



УДК 547.963.32.04+547.416

**АЛКИЛИРОВАНИЕ ДНК В КОМПЛЕМЕНТАРНЫХ КОМПЛЕКСАХ
С 4-(N-2-ХЛОРЕТИЛ-N-МЕТИЛАМИНО)-
БЕНЗИЛ-5'-ФОСФАМИДАМИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ***Гимаутдинова О. И., Карпова Г. Г., Ломакина Т. С.,
Шелпакова Е. Л., Чемасова А. Н.**Институт органической химии Сибирского отделения
Академии наук СССР, Новосибирск**Гринева Н. И.**Центральный научно-исследовательский институт гематологии
и переливания крови, Москва*

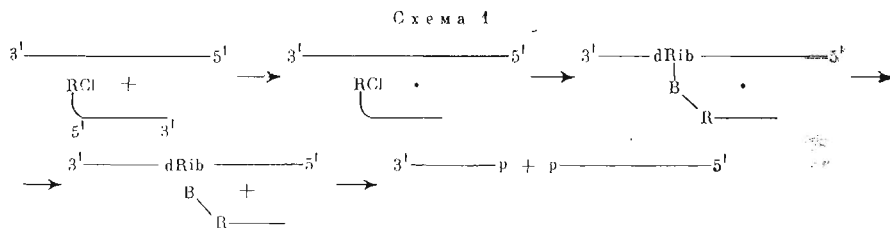
При действии $\text{ClRCH}_2\text{NH}(\text{pA})_6$ денатурированная ДНК алкилируется в комплементарных комплексах с эффективностью, на 3–4 порядка превышающей эффективность алкилирования в растворе. С увеличением избытка реагента степень алкилирования возрастает до насыщающей. Алкилирование конкурентно подавляется гексааденилатом. Константа скорости алкилирования ДНК в комплексе — псевдомолекулярной реакции — совпадает по величине с константой скорости ионизации C–Cl-связи в $\text{ClRCH}_2\text{NH}(\text{pA})_6$, что указывает на двухстадийное алкилирование с первой лимитирующей стадией ионизации реагента с образованием активной промежуточной частицы. В условиях насыщения при 20°С в ДНК *E. coli* реагент $\text{ClRCH}_2\text{NH}(\text{pA})_7$ алкилирует 60 из 230 участков связывания на 100 кб ДНК. Под действием $\text{ClRCH}_2\text{NH}(\text{pA})_6$ в ДНК селезенки быка алкилируется 81 из 250 участков связывания. Алкилирование в комплексе подвергаются аденин, цитозин и гуанин с образованием 3-NH₂CH₂R-Cyt, 3-, 7- и, вероятно, 1-NH₂CH₂R-Ade, а также 7-NH₂CH₂R-Gua. В условиях алкилирования 7-NH₂CH₂R-Ade частично претерпевает гидролитическое расщепление имидазольного цикла.

Комплементарно адресованное алкилирование однополовых нуклеиновых кислот производными олигонуклеотидов $(\text{Np})_{n-1}\text{NRCl}$ обнаруживает и метит участки связывания ДНК с этими производными [1–3] и позволяет оценивать константы такого связывания [4]. Посредством алкилирования в комплексах можно получать ДНК, не имеющие пуриновых оснований вблизи участков связывания, и фрагменты ДНК с известными 5'-концевыми последовательностями, комплементарными используемому реагенту [5].

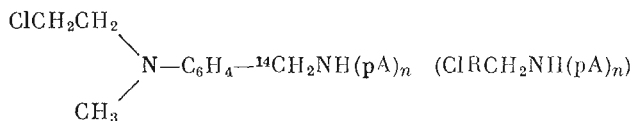
Для транскрипции и копирования отдельных частей ДНК удобнее исходить из фрагментов с известной 3'-концевой последовательностью. Для этой цели необходимы производные олигонуклеотидов с алкилирующей

Принятые сокращения: $\text{ClRCH}_2\text{NH}(\text{pA})_{6,7}$ — 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензил-5'-фосфамиды гекса- и гептааденилатов; $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{R-Cyt}$, $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{R-Ade}$ и $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{R-Gua}$ — 2-(N-[4-(аминометил)фенил]-N-метиламино)этилцитозин, -аденин и -гуанин. $(\text{Np})_{n-1}\text{NRCl}$ — 2',3'-O-[4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензилдиде]олигонуклеотиды, $\text{ClRCH}_2\text{NH}_2$ — 4-(N-2-хлорэтил-N-метил)аминобензиламин, 1 кб — количество ДНК длиной в 10 000 оснований.

группой на 5'-конце, которые в силу антипараллельности комплементарных цепей должны модифицировать основания вблизи 3'-конца участка связывания и после элиминирования алкилированного пурина способствовать расщеплению ДНК с образованием фрагментов с заданной 3'-концевой последовательностью. Иными словами, такие реагенты должны осуществлять 3'-комплементарно адресованную модификацию и фрагментацию (схема 1).



Данная работа посвящена решению первой части этой задачи — изучению алкилирования ДНК производными 5'-фосфамидов олигонуклеотидов на примере $CIRCH_2NH(pA)_n$, где $n=6, 7$:



Способность смеси фосфамидов $CIRCH_2NH(pN)_n$ с $n=4$ или 6 к образованию комплексов с РНК и ДНК и алкилированию в комплексах показана ранее [6, 7].

По данным равновесного диализа, в условиях насыщения при $0^\circ C$ фосфамид $CIRCH_2NH(pA)_7$ связывается с 23 участками денатурированной ДНК *E. coli* (в расчете на 10 кб ДНК) (рис. 1, 1). Степень алкилирования при $20^\circ C$ (рис. 1, 2) при тех же условиях вначале растет пропорционально концентрации реагента, но при ~ 14 -кратном избытке последнего достигает насыщения в 6 участков на 10 кб и далее при увеличении количества реагента не меняется. Это свидетельствует об изменении порядка реакции по реагенту с первого на нулевой и тем самым указывает на подчинение алкилирования закономерностям комплексообразования и на протекание реакции $CIRCH_2NH(pA)_7$ с ДНК в комплексах ДНК·реагент. То, что алкилирование ДНК происходит вблизи *oligo(dT)* последовательностей, следует из характерного ингибирования алкилирования при добавлении в реакцию гексааденилата (рис. 2), подобного конкурентному ингибированию. С ростом избытка $(pA)_6$ по отношению к $CIRCH_2NH(pA)_7$ до 10-кратного степень алкилирования уменьшается почти на порядок.

В отличие от полученных данных в комплексе с $(Ap)_5ARCl$ при 0° и $20^\circ C$ в ДНК *E. coli* связывается и алкилируется в условиях насыщения одно и то же количество, вероятно, одних и тех же ~ 25 *oligo(dT)*-участков [2]. По данным работы [8], различие констант связывания $(Ap)_5ARCl$ и $CIRCH_2NH(pA)_6$ не существенно, и можно предположить, что реагент $CIRCH_2NH(pA)_7$ образует на протяжении 10 кб комплексы при $20^\circ C$ более чем с 6 участками ДНК *E. coli*. Но, очевидно, не все из них продуктивны, и, значит, не все основания вблизи комплексов способны алкилироваться.

Чтобы решить вопрос о реакционноспособных основаниях, мы определили строение оснований, алкилированных в комплексах ДНК селезенки быка, и по этим данным судили о химической направленности алкилирования в комплексах, о строении продуктивных комплексов и о распределении оснований вблизи 3'-концов *oligo(dT)*-участков в исследуемой ДНК. При этом учитывали литературные данные [9—11] о свойствах метиладе-

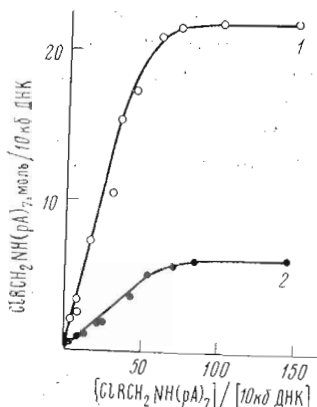


Рис. 1

Рис. 1. Зависимость степени связывания $\text{ClRCH}_2\text{NH}(\text{pA})_7$ с ДНК *E. coli* в 0,2 M NaCl и 0,01 M Mg^{2+} при 0° С (1) и степени алкилирования в комплексах при 20° С (2) от избытка реагента в исходной смеси

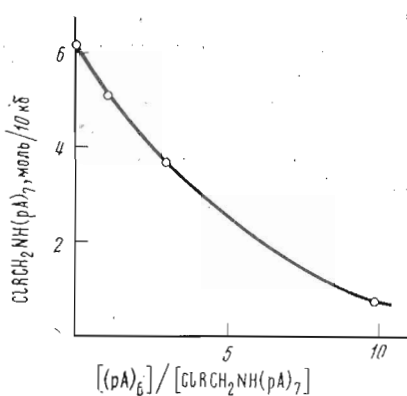
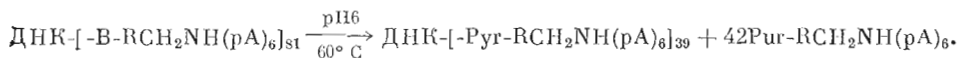


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость степени модификации ДНК *E. coli* в комплексе с $\text{ClRCH}_2\text{NH}(\text{pA})_7$ в присутствии $(\text{pA})_6$ от отношения концентраций олигомеров в исходной смеси

нинов. В условиях насыщения при 20° С на 100 кб ДНК ковалентно присоединяется 81 молекула $[^{14}\text{C}] \text{ClRCH}_2\text{NH}(\text{pA})_6$. В этих же условиях $(\text{Ap})_5\text{ARCl}$ связывает в комплекс и алкилирует в нем 250 $(\text{dT})_n$ -участков [2, 12]. При проведении реакции количественного отщепления алкилированных пуринов [2, 5] 52% модифицированных оснований обработанной меченым реагентом ДНК переходит в олигомерную фракцию (схема 2)

Схема 2



После гидролиза фосфамидной связи (рН 1, 40° С) и разделения хроматографией на бумаге среди четырех продуктов гидролиза идентифицировали 7- $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{R-Gua}$ (15%), 3- $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{R-Ade}$ (39%) и вещество (I) (32%), являющееся продуктом гидролитического расщепления цикла 7- $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{R-Ade}$ — N²-формил-5-{N-β-[N-(4-аминометилфенил)-N-метил-амино]этил}-4,5,6-триаминопиримидином. Свойства этих соединений совпадают со свойствами заведомых образцов по хроматографической подвижности и УФ-спектрам. Их разностные с $\text{ClRCH}_2\text{NH}_2$ спектры при трех значениях рН совпадают с УФ-спектрами соответствующих метильных аналогов оснований (табл. 1–3).

Вещество, неподвижное в системе Г (14%) (вещество II), по хроматографическому поведению (табл. 1) соответствует продукту превращения алкиладенинов (скорее всего 1-алкиладенина) в кислоте [12]. Его разностный с $\text{ClRCH}_2\text{NH}_2$ УФ-спектр напоминает спектр 1-метилтипоксантина (табл. 3).

После отделения продуктов мягкого гидролиза оставшуюся ДНК в соответствии с работой [13] гидролизовали в более жестких условиях расщепления гликозидных связей (1н. HCl, 100° С) для количественного освобождения 3- $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{R-Cyt}$. После такой обработки и хроматографии на бумаге получены 3- $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{R-Cyt}$ (80%) (табл. 1 и 2) и вещество (III) (20%), близкое по разностному спектру 7-алкиладенину и отличающееся от других алкилированных оснований. При нагревании в 1н. HCl при 100° С 3- $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{R-Ade}$ за 1 ч превращается на 20% в вещество, отличающееся по свойствам от соединений (II) и (III) (табл. 1). В этих условиях 3- $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{R-Cyt}$ вполне устойчив.

Таблица 1

Состав и хроматографическая подвижность выделенных из ДНК алкилированных оснований и изомерных им соединений

Вещества	R_f в системах							R_{3-RAdc} в системе МЕГ*	Содержание в алкилированных ДНК, %
	А	Б	В	Г	Д	Е	Ж		
7-NH ₂ CH ₂ R-Gua	0,34	0,25	0,21	0,52					8
3-NH ₂ CH ₂ R-Ade	0,65	0,60	0,46	0,77	0,80	0,60	0,84	1,0	20
Вещество (I)	0,60	0,53	—	0,58	0,73	0,78	0,78	0,75	17
Вещество (II) (1-NH ₂ CH ₂ R-Ade)	0,52	0,45		0			0,78	0	7
3-NH ₂ CH ₂ R-Cyt	0,60	0,61	0,39						38
Вещество (III) (7-NH ₂ CH ₂ R-Ade)	0,42	0,40	0,55	0,24				0,26	10
3-NH ₂ CH ₂ R-Ade **	0,30	0,47	0,28	0,24				0,31	
7-NH ₂ CH ₂ R-Gua [13]	0,36	0,27	0,23						38—58 *** [13]
1-NH ₂ CH ₂ R-Ade ** [13]	0,50	0,40	0,40	0	0,58	0,60	0,75	0	52—36 ***
3-NH ₂ CH ₂ R-Cyt [13]	0,50	0,60	0,40						10—6 ***
3-Me-Ade				0,39				1,0	
1-Me-Ade				0,24				0,62	
7-Me-Ade				0,30				0,77	
N ⁵ -Формил-N ⁵ -метил- 4,5,6-триаминопиримидин из 7-Me-Ade				0,30				0,77	
N ⁶ -Me-Ade				0,66				1,7	

* Подвижность относительно соответствующего 3-алкиладенина в системе Г.

** Продукт превращения в кислоте.

*** Содержание в денатурированной ДНК, алкилированной C1RCH₂NH₂ по данным [13].

Таким образом, при алкилировании в комплексе образуются 7-NH₂CH₂R-Gua и 3-NH₂CH₂R-Cyt; алкилирование аденина протекает по положению 3,7 и, вероятно, 1 (36,50 и 14% соответственно). При этом 60% 7-NH₂CH₂R-Ade претерпевает раскрытие имидазольного цикла. Следовательно, алкилированию в ДНК в комплексах с C1RCH₂NH₂(pA)_n подвергаются аденин (47—54%) и цитозин (38%) (схема 2). Доля алкилированного гуанина составляет всего 8% (табл. 1). Производные тимина среди алкилированных оснований не обнаружены. Это обстоятельство в совокупности с наличием в реакции ~170 непродуктивных комплексов свидетельствует об инертности тимина ДНК к алкилированию в комплексе.

Полученные данные позволяют заключить, что на 100 кб ДНК селезенки быка встречается ~250 oligo(dT)-участков [12], у которых вблизи 3'-концов встречаются в среднем ~170 неалкилирующихся тимининов и 81 алкилируемое основание: 43 аденина, 32 цитозина и 6 гуанинов, что отличается от нуклеотидного состава этой ДНК (22,1 G, 27,9 A, 22,1 C и 27,9 T [13]) и от распределения оснований вблизи 5'-концов этих участков oligo(dT), где обнаружено 170 аденинов и 80 гуанинов [12]. Тимин и цитозин на 5'-концах практически отсутствуют [5, 12]. По данным работы [13], состав оснований, алкилированных в ДНК с помощью C1RCH₂NH₂ вне комплекса (до модификации 10—35% оснований), колеблется в пределах 38—58% 7-алкилгуанинов, 36—52% алкиладенинов и 6—10% алкилцитозининов (табл. 1). Из этих данных видно, что химическая направленность алкилирования в комплексах резко отличается от направ-

Таблица 2

УФ-спектры алкилированных оснований

Вещество	рН 1				рН 7				рН 11							
	$\lambda_{\text{макс}}$	$\lambda_{\text{мин}}$	$\varepsilon_{260} \cdot 10^{-3}$	$\frac{D_{250}}{D_{260}}$	$\frac{D_{270}}{D_{260}}$	$\frac{D_{280}}{D_{260}}$	$\varepsilon_{260} \cdot 10^{-3}$	$\frac{D_{250}}{D_{260}}$	$\frac{D_{270}}{D_{260}}$	$\frac{D_{280}}{D_{260}}$	$\lambda_{\text{макс}}$	$\lambda_{\text{мин}}$	$\varepsilon_{260} \cdot 10^{-3}$	$\frac{D_{250}}{D_{260}}$	$\frac{D_{270}}{D_{260}}$	$\frac{D_{280}}{D_{260}}$
7-NH ₂ CH ₂ R-Gua	260	233	15,8	0,93	0,88	0,46	235	0,92	0,87	0,49	252	232	18,0	1,03	0,84	0,39
3-NH ₂ CH ₂ R-Cyt	268	239	11,3	0,67	1,07	0,44	235	0,71	0,89	0,37	254	239	16,8	1,05	0,76	0,73
Вещество (II) (7-NH ₂ CH ₂ R-Ade)	270	241	9,4	0,80	1,11	0,64	232	0,72	0,90	0,24	250	230	15,6	1,00	0,90	0,41
3-NH ₂ CH ₂ R-Ade	275	236	8,7	0,62	1,39	1,00	227	0,75	0,76	0,28	255	236	15,6	0,92	0,88	0,55
Вещество (I)	266	241	15,4	0,79	0,96	0,44	236	0,73	0,89	0,20	255	232	19,0	0,99	0,80	0,41
Вещество (II) (1-NH ₂ CH ₂ R-Ade) *	259	231	12,6	1,34	0,72	0,19	232	0,84	0,73	0,18	255	225-235	22,6	1,06	0,72	0,35
7-NH ₂ CH ₂ R-Gua [13]	259	233	14,0	1,06	0,78	0,38	234	0,97	0,80	0,45	253	234		1,10	0,78	0,42
3-NH ₂ CH ₂ R-Cyt [13]	268-270	239	10,7	0,67	1,07	0,47	236	0,71	0,88	0,38	255-298	240		1,05	0,75	0,70
3-NH ₂ CH ₂ R-Ade [13]	262	235	18,8				238				258	279-280				
4-NH ₂ CH ₂ R-Ade [13]	263	235					235				плечо: 280	235				
	плечо: 290						плечо: 290				256					

* Продукт превращения NH₂CH₂R-Ade в кислоте.

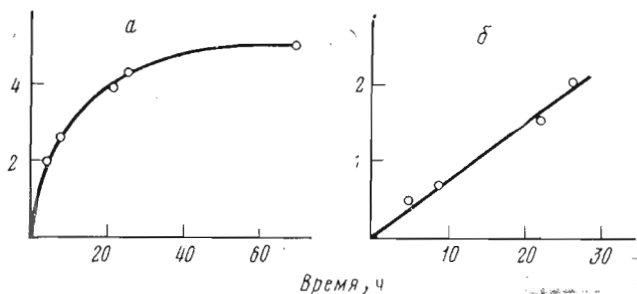


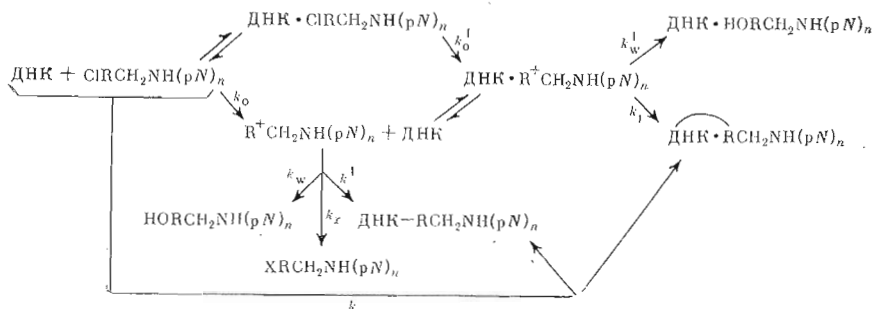
Рис. 3. Кинетическая кривая алкилирования денатурированной ДНК *E. coli* с помощью $\text{C1RCH}_2\text{NH}(\text{pA})_6$ при 22°C (а) (на оси ординат $\text{C1RCH}_2\text{NH}(\text{pA})_6$, моль/10 кб) и ее полулогарифмическая анаморфоза (б) (на оси ординат

$$\ln \frac{[\text{RCH}_2\text{NH}(\text{pA})_6 - \text{ДНК}]_\infty}{[\text{RCH}_2\text{NH}(\text{pA})_6 - \text{ДНК}]_\infty - [\text{RCH}_2\text{NH}(\text{pA})_6 - \text{ДНК}]_t}$$

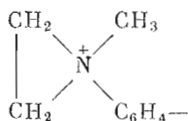
ленности алкилирования в растворе, зависящего от реакционной способности оснований ($G \approx A > C$). В комплексе реагируют все способные к этой реакции основания, если они расположены в соответствующем положении вблизи 3'-конца участка связывания. Образование при алкилировании в комплексах изомерных алкиладенинов свидетельствует об отсутствии жесткой конформации хлорэтилметиламинобензильной группировки или об образовании комплексов с разной конформацией этой группы относительно участков связывания.

Константа скорости алкилирования ДНК (k), вычисленная из наклона прямой на полулогарифмической анаморфозе кинетической кривой (рис. 3), составила $(2,6 \pm 0,5) \cdot 10^{-5} \text{ с}^{-1}$. По величине k совпадает с k_0 ионизации ($2,1 \cdot 10^{-5} \text{ с}^{-1}$) $\text{C1RCH}_2\text{NH}(\text{pN})_6$ при 22°C , вычисленной из уравнения Аррениуса [14], и, вероятно, с константой скорости ионизации реагента в комплексе k_0' . В соответствии с [15] это совпадение позволяет заключить, что алкилирование в подавляющем большинстве комплекса, как и в растворе, протекает по двухстадийному механизму с лимитирующей стадией образования промежуточной частицы по схеме 3.

Схема 3



где k_0 , k_0' , k , k_1 , k' , k_w , k_w' , k_x — константы скоростей реакций, X — нуклеофильные группы буферов, R^+ — этилиминиевый катион



Отметим, что константа скорости алкилирования ДНК реагентом $\text{ClRCH}_2\text{NH}(\text{pA})_n$ примерно в 3—5 раз выше константы скорости алкилирования с помощью $(\text{Ar})_3\text{ARCl}$ и $(\text{Np})_3\text{NRCl}$.

Включение реагента в ДНК в значительной мере характеризуется эффективностью алкилирования ($p/s, \text{M}^{-1}$) — отношением расхода реагента на алкилирование ДНК и побочные реакции: $p/s = k/(a + \sum k_{x_i} [X_i])$, где $a = k_w [\text{H}_2\text{O}]$ [15]. Отличительной чертой алкилирования в комплексе от алкилирования в растворе является высокая эффективность алкилирования. Как было показано [15], в комплексе с $(\text{Np})_{n-1}\text{NRCl}$ она на 2—7 порядков выше, чем вне комплекса.

Для алкилирования ДНК с помощью $\text{ClRCH}_2\text{NH}(\text{pA})_n$, протекающего с образованием комплексов, наблюдаемая величина p/s была вычислена из данных рис. 1 и 3 по методу [15]; при концентрации участков связывания 0,2 мкМ и 1—20-кратном избытке реагента она составила $(1,6—0,8) \cdot 10^5 \text{M}^{-1}$. Эта величина на порядок ниже величины p/s для алкилирования с помощью $(\text{Ar})_3\text{ARCl}$ в сравнимых условиях ($2,7 \cdot 10^6 \text{M}^{-1}$) [15], вероятно, вследствие небольшой доли продуктивных комплексов (27%, рис. 1). Но по значению p/s для $\text{ClRCH}_2\text{NH}(\text{pA})_n$ все же на 3 порядка выше, чем для модификации уридилатом $\text{ClRCH}_2\text{NHpU}$ [16], и на 4 порядка выше, чем для алкилирования олигонуклеотидными производными [15], протекающего в отсутствие ионов Mg при 50° С вне комплексов. Это свидетельствует о том, что основное количество алкилированной в буфере 1 ДНК образуется при реакции в комплексах. Доля ДНК, алкилированной в растворе, вычисленная аналогично работе [15], составляет 0,1—0,3% от суммарной степени модификации, а реагент вне комплекса расходуется в основном на алкилирование нуклеофильных компонентов буферных систем и гидролизуется.

Экспериментальная часть

Алкилирующий фосфамид гексаденилата [^{14}C] $\text{ClRCH}_2\text{NH}(\text{pA})_n$ (5 Ки/моль) синтезировали по методу [7]. Реагент с исходной длиной адреса выделяли с помощью микроколоночной ионообменной хроматографии смеси производных олигоаденилатов на DEAE-целлюлозе [17]. Радиоактивность растворов просчитывали в диоксановом сцинтиляторе, радиоактивность на бумаге — в толуольном, используя счетчик Mark-2 (Nuclear Chicago, США).

ДНК селезенки быка (производства Олайнского завода химреактивов, ЛатвССР) очищали гель-фильтрацией на сефадексе G-100. ДНК *E. coli* выделяли из биомассы *E. coli* MRE-600 экстракцией фенолом [18]. ДНК анализировали ультрацентрифугированием в щелочном градиенте плотности сахарозы от 5 до 25% (Spinco L-2-65 В, ротор SW-25, 25 000 об/мин, 20° С, 7 ч для ДНК *E. coli* и ротор SW-27, 25 000 об/мин, 17 ч, 20° С для ДНК селезенки быка). ДНК *E. coli* $S_{w,20}^0$ 60; ДНК селезенки $S_{w,20}^0$ 8—10; маркер — ДНК фага T7 [19]. Содержание белка в ДНК менее 1% (по Лоури [20]). Концентрацию ДНК выражали в молях полимера длиной в 10 кб, определяя ее по УФ-поглощению после денатурации нагреванием в 0,01 М трис-HCl, pH 7,4. Экстинкцию усредненного нуклеотида ДНК *E. coli* принимали за $7,25 \cdot 10^3$, а ДНК селезенки — $7,20 \cdot 10^3$ как описано в работе [5].

Для хроматографии на бумаге применяли следующие системы растворителей: изопропанол — аммиак — вода, 7:1:2, А; этанол — аммиак — вода, 80:2:18, Б; *грей*-бутанол — метилэтилкетон — муравьиная кислота — вода, 40:30:15:15, В; *н*-бутанол — этанол — вода, 80:10:25, Г; этанол — 1 М ацетат аммония (pH 7,5), 7:3, Д; изопропанол — H₂O, 6:4, Е; изопропанол — конц. HCl — вода, 170:41:39, Ж.

Изотерму связывания $\text{ClRCH}_2\text{NH}(\text{pA})_n$ с ДНК получали с помощью равновесного диализа, который проводили по методике [4].

Зависимость степени алкилирования ДНК $ClRCH_2NH(pA)_n$ ($n=6$ или 7) от концентрации реагента определяли, выдерживая растворы 2 ОЕ₂₆₀ денатурированной ДНК (27,6 нМ) с различной концентрацией $ClRCH_2NH(pA)_n$ (от 0,3 до 50 мкМ) в 0,2 М NaCl, 0,01 М MgCl₂ в 0,01 М трис-HCl, pH 7,4 (буфер 1) при 20°С в течение 4 сут до полного превращения реагента в активную частицу [14]. Алкилированную ДНК отделяли от избытка реагента осаждением спиртом в присутствии 0,001 М EDTA и 2%-ного ацетата натрия и пересаждали из 0,01 М трис-HCl, pH 7,3, до отсутствия радиоактивности в супернатанте. Степень модификации определяли либо по УФ-поглощению и радиоактивности раствора алкилированной ДНК в буфере 1, либо по отношению радиоактивности в полимерной фракции и объединенных супернатантах и выражали в моль/10 кб ДНК. Эффективность алкилирования (p/s ; М⁻¹) вычисляли по [15].

Алкилирование ДНК $ClRCH_2NH(pA)_6$ в присутствии (Ap)₆ проводили, смешивая растворы денатурированной ДНК *E. coli* и реагента в буфере 1 до конечной концентрации ДНК 13,8 нМ и 1,33 мкМ $ClRCH_2NH(pA)_6$ в присутствии возрастающего избытка (Ap)₆. Растворы выдерживали при 20°С 4 сут. Алкилированную ДНК отделяли от избытка реагента осаждением спиртом и определяли степень модификации.

Алкилирование ДНК селезенки $ClRCH_2N(pA)_6$. К 80 ОЕ₂₆₀ денатурированной ДНК в 40 мл 0,01 М трис-HCl, pH 7,4, добавляли NaCl до 0,2 М, MgCl₂ до 0,01 М, 2 мл 0,075 мМ раствора $ClRCH_2N(pA)_6$ в 0,01 М трис-HCl, pH 7,4, и затем 0,01 М трис-HCl, pH 7,4, до конечного объема 80 мл. Раствор выдерживали при 20°С в течение 4 сут. Алкилированную ДНК отделяли от избытка реагента осаждением спиртом и определяли степень модификации.

Выделение алкилированных пуринов. Раствор 78 ОЕ₂₆₀ алкилированной ДНК в 10 мл 0,04 М ацетата натрия, pH 6,0, выдерживали 20 ч при 60°С. Элиминированные основания отделяли осаждением ДНК спиртом. О степени элиминирования судили по соотношению радиоактивности в ДНК и супернатанте. Выход ДНК 90–95%. Супернатант, содержащий элиминированные алкилированные основания, обессоливали с помощью ионообменной хроматографии на DEAE-сефадексе А-25 (Pharmacia Fine Chemicals, Швеция) в HCO₃⁻-форме при 4°С (колонка 31×1,5 см). Для этого супернатант разбавляли до 700 мл водой и наносили на колонку. Элюцию вели сначала 600 мл 0,05 М TEAB для удаления солей, затем 200 мл 0,6 М TEAB, pH 7,5. Скорость элюции 40 мл/ч. Фракцию, элюируемую 0,6 М TEAB, упаривали несколько раз с метанолом до удаления TEAB, сухой остаток растворяли в 0,5 мл 0,1 н. HCl и выдерживали 1 ч при 40°С для гидролиза фосфамидной связи в алкилированных основаниях.

Идентификация алкилированных оснований. Алкилированные основания разделяли хроматографией на бумаге FN-1 в системе А в присутствии свидетелей 7-NH₂CH₂R-Gua и NH₂CH₂R-Ade, полученных, как указано в работе [9]. Содержание алкилированных оснований, элиминированных из ДНК, определяли, измеряя радиоактивность хроматограмм. После 3–4-кратной отмывки эфиром зоны вещества от толуольного сцинтиллятора 7-NH₂CH₂R-Gua (R_f 0,4) и NH₂CH₂R-Ade (R_f 0,48–0,80) элюировали 0,1 н. HCl в течение 12–15 ч; элюаты упаривали досуха, затем 2–3 раза упаривали с водой для удаления HCl и растворяли в 0,1 мл 0,1 н. HCl. По 30 мкл раствора, содержащего 7-NH₂CH₂R-Gua, наносили на бумагу FN-1 и хроматографировали в системах А, Б и В в присутствии 7-NH₂CH₂R-Gua. В хроматограммах просчитывали радиоактивность, промывали эфиром и 7-NH₂CH₂R-Gua элюировали 3 мл 0,1 н. HCl. Элюат упаривали до отсутствия HCl и растворяли в 0,1 мл 0,1 н. HCl. Раствор, содержащий NH₂CH₂R-Ade, наносили на бумагу FN-1 и хроматографировали в системе Г в присутствии свидетелей. Вещества элюировали и снова хроматографировали в системах, указанных в табл. 1. Полученные

3-NH₂CH₂R-Ade, вещества (I) и (II) элюировали с хроматограмм 3 мл 0,1 н. HCl. Элюаты упаривали до отсутствия HCl и растворяли в 0,1 мл 0,1 н. HCl. УФ-спектры полученных растворов веществ снимали при pH 1, 7, 13 с помощью микроспектрофотометра МСФП-1 (объем раствора при святии спектра 30–40 мкл с концентрацией 0,3–0,8 ОЕ/мл) против контроля — элюата с бумаги FN-1, прошедшего через те же стадии обработки, что и алкилированные продукты. Разностные спектры алкилированных оснований снимали против раствора ClRCH₂NH₂, взятого в концентрации, эквивалентной концентрации алкилированного основания, определенной по радиоактивности.

Для идентификации 3-NH₂CH₂R-Cyt 70 ОЕ₂₆₀ ДНК после элиминирования алкилированных оснований выдерживали 1 ч в 0,2 мл 1 н. HCl при 100° С. Появляющийся осадок отделяли центрифугированием на центрифуге К-23 (ГДР) (при 6000 об/мин, 20° С, 10 мин) и промывали трижды 0,2 мл 0,1 н. HCl. Супернатанты объединяли, упаривали до отсутствия HCl, растворяли в 0,1 мл 0,1 н. HCl и хроматографировали в системах А, Б и В в присутствии свидетеля 3-NH₂CH₂R-Cyt, полученного ранее [9]. В хроматограммах просчитывали радиоактивность и каждое вещество с хроматограмм элюировали 0,1 н. HCl, как описано выше. Элюаты упаривали до отсутствия HCl и растворяли в 0,1 мл 0,1 н. HCl. УФ-спектры 3-NH₂CH₂R-Cyt и разностные УФ-спектры против раствора ClRCH₂NH₂ снимали, как описано выше.

Кинетика алкилирования ДНК E. coli с помощью ClRCH₂NH(pA)₆. Пробы объемом 1 мл, содержащие 1,865 ОЕ₂₆₅ денатурированной ДНК (0,261 нМ ДНК/10 кб) и 2,64 мкМ [¹⁴C]ClRCH₂NH(pA)₆ в буфере 1, выдерживали при 22° С, останавливая реакцию осаждением ДНК спиртом через разные интервалы времени, и определяли степень модификации как указано выше. Константу скорости алкилирования вычисляли графически аналогично [15]. Константу скорости ионизации С–Cl-связи в ClRCH₂NH(pA)₆ при 22° С вычисляли по уравнению Аррениуса [15].

ЛИТЕРАТУРА

1. Гринева Н. И., Карпова Г. Г. (1974) Молекулярн. биология, 8, 832–840.
2. Гринева Н. И., Карпова Г. Г., Мызина С. Д., Чемасова А. Н. (1975) Биоорг. химия, 1, 1707–1715.
3. Grineva N. I., Karpova G. G., Kusnetzova L. M., Venkstern T. V., Bayev A. A. (1977) Nucleic Acids Res., 4, 1609–1631.
4. Гринева Н. И., Карпова Г. Г., Пичко Н. П. (1978) Молекулярн. биология, 12, 135–147.
5. Бенимецкая Л. З., Герасимова Л. М., Гринева Н. И., Карпова Г. Г. (1978) Молекулярн. биология, 12, 988–1001.
6. Василенко С. К., Гринева Н. И., Карпова Г. Г., Козоровицкий А. Я., Ломакина Т. С., Саарма М. Ю., Тиунов М. П. (1973) Докл. АН СССР, 212, 1227–1230.
7. Гимаутдинова О. И., Гринева Н. И., Карпова Г. Г., Ломакина Т. С., Шелпакова Е. Л. (1978) Биоорг. химия, 4, 917–927.
8. Карпова Г. Г., Шелпакова Е. Л., Гринева Н. И. (1979) Молекулярн. биология, 13, 955–959.
9. Singer B. (1975) in: Progress in Nucleic Acids Research and Molecular Biology, vol. 15, pp. 219–332.
10. Lawley P. D. (1966) in: Progress in Nucleic Acids Research and Molecular Biology, vol. 5, pp. 89–130.
11. Lawley P. D., Shah S. A. (1972) Biochem. J., 128, 117–132.
12. Бенимецкая Л. З., Карпова Г. Г., Гринева Н. И. (1978) Биоорг. химия, 4, 1372–1381.
13. Гринева Н. И., Ломакина Т. С., Мызина С. Д., Наговидина Г. К. (1973) Изв. СО АН СССР. Сер. хим., вып. 6, 125–135.
14. Гринева Н. И., Ломакина Т. С., Тигеева Н. Т., Чимитова Т. А. (1977) Биоорг. химия, 3, 210–213.
15. Бенимецкая Л. З., Гринева Н. И., Карпова Г. Г., Пичко Н. П., Чимитова Т. А. (1977) Биоорг. химия, 3, 903–913.
16. Богачев В. С., Гринева Н. И., Ломакина Т. С. (1973) Изв. СО АН СССР. Сер. хим., вып. 4, 97–104.
17. Singer B., Fraenkel-Conrat H. (1974) Biochemistry, 13, 1913–1920.

18. Thomas C. A., Berns K. I., Kelly T. J. (1967) in: *Procedures in Nucleic Acids Research*, Cantoni G. J., Davies D. R., eds, p. 535.
19. Эйндер Дж. (1970) в кн.: *Методы исследования нуклеиновых кислот*, с. 223, «Мир», М.
20. Loury O. D., Rosenbrough N. I., Farr A. L., Raundall R. I. (1965) *J. Biol. Chem.*, 193, 265-273.

Поступила в редакцию
29.V.1979

DNA ALKYLATION WITHIN THE COMPLEMENTARY COMPLEXES WITH OLIGONUCLEOTIDE 4-(N-2-CHLOROETHYL-N-METHYLAMINO)- BENZYL 5'-PHOSPHAMIDES

GIMAUTDINOVA O. I., KARPOVA G. G., LOMAKINA T. S.,
SHELPAKOVA E. L., CHEMASOVA A. N., GRINEVA N. I.

*Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch of the Academy
of Sciences of the USSR, Novosibirsk; Central Institute of Hematology
and Blood Transfusion, Moscow*

Under the action of $\text{ClRCH}_2\text{NH}(\text{pA})_6$ the denatured DNA is alkylated within the complementary complexes with the efficiency 3-4 order of magnitude higher than that for the alkylation in solution. The increase in the reagent excess leads to a parallel rise of alkylation extent up to saturation. The alkylation is competitively suppressed by hexaadenylate. The rate constant of the DNA alkylation within the complexes, a pseudomonomolecular reaction, is equal to the rate constant of the reagent C-Cl bond ionization. This fact is indicative of a two-stage alkylation, wherein the first limiting step is the reagent ionization and formation of an active intermediate. Under saturation conditions, $\text{ClRCH}_2\text{NH}(\text{pA})_7$ alkylates 60 out of 230 binding sites per 100 kilobases of the *E. coli* DNA. In bovine spleen DNA the treatment with $\text{ClRCH}_2\text{NH}(\text{pA})_6$ leads to the alkylation of 81 per 250 binding sites. Cytosine, adenine and guanine are alkylated within the complexes yielding 3- $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{R}$ -Cyt, 3-, 7- and, probably, 1- $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{R}$ -Ade, as well as 7- $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{R}$ -Gua. Upon alkylation 7- $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{R}$ -Ade experiences a partial hydrolytic cleavage of the imidazole ring.