



УДК 577.113.4+541.127

РЕАКЦИОННОСПОСОБНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ФОСФОТИОАТНЫХ АНАЛОГОВ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ. IV*. КОМПЛЕМЕНТАРНО-АДРЕСОВАННАЯ МОДИФИКАЦИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И ВНУТРИМОЛЕКУЛЯРНОЕ АЛКИЛИРОВАНИЕ ФОСФОТИОАТНЫХ ГРУПП

© 2000 г. Н. В. Амирханов[#], Н. В. Неронова, В. Ф. Зарьтова

Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8

Поступила в редакцию 03.03.99 г. Принята к печати 12.04.99 г.

Изучена модификация 22-звенной ДНК-мишени рTGCCTGGAGCTGCTTGATGCC (I) алкилирующими производными фосфотиоатных аналогов олигодезоксирибонуклеотидов (ФТАО) GpsCpsApsTrpsCpsApsApsGpsCpsApsGpsCpN(CH₃)CH₂(RCl) (II-PS) и (RCl)CH₂N(CH₃)pGpsCpsApsTrpsCpsApsApsGpsCpsApsGpsC (III-PS), несущими на 3'- или 5'-конце остаток ароматического азотистого иприта (RCl = -C₆H₄N(CH₃)(CH₂CH₂Cl)). Показано, что наличие межнуклеотидных фосфотиоатных (ps) групп в RCl-производных ФТАО не влияет на позиционную направленность модификации ДНК-мишени. Установлено, что предельная (по времени) степень модификации мишени при 20°C составляет приблизительно 25% для обоих производных (II-PS) и (III-PS). При тех же условиях степень модификации реагентом GCATCAAGCAGCpN(CH₃)CH₂(RCl) (II-PO) с межнуклеотидными фосфодиэфирными связями составляет приблизительно 65%. Проведен теоретический анализ кинетической схемы комплементарно-адресованной модификации НК алкилирующими производными ФТАО. Оценены величины констант скоростей реакций активной промежуточной этиленимониевой частицы с фосфотиоатными группами реагента в растворе и в составе дуплекса. Показано, что внутримолекулярное алкилирование фосфотиоатных групп реагента может существенным образом влиять на процесс комплементарно-адресованной модификации НК, что приводит к понижению эффективности модификации в широком интервале температур и изменению характера зависимости модификации от температуры от колоколообразного до S-образного. Сделано заключение о том, что в ходе модификации мишени фосфотиоатной группы реагентов, полученных на основе ФТАО, подвергаются внутримолекулярному алкилированию как в растворе, так и в комплементарном дуплексе, образованном НК-мишенью и олигонуклеотидным реагентом.

Ключевые слова: нуклеиновые кислоты, фосфотиоатные аналоги; алкилирующие олигонуклеотидные реагенты; сайт-специфическая модификация; внутримолекулярное алкилирование; кинетические уравнения.

Фосфотиоатные аналоги олигодезоксирибонуклеотидов (ФТАО) являются предметом изучения исследователей при разработке новых терапевтических подходов к лечению различных вирусных заболеваний, включая СПИД [2–5]. Предполагается, что одной из причин высокой биологической активности ФТАО является их

повышенное сродство к определенным структурным элементам вирусных частиц, ответственных за репродукцию вируса в культуре клеток [4–7]. Создание и использование реакционноспособных производных ФТАО открывает возможность более детального исследования их взаимодействия с вирусными и клеточными биополимерами, поскольку такие производные, в отличие от ФТАО, способны не только образовывать комплексы с биополимерами, но и ковалентно связываться с ними в результате необратимой химической модификации.

Ранее нами были получены реакционноспособные производные ФТАО с присоединенным к 3'- или 5'-концевой фосфатной группе остатком алкилирующего агента *N*-метил-4-(*N*-метил-*N*'-2-

* Сообщение III см. [1].

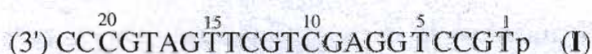
Сокращения: НК – нуклеиновая кислота; ФТАО – фосфотиоатные аналоги олигодезоксирибонуклеотидов; ps – межнуклеотидный фосфотиоатный остаток; HN(CH₃)CH₂RCl – *N*-метил-4-(*N*-метил-*N*'-2-хлорэтиламино)бензиламин; RCl-ФТАО – реакционноспособное производное ФТАО, несущее на 3'- или 5'-конце алкилирующий остаток ароматического азотистого иприта; ϵ_{∞} – предельная по времени (при $t \rightarrow \infty$) степень модификации. Префикс “d” в обозначениях олигодезоксирибонуклеотидов опущен.

[#] Автор для переписки (e-mail: amirkhan@niboch.nsc.ru).

хлорэтиламино)бензиламина [1, 8]. В водных средах такого рода реагенты способны алкилировать высоконуклеофильные межнуклеотидные фосфотиоатные группы ФТАО [9]. Очевидно, что в случае алкилирования биополимера-мишени реагентами на основе ФТАО эффективность модификации в существенной мере будет зависеть от соотношения реакционной способности (нуклеофильности) фосфотиоатных групп в составе RCl-реагента и реакционной способности нуклеофильных центров самой мишени. В литературе не встречается относительных количественных характеристик реакционной способности ps-групп и реакционной способности нуклеофильных центров нуклеиновых кислот и пептидов по отношению к алкилирующей группировке, содержащей остаток ароматического азотистого иприта. В связи с этим до сих пор остается открытым вопрос о принципиальной возможности аффинной модификации НК и белков алкилирующими реагентами на основе ФТАО.

В настоящей работе исследована возможность комплементарно-адресованной модификации нуклеиновых кислот алкилирующими производными ФТАО, содержащими остаток ароматического азотистого иприта. Проведен теоретический анализ процесса аффинной модификации НК реагентами на основе ФТАО и оценено влияние внутримолекулярного алкилирования межнуклеотидных фосфотиоатных групп на эффективность модификации.

В качестве воздействующих на НК-мишень производных ФТАО использовали фосфамидные алкилирующие соединения (II) и (III), содержащие на 3'- или 5'-конце алкилирующую RCl-группировку (схема 1). Реагенты (II-PS) и (III-PS) представляют собой фосфотиоатные аналоги, содержащие межнуклеотидные фосфотиоатные группы. Реагент (II-PO) содержит (исключительно) фосфодиэфирные группы и использован нами в качестве контрольного соединения.



(II) $\text{R}^1 = -\text{OH}$; $\text{R}^2 = -\text{pN}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{RCl}$; (3'-RCl-реагент)

(III) $\text{R}^1 = -\text{pN}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{RCl}$; $\text{R}^2 = -\text{OH}$; (5'-RCl-реагент)

(IV) $\text{R}^1 = -\text{OH}$; $\text{R}^2 = -\text{p}$;

(II-PS), (III-PS) и (IV-PS) – ФТАО

(II-PO) и (IV-PO) – фосфодиэфиры

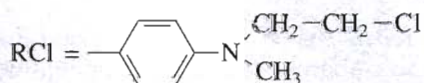


Схема 1.

НК-мишенью в данной работе служил 22-звенный олигодезоксирибоолигонуклеотид (I) (схема 1), имеющий в своем составе участок, комплементарный олигонуклеотидной части реагентов (II) и (III), а также гуаниновые и цитозиновые основания вблизи алкилирующей группы реагентов, способные модифицироваться азотистым ипритом в комплементарном комплексе [10, 11]. Модификацию во всех случаях проводили при существенном избытке реагента по отношению к мишени в течение времени, достаточного для практически полной инактивации реагента.

Сначала исследовали влияние фосфотиоатных групп в составе RCl-ФТАО-реагентов на позиционную направленность алкилирования НК-мишени. Из данных рис. 1 видно, что позиционная направленность алкилирования мишени 3'-алкилирующим производным ФТАО (II-PS) и олигонуклеотидом (II-PO) качественно не различаются. Преимущественной модификации в обоих случаях подвергаются основания G6 и G7. После элиминирования модифицированных оснований обнаруживаются незначительные количества неидентифицированного продукта (не более 10% от общей степени модификации), характеризующегося более низкой электрофоретической подвижностью, чем исходная НК-мишень (I) (рис. 1, аддукт NP). Вероятно, это продукт модификации 5'-концевой фосфатной группы мишени [10, 12, 13].

В случае 5'-алкилирующего реагента (III-PS) (рис. 2) модификации подвергаются преимущественно основания C21 и C22.

Таким образом, приведенные данные подтверждают комплементарно-адресованный характер модификации НК-мишени исследуемыми фосфотиоатными реагентами. Наличие межнуклеотидных фосфотиоатных групп в алкилирующем RCl-ФТАО-реагенте не влияет на позиционную направленность алкилирования.

Далее исследовали влияние ps-групп в составе RCl-ФТАО-реагентов на эффективность модификации НК-мишени.

На рис. 3 приведены кривые зависимости предельной по времени (при $t \rightarrow \infty$) степени модификации (ϵ_∞) мишени для каждого из исследованных реагентов от температуры. При сравнении эффективности модификации мишени фосфотиоатными и фосфодиэфирными реагентами видно, что степень модификации для фосфотиоатных реагентов (II-PS) и (III-PS) (кривые 2 и 3) во всем интервале температур существенно ниже, чем для контрольного фосфодиэфирного реагента (II-PO) (кривая 1). Отчетливо заметен различный характер кривых зависимости предельной степени модификации от температуры. Так, для фосфодиэфирного реагента кривая модификации носит экстремальный (колоколообразный) характер (1), а для фосфотиоатных реагентов – S-образный

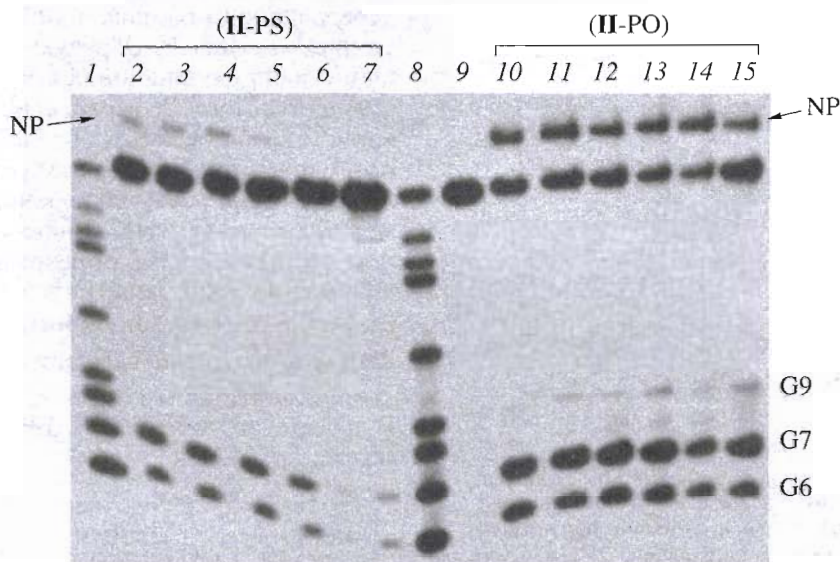


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов расщепления 5'-³²P-меченой ДНК-мишени (I) (10^{-6} М), модифицированной алкилирующими реагентами (II-PS) (2×10^{-5} М) (дорожки 2–7) и (II-PO) (2×10^{-5} М) (дорожки 10–15) при температурах 20 (2, 10), 30 (3, 11), 37 (4, 12), 50 (5, 13), 60 (6, 14) и 70°C (7, 15) с дальнейшей обработкой реакционных смесей пиперидином; продуктов частичного расщепления ДНК-мишени (I) по остаткам пуринов (I) (8), а также исходной ДНК-мишени (I) (9). NP – неидентифицированный продукт модификации.

(2 и 3), косвенно отражающий процесс термической денатурации дуплекса, образованного НК-мишенью и олигонуклеотидной частью реагента.

Таким образом, видно, что наличие фосфотиоатных групп в олигонуклеотидном реагенте заметно влияет на эффективность модификации, значительно понижая ее в широком интервале температур. При этом наблюдаемые различия в процессе модификации носят не только количественный, но и качественный характер.

Существенные различия в эффективности исследуемых фосфотиоатных и фосфодиэфирного реагентов трудно объяснить разной термостабильностью исходных дуплексов. Так, например, значения T_m дуплексов, образованных додекануклеотидами (IV-PO) и (IV-PS) с матрицей (I) (см. схему 1), соответственно равны 58 и 53°C [1]. Это значит, что гибридационные свойства PO- и PS-реагентов, а следовательно и эффективность алкилирования мишени, не должны существенно отличаться друг от друга, особенно в области низких температур, т.е. при практически полной гибридизации. Однако эффективность алкилирования фосфотиоатными реагентами даже при температуре 20°C ($\epsilon_{\infty} \approx 0.25$) или более низкой (рис. 3, кривые 2 и 3) продолжает оставаться существенно ниже эффективности алкилирования фосфодиэфирным реагентом ($\epsilon_{\infty} \approx 0.65$) (рис. 3, кривая 1).

Предельная по времени степень модификации не должна зависеть также и от скорости модификации, определяемой в лимитирующей стадии константой скорости образования этилениммониевого катиона, k_0 [15, 16]. Значения k_0 как для



Рис. 2. Электрофореграмма продуктов расщепления 5'-³²P-меченой ДНК-мишени (I) (10^{-6} М), модифицированной алкилирующим реагентом (III-PS) (2×10^{-5} М) при температурах 20, 30 и 37°C с дальнейшей обработкой реакционных смесей последовательно гидразингидратом и пиперидином (дорожки 1–3 соответственно) и продуктов частичного расщепления ДНК-мишени (I) по остаткам пуринов (4) и пиримидинов (5), а также исходной ДНК-мишени (I) (6).

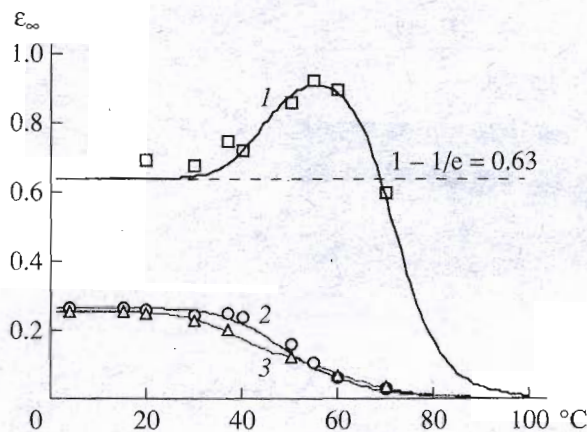


Рис. 3. Экспериментальные точки и теоретические кривые (1–3) зависимости предельной степени модификации ϵ_{∞} от температуры, полученные при комплементарно-адресованной модификации ДНК-мишени (I) контрольным фосфодиэфирным реагентом (II-PO) (\square , 1) и фосфотиоатными алкилирующими реагентами (II-PS) (\circ , 2) и (III-PS) (Δ , 3). Теоретические кривые 1, 2 и 3 построены на основе уравнения (4) при значениях k_1 , k_2 , k'_2 (с^{-1}), ΔH^0 (ккал/моль), ΔS^0 (кал/моль К) и T_m ($^{\circ}\text{C}$), равных: 2.36, 29.15, 5.35, -34500 , -81.6 , 52.8 (1), 0.45, 3.49, 1.08, -35000 , -83.2 , 52.8 (2) и 2.63, 0.87, 0, -45000 , -111.5 , 58.5 (3). Величину K_x для комплексов, образованных НК-мишенью E и реагентами X при различных температурах, определяли по уравнению Вант-Гоффа, используя вышеприведенные, соответствующие для каждого из реагентов (II-PS), (III-PS) и (II-PO), значения ΔH^0 и ΔS^0 . Во всех случаях принимали $[X]_0 = 2 \times 10^{-5}$ M; $k_p = 4.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ с}^{-1}$ [14]. Условия модификации приведены в подписях к рис. 1 и 2 и в "Экспериментальной части".

фосфотиоатных, так и фосфодиэфирных алкилирующих реагентов практически одинаковы [1, 9], т.е. скорость инактивации фосфотиоатных реагентов в растворе такая же, как и скорость инактивации фосфодиэфирного реагента.

В некоторых случаях значительная степень структурированности НК-мишени или олигонуклеотидной части реагента может привести к снижению эффективности модификации мишени [17]. Однако по данным, полученным из кривых денатурации олигонуклеотидов (I), (IV-PO) или (IV-PS), образования шпильчатых структур этими олигонуклеотидами в интервале температур от 10 до 80°C зарегистрировано не было (данные не приведены).

Низкая эффективность модификации мишени фосфотиоатными реагентами может быть обусловлена прежде всего относительно высокими скоростями побочных реакций активной промежуточной частицы P (этилениммониевого катиона [15, 16]) как в растворе, так в комплементарном комплексе EP, образованном частицей P и НК-мишенью. Согласно общей схеме комплементарно-

адресованной модификации НК [18–22] промежуточная частица P, образующаяся в лимитирующей стадии с одинаковой константой скорости k_0 [19] из реагента X в растворе или в комплементарном комплексе EX, образованном биополимером E и реагентом X, может расходоваться параллельно в трех реакциях: с константой скорости k_1 модифицировать НК-мишень в комплементарном комплексе EP с образованием продукта модификации EZ; с константой скорости k_2 образовывать в растворе побочный продукт R и, наконец, с константой скорости k'_2 образовывать в комплементарном комплексе EP тот же продукт R в виде его комплекса ER с биополимером E (схема 2 [18–22]):

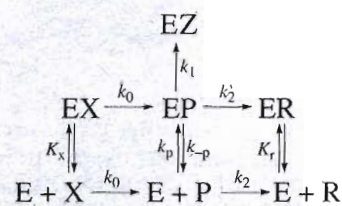


Схема 2.

Здесь E – биополимер (НК-мишень); X – олигонуклеотидный алкилирующий реагент; P – активная промежуточная этилениммониевая частица; R – продукт побочного превращения промежуточной частицы; EZ – продукт модификации полимера; EX, EP и ER – соответствующие комплексы X, P и R с биополимером; K_x , K_r – константы ассоциации для комплексов EX и ER; k_0 , k_1 , k_2 , k'_2 , k_p и k_{-p} – константы скорости соответствующих превращений, показанных на схеме 2.

Теоретический анализ процесса комплементарно-адресованной модификации, протекающего по схеме 2, показывает [18, 21–23], что в зависимости от стабильности комплементарного комплекса EP модификация может протекать в двух различных режимах. Так, в первом случае, когда скорость диссоциации комплекса EP, определяемая константой k_{-p} , намного ниже скоростей реакции частицы P, определяемых константами k_1 , k_2 и k'_2 , модификация может идти в отсутствие обмена промежуточной частицы P между раствором и комплементарным комплексом EP. В обратном случае, когда $k_{-p} \gg k_1, k_2, k'_2$, модификация может идти в режиме активного обмена.

Первый режим модификации наиболее характерен для олигонуклеотидных реагентов, образующих достаточно прочные комплексы с НК-мишенью и возможен при низких температурах, когда реагент X обладает высоким сродством к биополимеру E, т.е. при низких значениях константы k_{-p} . В этом случае выражение для эф-

фактивности модификации может быть записано в виде уравнения (1) [21]:

$$\epsilon_{\infty} = 1 - e^{-\frac{k_1}{k_1+k_2}F} = 1 - e^{-\gamma_0 F}, \quad (1)$$

где ϵ_{∞} – предельная по времени (при $t \rightarrow \infty$) степень модификации НК-мишени, $\gamma_0 = k_1/(k_1 + k_2')$; $F = [EX]/[E]_0$ – степень насыщения биополимера реагентом, при $[X]_0/[E]_0 \gg 1$ равная:

$$F = K_x[X]_0/(1 + K_x[X]_0). \quad (2)$$

Второй режим модификации реализуется при относительно высоких температурах или относительно низком сродстве реагента к мишени, т.е. высоких значениях константы k_{-p} , таких, что $k_{-p} \gg k_1, k_2, k_2'$. Тогда выражение для эффективности модификации может быть записано в виде уравнения (3) [22, 23]:

$$\epsilon_{\infty} = 1 - e^{-\frac{k_1}{k_2}F}. \quad (3)$$

С увеличением температуры величина k_{-p} (константа скорости диссоциации комплементарного комплекса EP), отражающая обратную величину стабильности комплементарного комплекса EP, также возрастает и при этом возможен постепенный переход процесса модификации от первого режима ко второму. В этом случае, согласно уравнениям (1) и (3), в условиях практически полного насыщения биополимера реагентом ($F = 1$), в зависимости от величины соотношений $k_1/(k_1 + k_2')$ и k_1/k_2 при переходе от первого режима модификации ко второму соответствующим образом будет изменяться и эффективность модификации. Так, например, если соотношение k_1/k_2 по своей величине будет превышать величину $k_1/(k_1 + k_2')$, т.е. $k_1/k_2 > k_1/(k_1 + k_2')$ или же $k_1 + k_2'/k_2 > 1$, то эффективность модификации при высоких температурах (соответственно высоких значениях константы скорости диссоциации k_{-p}) будет выше эффективности модификации, наблюдаемой при низких температурах (соответственно низких значениях константы скорости диссоциации k_{-p}). В этом случае в области температур перехода модификации от первого режима ко второму может наблюдаться аномальный участок, на котором увеличение температуры (а следовательно, понижение стабильности комплементарного комплекса) ведет к увеличению эффективности модификации НК-мишени.

Если же соотношение k_1/k_2 по своей величине не будет превышать величину $k_1/(k_1 + k_2')$, т.е. $k_1/k_2 < k_1/(k_1 + k_2')$ или же $(k_1 + k_2')/k_2 < 1$, то эффек-

тивность модификации при высоких температурах будет меньше эффективности модификации, наблюдаемой при низких температурах. Кривая зависимости ϵ_{∞} от температуры в этом случае в области температур перехода модификации от первого режима ко второму может носить типичный S-образный (убывающий с ростом температуры) характер.

В случае существенного избытка реагента по отношению к НК-мишени, т.е. при $[X]_0/[E]_0 \gg 1$, и в предположении, что равновесные константы ассоциации соответствующих комплементарных комплексов EX, ER и EP равны $K_x = K_r = K_p = k_p/k_{-p}$ [17, 24], а также при условии, что $[X]_0/[E]_0 \gg (k_1 + k_2')/k_2$, уравнение, описывающее в целом процесс комплементарно-адресованной модификации НК, протекающий по схеме 2, может быть представлено в виде уравнения (4) [18–20, 24, 25]:

$$\epsilon_{\infty} = [EZ]_{\infty}/[E]_0 = 1 - e^{-\gamma_{эф}F}, \quad (4)$$

где

$$\gamma_{эф} = \frac{1 + k_p/(K_x k_2)}{1/\gamma_0 + k_p/(K_x k_1)} = \frac{1 + k_{-p}/k_2}{1/\gamma_0 + k_{-p}/k_1}; \quad (5)$$

$$\gamma_0 = k_1/(k_1 + k_2'); F = K_x[X]_0/(1 + K_x[X]_0).$$

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

Однако, как видно из данных рис. 4, независимо от значения величины k_2 кривая модификации при увеличении стабильности комплементарного комплекса (т.е. при уменьшении параметра k_{-p}) стремится к величине ϵ_{∞} , равной $1 - \exp(-\gamma_0)$ (кривые 3 и 4), либо при значении константы k_2' , равной нулю – к величине ϵ_{∞} , равной $1 - 1/e = 0.63$ (кривые 1 и 2). Другими словами, эффективность модификации при низких температурах определяется величиной коэффициента $\gamma_0 = k_1/(k_1 + k_2')$, т.е. соотношением констант k_1 и k_2' , и не зависит от скорости инактивации промежуточной частицы P в растворе, определяемой константой k_2 .

Как следует из этих же данных, при возрастании величины k_{-p} , т.е. при уменьшении стабильности комплементарного комплекса, при соотношении $(k_1 + k_2')/k_2 > 1$ наблюдается повышение ϵ_{∞} относительно величины, равной $1 - \exp(-\gamma_0)$ (рис. 4,

Значения кинетических и термодинамических параметров модификации для алкилирующих реагентов (II-PS), (II-PO) и (III-PS) при аффинной модификации ДНК-мишени (I), оцененные путем корреляции экспериментальных зависимостей ϵ_{∞} от температуры (рис. 3) и расчетных значений ϵ_{∞} , вычисленных по уравнению (4) (см. "Приложение"), при значении константы k_p , равной $4.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ [14]

Реагент	k_1, c^{-1}	k_2, c^{-1}	k_2', c^{-1}	γ_0	$(k_1 + k_2')/k_2$	$(\Delta H^0)**$, ккал/моль	$(\Delta S^0)**$, кал/моль К	$T_m, \text{ }^\circ\text{C}$	$(R^2)***$
(II-PO)*	2.63	0.87	0	1	3.0	-45.0	-111.49	58.5	0.9984
(II-PS)	2.36	29.2	5.4	0.31	0.26	-34.5	-81.64	52.8	0.9933
(III-PS)	0.45	3.49	1.08	0.29	0.44	-35.0	-83.17	52.8	0.9998

* Параметры для реагента (II-PO) приведены по данным работы [24].

** Приведены оптимальные значения ΔH^0 и ΔS^0 , найденные корреляционным методом (см. "Приложение").

*** R^2 – максимальное значение коэффициента корреляции экспериментальных данных и расчетных значений ϵ_{∞} , вычисленных по уравнению (4).

кривая 3) или $1 - 1/e = 0.63$ (рис. 4, кривая 1), тогда как при соотношении констант $(k_1 + k_2')/k_2 \leq 1$ – понижение ϵ_{∞} (рис. 4, кривая 4 и 2). Иначе говоря, при относительно низкой стабильности комплементарного комплекса, т.е. при высоких температурах, эффективность модификации и соответственно общий характер кривой модификации существенным образом зависят от скорости инактивации промежуточной частицы Р в растворе, определяемой константой k_2 .

Аналогично ранее предложенному корреляционному методу [24] (см. "Приложение"), исходя из экспериментальных данных зависимости ϵ_{∞} от

температуры, и, используя уравнение (4)*, были оценены величины констант k_1 , k_2 и k_2' соответствующих превращений промежуточной частицы Р для всех исследованных нами реагентов (II-PS), (II-PO) и (III-PS) (таблица). По уравнению (4) с помощью оцененных таким образом параметров были рассчитаны значения предельной по времени степени модификации. Из рис. 3 видно, что между расчетной кривой и экспериментальными величинами ϵ_{∞} наблюдается хорошее соответствие.

Из данных таблицы видно, что соотношение констант $(k_1 + k_2')/k_2$ для фосфодиэфирного реагента (II-PO) равно 3, т.е. $(k_1 + k_2')/k_2 > 1$. Согласно вышеприведенному анализу кинетической схемы комплементарно-адресованной модификации, в этом случае зависимость ϵ_{∞} от температуры может носить экстремальный характер (рис. 3, 1), поскольку в области температуры плавления дуплекса, когда происходит активный обмен промежуточной частицы между комплексом и раствором, перераспределение частицы Р идет в пользу образования продукта модификации EZ. Соотно-

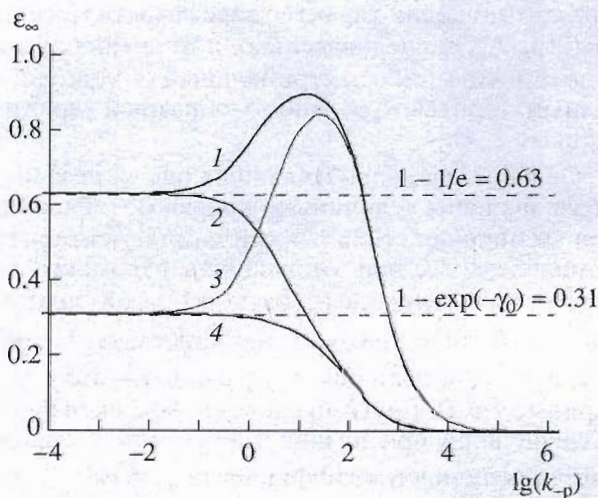


Рис. 4. Теоретические кривые зависимости предельной по времени степени модификации (ϵ_{∞}) НК-мишени от величины k_p (константы скорости диссоциации комплементарного комплекса EX), рассчитанные по уравнению (4) при k_1, k_2, k_2' (c^{-1}) и $(k_1 + k_2')/k_2$, равных 3, 1, 0, 3 (1), 3, 10, 0, 0,3 (2), 3, 1, 5, 8 (3) и 3, 10, 5, 0,8 (4) соответственно. Во всех случаях принимали $[X]_0 = 2 \times 10^{-5} \text{ M}$; $k_p = 4.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ [14]. $\gamma_0 = k_1/(k_1 + k_2')$.

* Несмотря на возможность образования продуктов внутримолекулярного алкилирования межнуклеотидных рс-групп при инактивации RCl-ФТАО-реагента в водном растворе [9], методом термической денатурации было определено, что константы ассоциации дуплексов, образованных НК-матрицей (I) с додсканклеотидом (IV-PS) мало отличаются от константы ассоциации дуплекса, образованного той же матрицей (I) с продуктами инактивации соответствующего реагента (II-PS) или (III-PS) (данные не приведены). Это позволяет допустить, что значения констант ассоциации с НК-мишенью реагента X и продукта его инактивации R в растворе для RCl-ФТАО-реагентов мало отличаются друг от друга, т.е. $K_x = K_r$. Также, согласно работам [17, 24], можно предположить, что $K_x = K_p$. Аналогичные данные были получены и для фосфодиэфирного реагента (II-PO). В связи с этим для расчета экспериментальных зависимостей ϵ_{∞} от температуры как для фосфодиэфирных, так и для RCl-ФТАО-реагентов нами было использовано уравнение (4), выведенное в предположении о том, что $K_x = K_r$ [25].

шения констант $(k_1 + k'_2)/k_2$ для фосфотиоатных реагентов (II-PS) и (III-PS) соответственно равны 0.26 и 0.44, т.е. $(k_1 + k'_2)/k_2 < 1$. Для этих реагентов зависимость ϵ_∞ от температуры не может иметь экстремальный характер (рис. 3, 1 и 2), поскольку активный обмен промежуточной частицы между комплексом и раствором приводит к ее перераспределению в пользу образования побочного продукта R в растворе.

Значения констант k_1 для реагентов (II-PS) и (II-PO) практически совпадают (2.63 и 2.36 с⁻¹, соответственно). Это вполне возможно, поскольку, как было показано выше, позиционная направленность алкилирования мишени не зависит от присутствия ps-групп в реагенте (рис. 1) и модификация в данном случае идет по одним и тем же нуклеофильным центрам НК-мишени. В случае реагента (III-PS), когда алкилируются остатки цитозина (рис. 2), значение константы k_1 (0.45 с⁻¹) несколько ниже, чем для реагентов (II-PS) и (II-PO), которыми модифицируются более нуклеофильные остатки гуанина (рис. 1).

Для фосфотиоатных реагентов (II-PS) и (III-PS) значения константы k_2 (29.2 и 3.49 с⁻¹, соответственно), характеризующей собой скорость побочных реакций промежуточной частицы P в растворе, существенно выше величины константы k_2 (0.87 с⁻¹) для фосфодиэфирного реагента (II-PO). Поскольку во всех экспериментах модификация проводилась в одинаковой буферной системе, то наиболее вероятным объяснением такого различия в значениях констант k_2 для фосфотиоатных и фосфодиэфирных реагентов может быть то, что при модификации фосфотиоатными реагентами инактивация реагента в растворе происходит преимущественно за счет внутримолекулярного алкилирования высококонкулофильных ps-групп реагента [9]*.

Из данных рис. 3 видно, что зависимость ϵ_∞ от температуры для фосфодиэфирного реагента (II-PO) (кривая 1) при низких температурах стре-

мится к величине 0.63. Согласно вышеприведенному анализу это возможно лишь при значении $\gamma_0 = 1$, т.е. $k'_2 = 0$ или $k_1 \gg k'_2$. Таким образом, в пределах чувствительности корреляционного метода [24], на основе которого проводилась оценка количественных характеристик модификации, значение константы k'_2 для фосфодиэфирного реагента (II-PO) по сравнению с величиной k_1 можно считать равным нулю. То есть, можно полагать, что при использовании фосфодиэфирного реагента, не содержащего ps-групп, образования побочного продукта в дуплексе не происходит. В случае же фосфотиоатных реагентов (II-PS) и (III-PS) значения константы k'_2 (5.4 и 1.08 с⁻¹) сравнимы с величиной константы k_1 (2.36 и 0.45 с⁻¹), что указывает на ощутимый вклад побочных реакций промежуточной частицы P в комплексе EP. Поскольку реагенты (II-PS) и (II-PO) отличаются друг от друга по составу лишь природой фосфатных групп, то наиболее вероятной причиной побочных реакций в комплексе с фосфотиоатными реагентами может быть, как и для побочных реакций в растворе, внутримолекулярное алкилирование межнуклеотидных ps-групп из комплекса EP. Однако, в отличие от алкилирования ps-групп реагента в растворе с константой скорости k_2 , внутримолекулярное алкилирование в данном случае проходит непосредственно в составе комплементарного комплекса с константой скорости k'_2 .

Таким образом, можно заключить, что наличие высококонкулофильных фосфотиоатных межнуклеотидных групп в олигонуклеотидных реагентах приводит к увеличению скорости побочных реакций инактивации активной промежуточной частицы (этилениммониевого катиона). Это, скорее всего, происходит за счет внутримолекулярного алкилирования ps-групп [9] как в растворе, так и в комплементарном комплексе, что, вероятно, и является причиной низкой эффективности комплементарно-адресованной модификации НК алкилирующими производными ФТАО. Причем, относительно высокая скорость инактивации промежуточной частицы в растворе в случае фосфотиоатных реагентов приводит к исчезновению экстремального характера зависимости ϵ_∞ от температуры, наблюдаемого в случае модификации контрольным фосфодиэфирным реагентом. Относительно же высокая скорость побочной реакции инактивации промежуточной частицы в составе дуплекса приводит к снижению эффективности модификации фосфотиоатными реагентами и при низких температурах, т.е., при практически полной гибридизации.

* Как видно из данных таблицы, значения константы скорости k_2 алкилирования ps-групп для 3'-RCI-ФТАО-реагента (II-PS) значительно выше, чем для 5'-RCI-ФТАО-реагента (III-PS). Вероятно, это связано с несколько различающейся пространственной организацией 3'- и 5'-концевых остатков эти реагентов, в частности, с различной удаленностью друг от друга ps- и RCI-групп в 3'- и 5'-производных. Очевидно, что чем более удалены в пространстве друг от друга ps- и RCI-группы, тем менее эффективнее должна быть реакция внутримолекулярного алкилирования ps-групп. Однако относительно высокие значения констант k_2 и k'_2 при модификации 3'-RCI-ФТАО-реагентом (II-PS) нивелируются высокими значениями константы k_1 (см. таблицу). Вероятно, вследствие этого эффективность модификации мишени 3'- и 5'-RCI-производными в исследуемых интервалах температур незначительно отличаются друг от друга (рис. 3, кривые 2 и 3).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Приложение

Синтез и основные характеристики использованных в работе олигонуклеотидов и их алкилирующих производных описаны нами ранее [1]. Олигодезоксирибонуклеотид (I) синтезирован твердофазным фосфитамиditным методом [26] на отечественном синтезаторе ASM-102U и любезно предоставлен О.А. Батуриной (НИБХ СО РАН).

$5'$ - 32 P-Меченый олигонуклеотид (I) получали по методу, описанному в работе [27], с использованием [γ - 32 P]АТФ.

Модификацию ДНК-мишени (I) реакционноспособными производными (II) или (III) проводили в водном буфере, содержащем 0.2 М NaCl, 0.01 М Трис-HCl (pH 7.5), 1 мМ EDTA (рис. 1–3). Предельную степень модификации определяли после инкубации реакционной смеси в течение более пяти периодов полупревращения реагента в гидролизованной водой продукт. Время, необходимое для проведения реакции алкилирования при различных температурах (4, 15, 20, 30, 37, 40, 50, 55, 60 и 70°C), было рассчитано по методу, описанному в работе [15], и составляло не менее 15, 5 сут, 60, 14, 8.5, 4.8, 1 ч, 35, 20 и 7 мин соответственно.

Реакционные смеси подвергали электрофорезу в 20% ПААГ (7 М мочевины, 0.05 М Трис-борат (pH 8.5), 1 мМ EDTA, рис. 1, 2). После радиоавтографии (пленка РМ-1) участки геля, содержащие радиоактивный материал, вырезали и измеряли их радиоактивность в толуольном сцинтилляторе, используя счетчик Mark III (Nuclear Chicago, США).

Расщепление модифицированного олигонуклеотида-мишени по остаткам алкилированных пуринов проводили при 95–100°C 10% водным раствором пиперидина [28] в течение 30–50 мин, по остаткам N^3 -алкилцитидинов – обработкой модифицированной мишени смесью гидразингидрат–диоксан–вода, 2 : 1 : 1, в течение 1.5–2 ч при 0°C с последующей обработкой пиперидином, как описано в работе [29]. Продукты частичного расщепления цепи по пуринам получали, обрабатывая олигонуклеотид 30–40 мин 2% раствором дифениламина в 66% водной муравьиной кислоте при 37°C [30]. Для получения продуктов частичной деструкции олигонуклеотидной цепи по остаткам пиримидинов применяли последовательно обработку гидразингидратом (37°C, 30–40 мин), а затем пиперидином при 95–100°C в течение 30–50 мин [28]. По завершении олигонуклеотидный материал выделяли осаждением, добавляя 10–15-кратный избыток (по объему) 2% перхлората лития в ацетоне, растворяли в формамиде и подвергали электрофорезу.

Обсчет экспериментальных данных и построение теоретических кривых модификации проводили с использованием программы Microsoft Excel.

АЛГОРИТМ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЗНАЧЕНИЙ КОНСТАНТ СКОРОСТЕЙ ВНЕ- И ВНУТРИКОМПЛЕКСНЫХ РЕАКЦИЙ АКТИВНОЙ ПРОМЕЖУТОЧНОЙ ЭТИЛЕНИММОНИЕВОЙ ЧАСТИЦЫ

(k₁, k₂ И k'₂)

Неизвестными параметрами уравнений (4) и (5) являются пять величин: значения трех констант k₁, k'₂ и k₂ и значения двух термодинамических параметров комплексообразования ΔH^0 и ΔS^0 , необходимых для определения величины K_x при различных температурах*. Прямой метод подгонки экспериментальных данных и теоретических кривых модификации, построенных с помощью уравнения (4), путем варьирования значениями пяти вышеприведенных параметров, в данном случае является достаточно неточным и неоднозначным. Поэтому был использован другой вариант подгонки с использованием двух (ΔH^0 и γ_0 , в случае когда k'₂ ≠ 0) или одного (ΔH^0 , когда k'₂ = 0) варьируемого параметров.

Учитывая, что промежуточная частица Р – чрезвычайно реакционноспособна, энергия активации ее превращений в дуплексе и в растворе должна быть небольшой по сравнению с энергией диссоциации комплекса реагента с биополимером и в первом приближении можно полагать, что величины констант скоростей k₁, k₂ и k'₂ будут мало зависеть от температуры, и в рамках такого приближения считать их постоянными. В этом случае с помощью выражения (5) можно по зависимости $\gamma_{эф}$ от величины K_x определить значения k₁ и k₂. С этой целью удобно воспользоваться линейной анаморфозой:

$$\frac{1}{\gamma_{эф} - \gamma_0} = AK_x + B, \quad (6)$$

где

$$\gamma_0 = k_1 / (k_1 + k'_2);$$

$$A = \frac{k_1 k_2}{k_p \gamma_0 (k_1 - \gamma_0 k_2)}; \quad B = \frac{k_2}{k_1 - \gamma_0 k_2};$$

* Величина k_p, близкая к значению константы для реакции, контролируемой диффузией, в соответствии с литературными данными может быть оценена как 10⁶–10⁷ М⁻¹ с⁻¹ и практически не зависит от температуры [31]. В связи с этим, константу скорости ассоциации, k_p, в данной работе для всех комплексов считали известной и принимали равной средней величине, оцененной в работе [14]: k_x = k_p = 4.4 × 10⁶ М⁻¹ с⁻¹.

и соответственно

$$k_1 = \frac{k_p \gamma_0 A}{B}; \quad k_2 = \frac{k_p \gamma_0 A}{1 + \gamma_0 B}.$$

Для нахождения по этим уравнениям неизвестных значений констант k_1 и k_2 из экспериментальных данных нужно располагать значениями $\gamma_{\text{эф}}$ и K_x при нескольких температурах и значением параметра γ_0 . Величина K_x при разных температурах определяется по уравнению Вант-Гоффа, исходя из термодинамических параметров комплексообразования ΔH^0 и ΔS^0 , где ΔH^0 варьируемая величина, а величина ΔS^0 оценивается, исходя из экспериментальной величины T_m исследуемого дуплекса, по уравнению $\Delta S^0 = R \ln(2/E_0') + \Delta H^0/(T_m + 273)$, где E_0' – начальная концентрация НК-мишени, использованной при термической денатурации ее дуплекса с олигонуклеотидом, не содержащим реакционноспособную группу*. Исходя из найденной таким образом величины K_x и из экспериментальных значений ϵ_{∞} , по уравнению (4) при каждой отдельной температуре определяют значение $\gamma_{\text{эф}}$.

Величина γ_0 , входящая в уравнение (5), является вторым варьируемым параметром, и при значении $k_2' = 0$ она равна единице. При анализе уравнений (4), а также из данных, приведенных на рис. 4, легко заметить, что при значении $\gamma_0 = 1$ предельная степень модификации при $k_p \rightarrow 0$ (т.е. при $t \rightarrow 0$) стремится к величине, равной $1 - \exp(-\gamma_0) = 0.63$ (рис. 4, кривые 1 и 2). При значениях же $\gamma_0 \neq 1$, т.е., когда присутствует стадия прямой реакции в комплементарном комплексе $EP \rightarrow ER$ ($k_2' \neq 0$), при $k_p \rightarrow 0$ значение величины ϵ_{∞} всегда меньше 0.63 и стремится к величине $1 - \exp(-\gamma_0)$ (рис. 4, кривые 3 и 4), что и соответствует значению модификации при низких температурах. Величина γ_0 в данном случае может быть определена по значениям ϵ_{∞} при низких температурах по формуле $\gamma_0 = -\ln(1 - \epsilon_{\infty})$, которая для реагентов (II-PS) и (III-PS) равна 0.31 и 0.29 соответственно. Далее, исходя из известных значений γ_0 и k_1 из соотношения $\gamma_0 = k_1/(k_1 + k_2')$ определяют величину константы k_2' :

$$k_2' = \frac{k_1(1 - \gamma_0)}{\gamma_0}.$$

Найденные оптимальные значения неизвестных параметров модификации (k_1 , k_2' , k_2 , ΔH^0 и

ΔS^0) при соответствующих максимальных значениях коэффициента корреляции R^2 для исследуемых реагентов (II-PO), (II-PS) и (III-PS) приведены в таблице.

Авторы выражают глубокую благодарность Кнорре Д.Г., Левиной А.С., Ивановой Е.М., Пышному Д.В. и Федоровой О.С. за живой интерес к работе, полезную дискуссию и ценные рекомендации при обсуждении результатов.

Работа финансировалась в рамках ГНТП по теме “Новейшие методы биоинженерии. Ген-направленные биологически активные вещества” и частично грантами МНТП “Биотехнология” № ЗН-124-954 и РФФИ № 96-04-5091.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Амирханов Н.В., Неронова Н.В., Маркушин Ю.Я., Ямковой В.И., Зарытова В.Ф. // Биоорганическая химия. 1999. Т. 25. С. 383–392.
2. Matsukura M., Zon G., Shinozuka K., Robert-Guroff M., Shimada T., Stein C.A., Mitsuya H., Wong-Staal F., Cohen J.S., Broder S. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. P. 4244–4249.
3. Stein C.A., Matsukura M., Subasinghe C., Broder S., Cohen J.S. // AIDs Res. Human Retroviruses. 1989. V. 5. P. 639–646.
4. Stein C.A., Pal R., De Vico A.L., Hoke G., Mumbauer S., Kinstler O., Sarngadharan M.G., Letsinger R.L. // Biochemistry. 1991. V. 30. P. 2439–2444.
5. Gao W.Y., Jaroszewski J.W., Cohen J.S., Cheng Y.C. // J. Biol. Chem. 1990. V. 265. P. 20172–20178.
6. Majumdar C., Stein C.A., Cohen J.S., Broder S., Wilson S. // Biochemistry. 1989. V. 28. P. 1340–1346.
7. Якубов Л.А., Власов В.В., Занг Л.М., Стайн С.А. // Докл. РАН. 1992. Т. 327. С. 593–597.
8. Амирханов Н.В., Зарытова В.Ф. // Биоорганическая химия. 1995. Т. 21. С. 365–375.
9. Амирханов Н.В., Зарытова В.Ф. // Биоорганическая химия. 1997. Т. 23. С. 569–575.
10. Зарытова В.Ф., Кутявин И.В., Подыминогин М.А., Сильников В.Н., Шишкин Г.В. // Биоорганическая химия. 1987. Т. 13. С. 1212–1220.
11. Карпова Г.Г. // Изв. СО АН СССР. Сер. хим. 1987. № 1. С. 82–95.
12. Амирханов Н.В., Зарытова В.Ф. // Биоорганическая химия. 1989. Т. 15. С. 379–386.
13. Веньяминова А.Г., Гринева Н.И., Карпова Г.Г. // Изв. СО АН СССР. Сер. хим. 1974. № 1. С. 130–133.
14. Wang S., Friedman A.E., Kool E.T. // Biochemistry. 1995. V. 34. P. 9774–9784.
15. Гринева Н.И., Ломакина Т.С., Тигеева Н.Г., Чимитова Т.А. // Биоорганическая химия. 1977. Т. 3. С. 210–214.
16. Беликова А.М., Вахрушева Т.Е., Власов В.В., Гринева Н.И., Кнорре Д.Г., Курбатов В.А. // Молекулярная биология. 1969. Т. 3. С. 210–219.
17. Федорова О.С. Химическая модификация нуклеиновых кислот в комплементарных комплексах: ки-

* Если же значение T_m неизвестно, то параметр ΔS^0 , наряду с параметрами ΔH^0 и γ_0 , является третьей варьируемой величиной.

- нетические, термодинамические и структурные аспекты: Дис. ... докт. хим. наук. Новосибирск: НИБХ СО РАН, 1997. 300 с.
18. Кнорре Д.Г., Чимитова Т.А. // Молекуляр. биология. 1978. Т. 12. С. 814–821.
 19. Кнорре Д.Г., Адин-Зада А., Коваль В.В., Федорова О.С. Химическая физика на пороге XXI века. К 100-летию акад. Н.Н. Семенова. М.: Наука, 1996. С. 199–212.
 20. Knorre D.G., Vlassov V.V., Zarytova V.F., Lebedev A.V., Fedorova O.S. Design and Targeted Reactions of Oligonucleotide Derivatives. Boca Raton: CRC Press, Inc., 1993.
 21. Казанцев А.В., Максакова Г.А., Федорова О.С. // Биоорган. химия. 1995. Т. 21. С. 767–773.
 22. Кнорре Д.Г., Зарытова В.Ф., Бадашкева 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. 117–131.
 23. Knorre D.G., Fedorova O.S. // J. Chem. Biochem. Kin. 1994. V. 1. P. 31–38.
 24. Амирханов Н.В. // Докл. РАН. 1998. Т. 359. С. 405–408.
 25. Knorre D.G., Chimitova T.A. // FEBS Lett. 1981. V. 131. P. 249–252.
 26. Грязнов С.М., Горн В.В., Зарытова В.Ф., Кумарев В.П., Левина А.С., Полищук А.С., Попанов В.К., Потемкин Г.А., Средин Ю.Г., Шабарова З.А. // Изв. СО АН СССР. Сер. хим. 1987. № 1. С. 119–123.
 27. Berkner K.L., Folk W.R. // J. Biol. Chem. 1977. V. 252. P. 3176–3184.
 28. Maxam A.M., Gilbert W. // Meth. Enzymol. 1980. V. 65. P. 499–560.
 29. Kirkegaard K., Buc H., Spassky A., Wang J.C. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1983. V. 80. P. 2544–2548.
 30. Коробко В.Г., Грачев С.А. // Биоорган. химия. 1977. Т. 3. С. 1420–1422.
 31. Freier S.M., Albergo D.D., Turner D.H. // Biopolymers. 1983. V. 22. P. 1107–1131.

Reactive Derivatives of Oligonucleotide Phosphorothioate Analogues.

IV. Site-Directed Modification of Nucleic Acids and Intramolecular Alkylation of Phosphorothioate Groups

N. V. Amirkhanov[#], N. V. Neronova, and V. F. Zarytova

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

Alkylation of the 22-mer DNA target pTGCCTGGAGCTGCTTGATGCC (I) by oligodeoxynucleotide phosphorothioate derivatives (PTAO) GpsCpsApsTpsCpsApsApsGpsCpsApsGpsCpN(CH₃)CH₂(RCl) (II-PS) and (RCl)CH₂N(CH₃)pGpsCpsApsTpsCpsApsApsGpsCpsApsGpsC (III-PS) bearing a residue of an aromatic analogue of nitrogen lost (RCl = C₆H₄N(CH₃)(CH₂CH₂Cl) at the 3'- or 5'-end was studied. It was shown that the internucleotide phosphorothioate bonds do not affect the regiospecificity of the target modification. The maximum degree of the target modification (at $t \rightarrow \infty$) at 20°C was about 25% for both (II-PS) and (III-PS). The use of GCATCAAGCAGCpN(CH₃)CH₂(RCl) (II-PO), containing internucleotide phosphodiester bonds, under the same conditions gave about 65% of the modified DNA. Kinetics of the PTAO-induced complementarily addressed nucleic acid (NA) modification was analyzed. The rate constants of the reaction of the intermediate reactive ethylenimmonium ion with phosphorothioate groups of the reagents were evaluated both in solution and in duplex. The intramolecular alkylation of phosphorothioate groups considerably affected the DNA target modification by decreasing the effectiveness of the modification in a wide range of temperatures and changing the temperature dependence of the modification from a bell-like to an S-like profile. It was concluded that, in the course of the modification, the PTAO phosphorothioate groups are intramolecularly alkylated both in solution and in the complementary NA target–oligonucleotide duplex.

Key words: alkylating oligonucleotide reagents, intramolecular alkylation, kinetic equations, nucleic acids, phosphorothioate analogues, site-specific (complementarily addressed) modification

[#] To whom correspondence should be addressed; e-mail: amirkhan@ns.niboch.nsc.ru.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 2. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.