



УДК 547.963. 32:543. 42

ОЦЕНКА ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК
КОНФОРМАЦИОННОГО ПЕРЕХОДА
В 2', 3'-О-[4-(N-2-ХЛОРЭТИЛ-N-МЕТИЛАМИНО)БЕНЗИЛИДЕН]-
УРИДИН-5'-ФОСФАТЕ

Райт В. К.

Новосибирский государственный университет

На основании температурной зависимости интенсивности при 270 нм в спектре КД рURCl выполнена оценка термодинамических характеристик внутримолекулярного взаимодействия в рURCl между урацилом и фенильным остатком. Конформационному переходу рURCl в состояние со сближенными ароматическими системами соответствуют $\Delta H = -4,7 \pm 0,9$ ккал/моль и $\Delta S = -14,5 \pm 1,2$ э. е. ΔG перехода по величине ($-0,6 \div -0,7$ ккал/моль) сопоставимо со значениями ΔG стэкинга оснований в коротких олигонуклеотидах. Обсуждено влияние внутримолекулярного взаимодействия в 3'-концевом модифицированном звене 2',3'-О-бензилиденовых производных олигонуклеотидов на их конформацию.

2',3'-О-[4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензилиден]нуклеозид-5'-фосфаты являются 3'-концевыми фрагментами производных олигонуклеотидов, используемых для комплементарно адресованного алкилирования нуклеиновых кислот [1—3]. В спектрах КД всех синтезированных к настоящему времени NRCl и рNRCl регистрируется двойной эффект Коттона, возникающий вследствие диполь-дипольного взаимодействия, которое способствует сближению азотистого основания и бензольного кольца и стабилизации определенной конформации нуклеозидов и нуклеотидов [4—8]. Потенциально внутримолекулярное взаимодействие в 3'-концевом фрагменте алкилирующих производных олигонуклеотидов может быть препятствием как для адаптации основания модифицированного нуклеотидного звена в односпиральной структуре олигонуклеотида, так и при образовании комплементарных комплексов.

Ранее было показано, что в водных растворах с повышением температуры внутримолекулярное взаимодействие в рNRCl разрушается и при этом восстанавливается спектр КД, характерный для соответствующего структурного аналога — 2',3'-О-изопропилденнуклеозидов [4, 7]. Это обстоятельство использовано в настоящей работе для оценки термодинамических характеристик внутримолекулярного взаимодействия в рURCl по зависимости дихроичного молярного коэффициента экстинкции ($\Delta\epsilon$) от температуры.

Сокращения: NRCl — 2',3'-О-[4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензилиден]нуклеозид; рNRCl — 2',3'-О-[4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензилиден]нуклеозид-5'-фосфат.

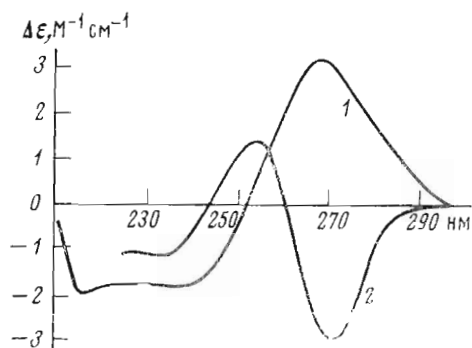


Рис. 1. Спектры КД уридин-5'-фосфата (1) и 2', 3'-О-[4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)-бензилиден]уридин-5'-фосфата (2)

$t, ^\circ\text{C}$	1,25	7,00	16,90	22,00	32,25	42,50	51,50	65,50
$\Delta\varepsilon$	-2,8	-2,7	-2,4	-2,1	-2,1	-1,6	-1,4	-0,8

Из данных такого рода можно извлечь термодинамические характеристики, используя метод расчета, разработанный для термодинамического анализа оптически регистрируемых конформационных переходов в полинуклеотидах [10]. Метод этой работы, однако, применим лишь для обобщения экспериментальных данных, представляемых в виде кривой с перегибом. Так как в нашем случае зависимость $\Delta\varepsilon$ от температуры носит монотонный характер и является, по-видимому, лишь частью такой кривой, мы применили в приближении модели двух состояний процедуру определения термодинамических характеристик, предложенную при исследовании конформационного перехода в аденилил-(5'-N)-анизидине [11].

Полагая, что рURCl в растворе находится в виде форм со сближенными ароматическими системами (А) и не взаимодействующими (Б) и представляет собой смесь двух диастереомеров в соотношении 1 : 1 [4, 5, 7], можно записать:

$$\Delta\varepsilon = \frac{K_1}{K_1 + K_2 + 1} \Delta\varepsilon_{A_1} + \frac{K_2}{K_1 + K_2 + 1} \Delta\varepsilon_{A_2} + \frac{1}{K_1 + K_2 + 1} \Delta\varepsilon_B, \quad (1)$$

где $K_1 = [A_1]/[B]$ и $K_2 = [A_2]/[B]$.

Поскольку расстояния между центрами ароматических систем у диастереомеров A_1 и A_2 различаются незначительно [5, 7], можно сделать допущение $K_1 = K_2$, которое позволяет привести уравнение (1) к виду

$$\Delta\varepsilon = \frac{K}{2K + 1} \Delta\varepsilon_A + \frac{1}{2K + 1} \Delta\varepsilon_B. \quad (2)$$

Вводя обозначения $\Delta = \Delta\varepsilon - \Delta\varepsilon_B$ и $\Delta_0 = \Delta\varepsilon_A - 2\Delta\varepsilon_B$, получим

$$\Delta = \frac{K}{2K + 1} \Delta_0, \quad (3)$$

откуда

$$\frac{1}{\Delta} = \frac{1}{\Delta_0} \left(2 + \frac{1}{K} \right). \quad (4)$$

Для определения величины изменения энтальпии (ΔH) при переходе $B \rightarrow A_1 + A_2$ уравнение (4) можно преобразовать:

$$\frac{d(1/\Delta)}{d(1/T)} = \frac{\Delta H}{R} \cdot \frac{1}{\Delta} - \frac{\Delta H}{R} \cdot \frac{2}{\Delta_0}. \quad (5)$$

Из последнего уравнения следует, что по экспериментальной зависимости $1/\Delta$ от $1/T$ можно определить ΔH и Δ_0 , построив зависимость $d(1/\Delta)/d(1/T)$ от $1/\Delta$. При построении этих зависимостей, приведенных на рис. 2 и 3, в качестве $\Delta\varepsilon_B$ использовали дихроичный молярный коэффи-

Спектр 2',3'-О-изопропилиденуридина [7, 9] подобен спектру рU и отличается в интервале 250—300 нм лишь меньшими значениями $\Delta\varepsilon$ (рис. 1). Максимальная разность коэффициентов экстинкции, таким образом, у изопропилиденового и бензилиденового производных уридина обнаруживается в спектрах КД вблизи 270 нм. Выполняя измерения $\Delta\varepsilon$ рURCl при этой длине волны и различных температурах, мы нашли следующую зависимость:

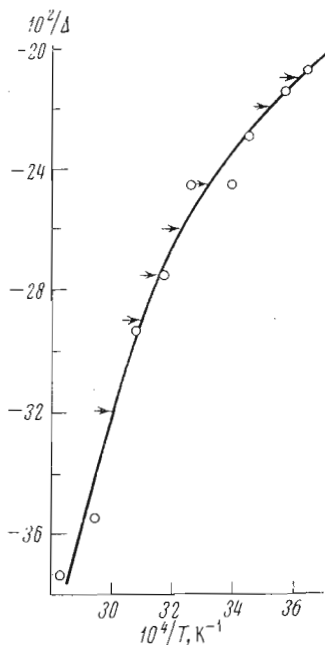


Рис. 2

Рис. 2. График зависимости для определения величины производной $d(1/\Delta)/d(1/T)$. Стрелками указаны точки дифференцирования

Рис. 3. График зависимости для определения изменения энтальпии процесса внутримолекулярного взаимодействия

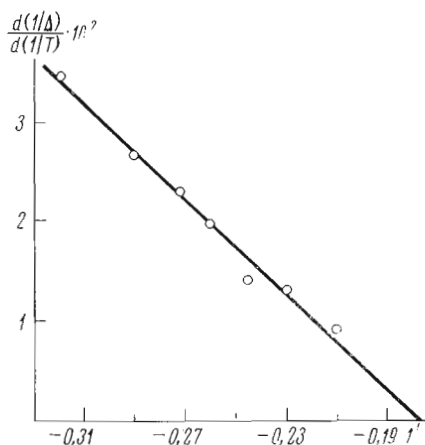


Рис. 3

циент экстинкции $2',3'$ -О-изопропилиденуридина, равный $2 \text{ M}^{-1}\text{см}^{-1}$ [9]. По наклону прямой на рис. 3, а также из величины, отсекаемой на оси абсцисс, нашли соответственно $\Delta H = -4,7 \pm 0,9$ ккал/моль и $\Delta_0 = -11,4 \pm 0,6 \text{ M}^{-1}\text{см}^{-1}$. Имея значение Δ_0 , по формуле

$$K = \frac{\Delta}{\Delta_0 - 2\Delta},$$

которая следует из уравнения (3), можно рассчитать K при различных температурах и построить в соответствии с уравнением Вант-Гоффа график зависимости $\lg K$ от обратной температуры (рис. 4). В этом случае $\Delta H = -4,5 \pm 0,4$ ккал/моль, $\Delta S = -14,5 \pm 1,2$ э. е.

Изменению свободной энергии (ΔG) перехода pU RCl в состояние соближенными бензольным кольцом и азотистым основанием при 0° соответствуют значения $-0,6 \div -0,7$ ккал/моль, которые сопоставимы со значениями ΔG стэкинга оснований в динуклеотидах: $-0,4 \div -0,7$ ккал/моль [12, 13]. Так как величины дипольных моментов у цитозина и гуанина больше, а у аденина лишь несколько меньше величины дипольного момента урацила [14], весьма вероятно, что у всех $2',3'$ -О-бензилиденовых производных олигонуклеотидов имеет место конкуренция за взаимодействие с основанием $3'$ -концевого нуклеотидного звена предыдущего по цепи основания и фенильного остатка. Это обстоятельство может быть одной из главных причин полного разрушения стэкинга оснований в производном диаденилата и частичного у производных три- — пентааденилатов [6, 15], а также у производных пента- — октацитидилатов [8]. Введение бензилиденового заместителя в олигонуклеотид приводит,

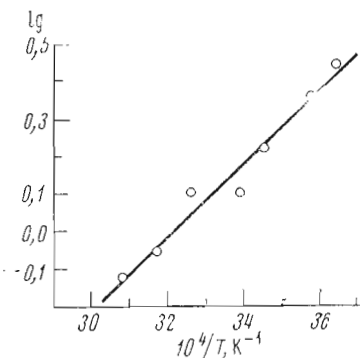


Рис. 4. График для определения изменения энтальпии и энтропии процесса внутримолекулярного взаимодействия

следовательно, к уменьшению его эффективной длины. Возможно, однако, что существует критический размер олигонуклеотида, при котором основание 3'-концевого модифицированного нуклеотидного звена все-таки находится в стэкинге: с увеличением длины олигонуклеотида ΔG стэкинга оснований имеет тенденцию к увеличению до 1,1 ккал/моль [12, 16]. Данные работы [8] поддерживают это предположение: для 2',3'-О-бензильденных производных олигоцитидилатов олигомером критической длины является октамер.

Экспериментальная часть

Препарат рURCl (содержание основного вещества более 94%) синтезирован описанным способом [17]. Концентрацию рURCl в растворе измеряли спектрофотометрически, используя определенный по методике работы [18] молярный коэффициент экстинкции $27,9 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (260 нм, рН 7,0).

Спектры КД снимали на дихрографе CD-185 (Roussel Jouan, Франция) в термостатируемой кювете с длиной оптического пути 1 см при концентрации рURCl $3,4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ в 0,05 М Трис-НСl-буфере, рН 8,5. При каждой температуре спектр прописывали 2—3 раза при максимальных чувствительности и константе времени при минимальной скорости развертки. Растворы рURCl перед заполнением кюветы насыщали гелием. Измерение температуры осуществляли с помощью калиброванной термопары хромель—копель, помещенной непосредственно в кювету. Абсолютная точность измерений температуры $\pm 0,25^\circ$.

Автор благодарит Н. И. Гринева и Г. Г. Шамова (ИОХ СО АН СССР) за ценные советы и участие в обсуждении.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гринева Н. И., Карпова Г. Г. (1974) Молекулярн. биология, 8, 832—838.
2. Гринева Н. И., Карпова Г. Г., Мызина С. Д., Фодор И., Баев А. А. (1975) Докл. АН СССР, 223, 1477—1481.
3. Гринева Н. И., Карпова Г. Г. (1975) Биоорган. химия, 1, 588—597.
4. Belikova A. M., Kabasheva G. N., Grineva N. I. (1973) Tetrahedron, 28, 2277—2283.
5. Беликова А. М., Гринева Н. И., Кабашева Г. Н. (1972) Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим., вып. 4, 94—100.
6. Grineva N. I., Kozorovizky A. Ya., Lomakina T. S. (1972) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 46, 1603—1606.
7. Беликова А. М., Гринева Н. И., Зарытова В. Ф., Кабашева Г. Н., Кнорре Д. Г. (1970) Докл. АН СССР, 195, 1337—1340.
8. Райт В. К., Карпова Г. Г., Гринева Н. И. (1977) Биоорган. химия, 3, 31—38.
9. Rabczenko A., Jankowski K., Zakrewska K. (1974) Biochim. et biophys. acta, 353, 1—15.
10. Richards E. G. (1968) Eur. J. Biochem., 6, 88—92.
11. Зенин С. В., Сергеев Г. Б. (1974) Ж. физ. химии, 48, 838—841.
12. Brahm J., Maurizot J. C., Michelson A. M. (1967) J. Mol. Biol., 25, 465—480.
13. Brahm J., Maurizot J. C., Michelson A. M. (1967) J. Mol. Biol., 25, 481—495.
14. Bergman E. D., Weiler-Feilchenfeld H. (1973) In Physico-chemical properties of nucleic acids (Duchesne J., ed.), vol. 1, pp. 1—30.
15. Барам Г. И., Будкер В. Г., Гринева Н. И., Кнорре Д. Г., Козоровицкий А. Я., Шамаковский Г. Г. (1971) Докл. АН СССР, 201, 95—98.
16. Brahm J., Michelson A. M., Van Holde K. E. (1966) J. Mol. Biol., 15, 467—488.
17. Веняминова А. Г., Гринева Н. И. (1971) Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим., вып. 4, 111—118.
18. Гринева Н. И., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г. (1970) Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим., вып. 2, 111—118.

Поступила в редакцию
9.IX.1976

ESTIMATION OF THERMODYNAMIC PARAMETERS
FOR CONFORMATIONAL TRANSITION
IN 2', 3'-O-[4-(N-2-CHLOROETHYL-N-METHYLAMINO)-BENZYLIDENE]
URIDINE 5'-PHOSPHATE

RYTE V. G.

Novosibirsk State University

The thermodynamic parameters of intramolecular uracil-phenyl interaction in 2', 3'-O-[4-(N-2-chloroethyl-N-methylamino)benzylidene]uridine 5'-phosphate (pURCl) have been estimated from the temperature dependence of 270 nm band intensity in the CD spectra. Enthalpy and entropy of the process of intramolecular complexation of the aromatic systems in pURCl have been determined ($\Delta H = -4.7 \pm 0.9$ kcal·mole⁻¹ and $\Delta S = -14.5 \pm 1.2$ e. u.). ΔG for this process ($-0.6 \div -0.7$ kcal·mole⁻¹) is comparable with ΔG for base stacking in short oligonucleotides. The influence of intramolecular interaction in the modified 3'-terminus on the conformation of 2', 3'-O-benzylidene oligonucleotide derivatives is discussed.
