S-образном характере зависимости ϵ_∞ от температуры. В настоящем сообщении приводится возможное объяснение обнаруженного феномена.

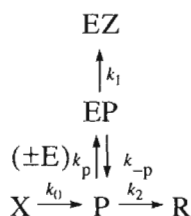
Определение предельной степени модификации при алкилировании ДНК-мишени (I) реагентом (II) при различных температурах проводили аналогично ранее описанной методике [3, 6]. При электрофоретическом анализе продуктов модификации ДНК-мишени было обнаружено, что модификация подвергаются преимущественно основания G^6 и G^7 (считая с 5'-конца мишени). Это является подтверждением того, что химическая модификация ДНК-мишени (I) олигонуклеотидным реагентом (II) проходит в комплементарном комплексе.

Как видно из рис. 1, экспериментальная зависимость предельной степени комплементарно-адресованной модификации мишени от температуры имеет колоколообразный характер с максимумом в области температуры плавления соответствующего дуплекса, образованного ДНК-мишенью (I) и олигонуклеотидной частью реагента (II) ($T_m = 58^\circ C$). Такой характер зависимости ϵ_∞ от температуры (рис. 1) с точки зрения сложившихся на сегодняшний день представлений аномален, поскольку на кривой наблюдается участок, где эффективность модификации симбатна

росту температуры, а следовательно, возрастает с уменьшением стабильности комплементарного комплекса.

Трудно предположить, что на таком "аномальном участке" с увеличением температуры возрастает стабильность комплементарного комплекса. Следует также исключить возможность увеличения эффективности модификации в этом интервале температур за счет увеличения с температурой скорости модификации, определяемой в лимитирующей стадии константой скорости образования этилениммониевого катиона (k_0 [7]), поскольку предельный по времени (при $t \rightarrow \infty$) выход модификации не зависит от величины k_0 [1, 8, 9].

Теоретический анализ процесса комплементарно-адресованной модификации НК [8] показывает, что колоколообразный характер зависимости ϵ_∞ от температуры может быть обусловлен прежде всего наличием в системе активной промежуточной частицы Р (этилениммониевого катиона [7, 10]) и обменом такой частицы между раствором и комплементарным комплексом ЕР, образованным биополимером Е и частицей Р. Промежуточная частица Р, образуемая с константой скорости k_0 [7] из реагента Х, способна с константой скорости k_1 модифицировать НК-мишень в комплементарном комплексе ЕР с образованием продукта ЕЗ и с константой скорости k_2 образовывать в растворе побочный продукт R [8]:



Здесь Е – биополимер (НК-мишень); Х – олигонуклеотидный (алкилирующий) реагент; Р – активная промежуточная (этилениммониевая) частица; R – продукт побочного превращения промежуточной частицы; ЕР – соответствующий комплекс с полимером; ЕЗ – продукт модификации полимера; k_0, k_1, k_2, k_p и k_{-p} – константы скорости соответствующих превращений, показанных на схеме.

С увеличением температуры величина k_{-p} (константа скорости диссоциации комплементарного комплекса ЕР), отражающая обратную величину стабильности комплементарного комплекса ЕР, также возрастает, и при значениях $k_{-p} \gg k_1, k_2$ и $k_p \cdot [E] \gg k_1, k_2$ происходит перераспределение активной частицы Р между раствором и комплексом. В зависимости от соотношения констант скоростей этих реакций $k_1/k_2 > 1$ или $k_1/k_2 < 1$ перераспределение активной частицы Р может происходить в сторону образования либо продукта ЕЗ, либо побочного продукта R соответствен-

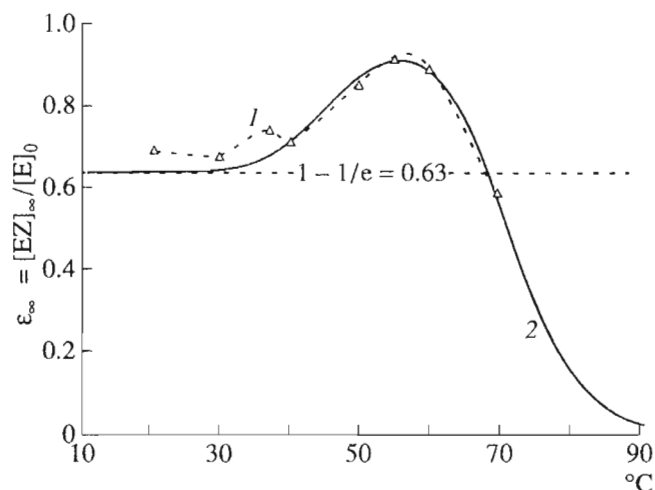


Рис. 1. Экспериментальная (1) и теоретическая (2) кривые зависимости предельной степени модификации (ϵ_∞) от температуры, полученные при комплементарно-адресованной модификации ДНК-мишени (I) (Е) олигонуклеотидным алкилирующим реагентом (II) (Х). Теоретическая кривая построена на основе уравнения (1) при значениях $k_1 = 2.65 \text{ c}^{-1}$, $k_2 = 0.87 \text{ c}^{-1}$, где величину K_x определяли по уравнению Вант-Гоффа, используя $\Delta H = -45000 \text{ кал/моль}$, $\Delta S = -111.5 \text{ кал/моль K}$, $T_m = 58^\circ\text{C}$. Величину k_p в исследуемых интервалах температур принимали равной $4.4 \times 10^6 \text{ c}^{-1} \text{ M}^{-1}$ [11]. Условия модификации: $[E]_0 = 10^{-6} \text{ M}$, $[X]_0 = 2 \times 10^{-5} \text{ M}$ в водном буфере, содержащем 0.2 M NaCl, 0.01 M трис-HCl (pH 7.5), 0.001 M EDTA. Время модификации при каждой температуре составляло более пяти периодов полупревращения реагента (II) в активную этилениммониевую частицу [7].

но [8]. При соотношении констант $k_1/k_2 > 1$ такое перераспределение происходит в пользу образования продукта модификации ЕЗ и, таким образом, на кривой зависимости ϵ_∞ от температуры может наблюдаться "аномальный участок", на котором увеличение температуры (и следовательно, понижение стабильности комплементарного комплекса) ведет к увеличению эффективности модификации НК-мишени.

В случае существенного избытка реагента по отношению к мишени, т.е. при $[X]_0/[E]_0 \gg 1$, и в предположении, что равновесные константы ассоциации соответствующих комплементарных комплексов ЕХ, ЕР и ЕР равны $K_x = K_1 = K_p = k_p/k_{-p}$, уравнение, описывающее в целом процесс комплементарно-адресованной модификации НК [8, 9], может быть представлено в виде

$$\epsilon_\infty = [EZ]_\infty/[E]_0 = 1 - e^{-\gamma_{эф} F}, \quad (1)$$

где ϵ_∞ – предельная по времени (при $t \rightarrow \infty$) степень модификации НК-мишени,

$$\gamma_{эф} = \frac{1 + k_{-p}/k_2}{1 + k_{-p}/k_1};$$

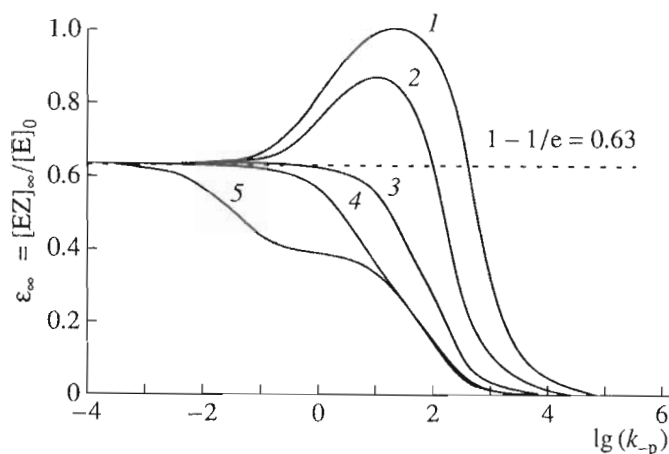


Рис. 2. Теоретические кривые зависимости предельного по времени степени модификации (ϵ_{∞}) НК-мишени от величины k_{-p} (константы скорости диссоциации комплементарного комплекса EX), рассчитанные по уравнению (1) при k_1, k_2 (с^{-1}) и k_1/k_2 , равных 10, 1, 10 (1), 3, 1, 3 (2), 1, 1, 1 (3), 2, 4, 0.5 (4) и 0.02, 0.04, 0.5 (5) соответственно. Во всех случаях принимали $[X]_0 = 10^{-5}$ M; $k_p = 4.4 \times 10^6 \text{ с}^{-1} \text{ M}^{-1}$ [11].

$F = [EX]/[E]_0$ – степень насыщения биополимера реагентом, при $[X]_0/[E]_0 \gg 1$

$$F = K_x[X]_0 / (1 + K_x[X]_0).$$

Анализ представленного уравнения (1) в виде зависимостей ϵ_{∞} от величины k_{-p} (рис. 2) показывает, что при разных значениях констант k_1 и k_2 и их соотношений характер зависимости ϵ_{∞} от параметра k_{-p} , а следовательно, и от температуры может носить либо колоколообразный (кривые 1, 2), либо ступенчатый (кривая 5), либо типичный S-образный характер (кривые 3, 4).

Однако, как видно из данных рис. 2, независимо от значения самих величин k_1 и k_2 и их соотношения кривая модификации при увеличении стабильности комплементарного комплекса (т.е. при уменьшении параметра k_{-p}) стремится к величине ϵ_{∞} , равной $1 - 1/e = 0.63$. Как следует из этих же данных, наличие в реакционной среде промежуточной активной частицы при соответствующих температурных условиях проведения модификации, когда происходит активный обмен такой частицы между раствором и комплексом, может вызывать изменение величины ϵ_{∞} относительно значения 0.63. При возрастании величины k_{-p} , т.е. при уменьшении стабильности комплементарного комплекса, при соотношении $k_1/k_2 > 1$ наблюдается повышение ϵ_{∞} относительно величины, равной $1 - 1/e = 0.63$ (рис. 2, 1, 2), тогда как при соотношении констант $k_1/k_2 \leq 1$ – ее понижение (рис. 2, 3–5).

Таким образом, при модификации НК-мишени может существовать некоторый “оптимальный” температурный интервал, при котором может быть достигнута для данной конкретной системы максимальная эффективность модификации, при-

чем величина предельного выхода модификации внутри такого интервала не обязательно находится в прямой зависимости от стабильности комплементарного комплекса.

Другими словами, может оказаться, что в некоторых случаях олигонуклеотидные реагенты, образующие высокостабильные комплементарные комплексы, в определенных температурных интервалах не всегда могут проявлять такую же высокую эффективность при комплементарно-адресованной модификации НК по сравнению с реагентами, образующими менее стабильный комплекс с НК-мишенью, что неоднократно наблюдалось в ряде работ по комплементарно-адресованной модификации НК [5, 6, 12].

Данный факт необходимо учитывать не только при конструировании эффективно воздействующих на НК реакционноспособных олигонуклеотидных реагентов, но и при сравнительном анализе их воздействия на НК-мишень.

Авторы выражают глубокую благодарность Д.Г. Кнорре, В.Ф. Зарытовой, А.Г. Веньяминовой, А.С. Левиной, В.С. Богачеву и Д.В. Пышному за живой интерес к работе, полезную дискуссию и ценные рекомендации при обсуждении результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кнорре Д.Г., Зарытова В.Ф., Бадашкеева А.Г., Федорова О.С. Реакционноспособные производные олигонуклеотидов как ген-направленные биологически активные вещества. Итоги науки и техники. ВИНТИ. Сер. Биотехнология. 1991. Т. 37. С. 117–156.
2. Knorre D.G., Vlassov V.V., Zarytova V.F., Lebedev A.V., Fedorova O.S. Design and Targeted Reactions of Oligonucleotide Derivatives. CRC Press: Boca Raton, 1994.
3. Зарытова В.Ф., Кутявин И.В., Подыминовин М.А., Сильников В.Н., Шишкин Г.В. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. С. 1212–1220.
4. Амирханов Н.В., Зарытова В.Ф. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. С. 379–386.
5. Амирханов Н.В., Зарытова В.Ф. // Биоорган. химия. 1990. Т. 16. С. 370–377.
6. Амирханов Н.В., Зарытова В.Ф., Левина А.С. // Биоорган. химия. 1990. Т. 16. С. 1523–1530.
7. Гринева Н.И., Ломакина Т.С., Тугеева Н.Г., Чимитова Т.А. // Биоорган. химия. 1977. Т. 3. С. 210–214.
8. Кнорре Д.Г., Чимитова Т.А. // Молекуляр. биология. 1978. Т. 12. С. 814–821.
9. Knorre D.G., Chimitova T.A. // FEBS Lett. 1981. V. 131. P. 249–252.
10. Беликова А.М., Вахрушева Т.Е., Власов В.В., Гринева Н.И., Кнорре Д.Г., Курбатов В.А. // Молекуляр. биология. 1969. Т. 3. С. 210–219.
11. Wang S., Friedman A.E., Kool E.T. // Biochemistry. 1995. V. 34. P. 9774–9784.
12. Пышный Д.В., Пышная И.А., Лохов С.Г., Иванова Е.М., Зарытова В.Ф. // Биоорган. химия. 1995. Т. 21. С. 709–716.

An Anomalous Temperature Dependence of the Efficiency of the Site-Directed Modification of Nucleic Acids by Oligonucleotide Reagents Forming Reactive Intermediates

N. V. Amirkhanov and N. V. Neronova

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

Abstract—A 22-mer target DNA ρ TGCCTGGAGCTGCTTGATGCCC (I) was modified by a dodecadeoxyribonucleotide reagent GCATCAAGCAGCp[N(CH₃)CH₂RCI] (II) containing a 3'-terminal alkylating group (RCI = -C₆H₄N(CH₃)(CH₂CH₂Cl)). An anomalous, bell-shaped temperature dependence of the maximum extent of the modification was found. Based on the analysis of the kinetic scheme of the modification, a possible explanation for this experimental fact is given.

Key words: nucleic acids, modification; oligonucleotide reagents; kinetic equations; complementary complexes, stability.