



УДК 547.963.32+547.8

**ВЛИЯНИЕ НА 5'-КОМПЛЕМЕНТАРНО АДРЕСОВАННУЮ  
МОДИФИКАЦИЮ ПАРАМЕТРОВ КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ  
АЛКИЛИРУЮЩИХ ПРОИЗВОДНЫХ ОЛИГОАДЕНИЛАТОВ С ДНК***Бенимецкая Л.З., Герасимова Л.М.**Новосибирский государственный университет**Карпова Г.Г.**Новосибирский институт органической химии СО Академии наук СССР**Гринева Н.И.**Центральный научно-исследовательский институт гематологии  
и переливания крови, Москва*

Показано, что глубина алкилирования в комплексах и комплексообразование  $(Ar)_5-7ARCl$  с денатурированной ДНК ступенчато зависят от концентрации реагентов: вначале степень алкилирования и комплексообразования пропорциональна концентрации реагентов, затем, достигая насыщения, не зависят от концентрации; при больших избытках реагента снова наблюдается связывание, стремящееся к новому насыщению. Значение предельной степени алкилирования зависит от температуры, избытка реагента и вида ДНК; ей соответствует определенный состав алкилированных оснований и константы комплексообразования  $K$ . Найдено, что  $K$  понижается на порядок с повышением температуры на  $10-20^\circ C$  в интервале  $20-80^\circ C$ . На основании зависимости  $K$ , значений предельной степени алкилирования и состава алкилированных оснований от температуры в указанном интервале сделан вывод о повышении комплементарной точности комплексообразования и алкилирования в комплексах ДНК с  $(Ar)_5-7ARCl$  на единицу (A·T)-спаривания. Обнаружено повышенное сродство  $(Ar)_5ARCl$  к денатурированной ДНК фага T7 по сравнению с отдельными цепями этой ДНК, указывающее на кооперативное связывание реагента с денатурированной ДНК.

При комплементарно адресованной модификации нуклеиновых кислот (НК) с помощью алкилирующих производных олигонуклеотидов последние образуют с ДНК и РНК комплементарные комплексы и алкилируют в них нуклеиновые основания вблизи участков связывания реагентов [1-3]. При этом, вероятно, не все комплексы одинаковы по строению и равновесны по стабильности, так как реагент узнает как полностью, так и частично комплементарные ему последовательности в нуклеиновой кислоте. Поэтому неоднозначны и участки алкилирования в комплексе. Очевидно, что комплементарная точность адресованной модификации будет зависеть от соотношения последовательностей в ДНК, полностью или частично комплементарных реагенту, и условий алкилирования. Константы связывания олигонуклеотидов [4,5] и их производных [5-10] с нуклеиновыми кислотами уменьшаются на 1-2 порядка с уменьшением на

Сокращения:  $(Ar)_{n-1}ARCl - 2',3'-O-[4-(N-2\text{-хлорэтил-N-метиламино)бензилиден}]$ -олигоаденилаты с длиной цепи  $n$ ; кб - участок НК длиной в 1000 пар оснований.

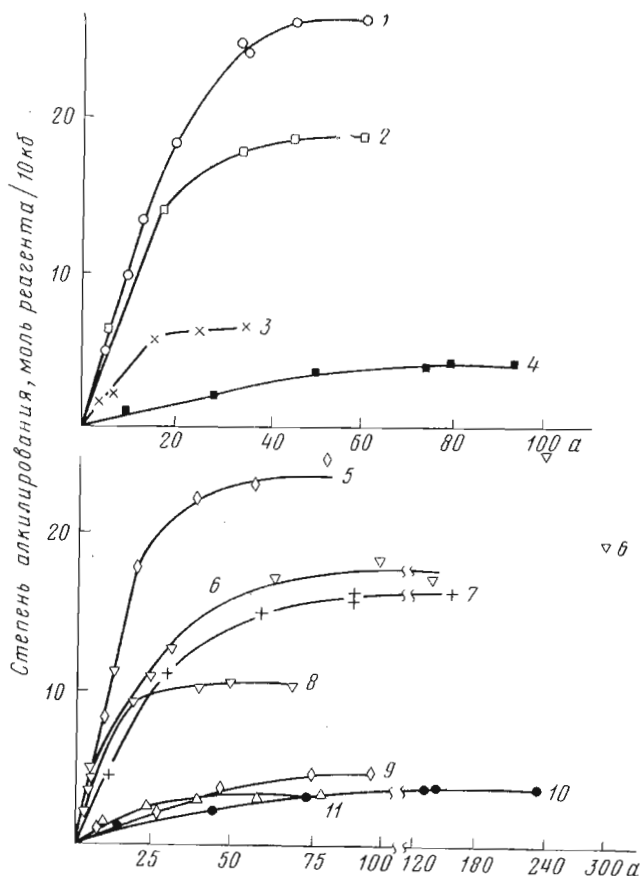


Рис. 1. Зависимости степени алкилирования ДНК от избытка  $(Ar)_5ARCl$  (изотермы модификации) в буфере при 20° (1, 2, 5, 6, 7), 30° (3, 8) и 40° С (4, 9, 10, 11). 1, 3 — ДНК *E. coli*; 2, 4 — ДНК фага T2; 5, 9 — ДНК фага  $\lambda$ ; 6, 8, 10 — ДНК фага T7; 7, 11 — ДНК фага T2.  $a = [(Ar)_5ARCl]/[ДНК]$

единицу длины спаренного участка в комплексе. Поэтому, увеличивая температуру алкилирования или уменьшая концентрацию реагентов и ионную силу раствора, по-видимому, можно существенно уменьшить концентрацию комплексов неполного спаривания оснований реагента и тем самым увеличить комплементарную точность адресованного алкилирования и последующей фрагментации ДНК [3].

В связи с этим целью данной работы являлась количественная оценка влияния температуры и концентрации реагентов на 5'-комплементарно адресованное алкилирование на примере реакции ДНК *E. coli*, ДНК селезенки быка и фагов T7,  $\lambda$ , T2 и T4 с реагентами, содержащими алкилирующую группу на 3'-конце олигонуклеотидов:  $(Ar)_n-1ARCl$  с  $n$ , равным 6 и 8.

Степень модификации ДНК вначале растет пропорционально увеличению концентрации алкилирующего олигомера, затем достигает насыщения и перестает зависеть от его концентрации (рис. 1). При сравнимых избытках реагентов степень алкилирования резко падает с ростом температуры (рис. 2). При этом, чем выше температура, тем ниже эта величина и тем больший избыток реагента требуется для ее достижения. Предельная степень алкилирования резко меняется с температурой и зависит от вида ДНК (рис. 1). Насыщение ДНК реагентом при 20° С наступает при присоединении 25 моль реагента на 10 кб ДНК *E. coli*, фага  $\lambda$ , селезенки и 16—18— на 10 кб ДНК фагов T7, T2 и T4. С увеличением температуры

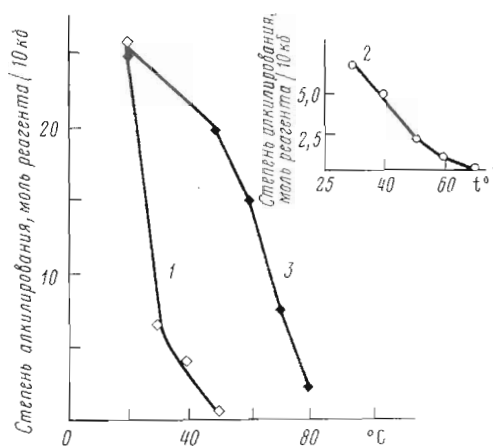


Рис. 2. Зависимость от температуры степени алкилирования ДНК *E. coli* (1, 2) и ДНК селезенки (3) реагентами  $(Ar)_5ARCl$  (1) и  $(Ar)_7ARCl$  (2, 3). Концентрация ДНК  $2 \text{ OЕ}_{260}/\text{мл}$ , 30–60-кратный избыток реагентов на 10 кб ДНК

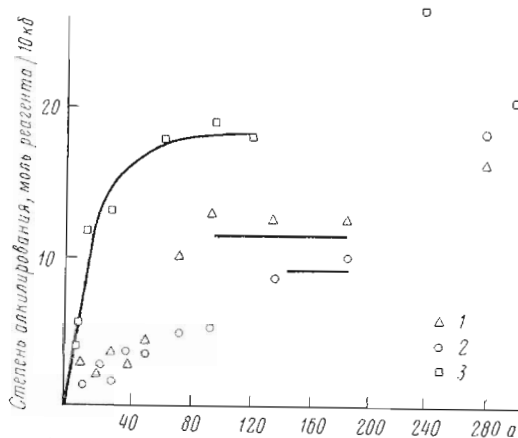


Рис. 3. Изотерма алкилирования ДНК *E. coli* при  $40^\circ \text{C}$  (1, 2) и фага Т7 при  $20^\circ \text{C}$  (3). После денатурации ДНК охлаждали до  $40^\circ \text{C}$  (1) или до  $0^\circ$  и затем нагревали до  $40^\circ \text{C}$  (2) или до  $20^\circ \text{C}$  (3)

замедляется скорость достижения насыщения. При  $20^\circ \text{C}$  требуется 2–3-кратный избыток, при  $30^\circ \text{C}$  — 3–4-, а при  $40^\circ \text{C}$  — 10–20-кратный избыток реагентов для насыщения 15–25, 12 и 3–4 участков на каждые 10 кб ДНК соответственно (рис. 1). При избытках реагента, превышающих на порядок насыщающие, вновь наблюдается повышение степени модификации (рис. 3). Этот факт и высокая эффективность алкилирования свидетельствуют о реакции в комплексах и на этой ступени (табл. 1).

Алкилирование НК с помощью  $(Ar)_n-1ARCl$  ингибируется олигоденилатами как при  $20^\circ \text{C}$  [6], так и при  $40$ – $50^\circ \text{C}$  (рис. 4). Это свидетельствует об узнавании и алкилировании, в том числе и при повышенной температуре, реагентом  $(Ar)_5ARCl$  соответствующего количества  $oligo(T)$ -последовательностей, содержащих алкилируемое основание вблизи 5'-конца.

Согласно величинам констант скоростей элиминирования и их зависимости от температуры, данные о которых опубликованы ранее [11], скорость элиминирования и образования алкилирующей частицы из реагента возрастает с температурой практически синхронно. За время, не-

Эффективности алкилирования ДНК ( $p/s$ ) [24] и константы ассоциации  $(Ap)_5ARCl$  и  $(Ap)_7ARCl$  с ДНК  $K$  [6, 7]

ДНК	$t, ^\circ C$	$a^*$	$b$	$p/s, M^{-1}$		$K, M^{-1} **$	
				$(Ap)_5ARCl$	$(Ap)_7ARCl$	$(Ap)_5ARCl$	$(Ap)_7ARCl$
<i>E. coli</i>	20	4–14	50	$7 \cdot 10^7$		$7 \cdot 10^7$	
	30	4–35	50	$3 \cdot 10^5$	$3 \cdot 10^5$	$3 \cdot 10^5$	$3 \cdot 10^5$
	40	10–30	50	$6 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^5$	$4 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^5$
	50				$6 \cdot 10^4$		$7 \cdot 10^4$
	60				$6 \cdot 10^4$		$2 \cdot 10^4$
	70				$5 \cdot 10^3$		$5 \cdot 10^3$
селезенки	20	50–60	50		$1 \cdot 10^6$		$2 \cdot 10^6$
	50	54	50		$5 \cdot 10^5$		$6 \cdot 10^5$
	60	54	50		$3 \cdot 10^5$		$3 \cdot 10^5$
	70	59	50		$1 \cdot 10^5$		$1 \cdot 10^5$
	80	48	50		$2 \cdot 10^4$		$3 \cdot 10^5$
фага T7	20	2–11	30	$9 \cdot 10^6$		$11 \cdot 10^6$	
	20	180–200	30	$2 \cdot 10^6$		$2 \cdot 10^6$	
	30	2–6	30	$3 \cdot 10^6$		$6 \cdot 10^6$	
	40	10–40	30	$3 \cdot 10^5$		$3 \cdot 10^5$	
	40	9–200	15	$6 \cdot 10^4$		$6 \cdot 10^4$	
$r$ -цепь фага T7	40	10–200	15	$6 \cdot 10^4$		$7 \cdot 10^4$	
фага T2	20	8–20	30	$3 \cdot 10^6$		$3 \cdot 10^6$	
	40	10	30	$3 \cdot 10^5$		$3 \cdot 10^5$	
фага T4	20	6–17	30	$9 \cdot 10^6$		$11 \cdot 10^6$	
	40	10–30	30	$1 \cdot 10^5$		$2 \cdot 10^5$	
фага $\lambda$	20	10–19	30	$8 \cdot 10^6$		$11 \cdot 10^6$	
	40	9–48	30	$2 \cdot 10^5$		$2 \cdot 10^5$	

\*  $a$  — [реагент]/[ДНК].\*\* Ошибка определения  $\pm 50\%$ .

обходимое для алкилирования, степень элиминирования при 5–80° С оказывается небольшой (~5%) и постоянной величиной. Поэтому понижение степени алкилирования с ростом температуры не связано с увеличением доли элиминирования лабильных алкилированных оснований в условиях повышенной температуры [12].

Чтобы установить причину насыщающего влияния концентрации олигомерных реагентов в зависимости от температуры, мы сравнили изотермы комплексообразования и алкилирования. Изотерма комплексообразования  $(Ap)_5ARCl$  с ДНК *E. coli* (рис. 5а), полученная равновесным диализом при 0° С и низкой концентрации ДНК (в интервале независимости константы связывания от концентрации ДНК, см. ниже), так же как и изотерма алкилирования (рис. 3), имеет ступенчатый характер. На начальном и конечном участках связывания константы комплексообразования (рис. 5в), вычисленные в предположении независимости участков связывания, по величине отличаются на порядок, но постоянны в пределах каждого из участков. Из изотермы в координатах Скэтчарда (рис. 5б) также видно два типа связывания: прочного вначале и слабого в конце с константами, различающимися на порядок. Промежуточный участок кривой указывает либо на конкурентный характер связывания, либо на появление новых участков связывания. Первое насыщение в 22 моль реагента на 10 кб ДНК наступает при его 2-кратном избытке; при 20-кратном достигается новое плато, соответствующее 45 моль реагента на 10 кб ДНК. Степень связывания на первой ступени насыщения при 0° С близка степени модификации ДНК *E. coli* при первом насыщении при 20° С (рис. 1 и 5). В процессе связывания при 0° С и алкилирования

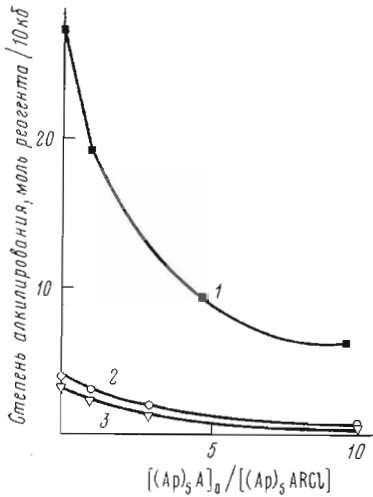


Рис. 4

Рис. 4. Зависимость степени алкилирования ДНК селезенки с помощью  $(Ap)_5ARCl$  в присутствии  $(Ap)_5A$  при  $50^\circ C$  (1), ДНК фагов  $\lambda$  (2) и T7 (3) при  $40^\circ C$

Рис. 5. Изотерма комплексообразования  $(Ap)_5ARCl$  с ДНК *E. coli* при  $0^\circ C$  в координатах Лэнгмюра (а) и Скэтчарда (б) и зависимость  $K$  от избытка реагента (в). [ДНК]  $2 \text{ OE}_{260}/\text{мл}$ .  $a = [(Ap)_5ARCl]/[\text{ДНК}]$

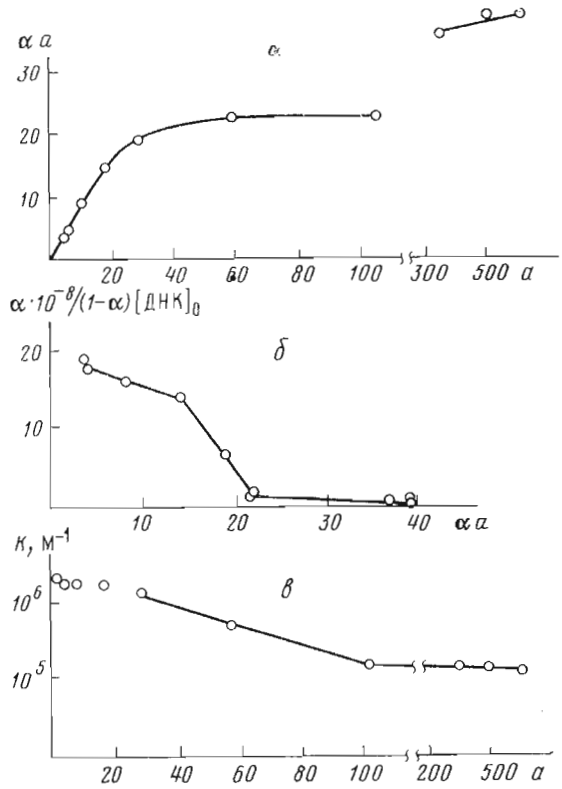


Рис. 5

при  $20^\circ C$  реагент узнает практически то же число участков связывания, которое в обоих случаях одинаково зависит от концентрации реагентов.

Изотермы алкилирования ДНК *E. coli* при  $40^\circ C$  и ДНК фага T7 при  $20^\circ C$  (рис. 3) также имеют ступенчатый характер с резким изменением степени алкилирования при критических избытках реагента. На второй ступени наблюдается заметный разброс значений степени модификации, вызываемый незначительными изменениями условий опыта. Очевидно, комплексообразование и алкилирование зависят также от конформации денатурированной ДНК. Так, ДНК *E. coli*, охлажденная после тепловой денатурации до  $0^\circ C$  и затем нагретая до  $40^\circ C$ , и ДНК, сразу охлажденная до температуры опыта, при одинаковых избытках реагента алкилируется в комплексах по-разному, особенно на второй ступени насыщения (рис. 3). Резкое различие зависимости алкилирования денатурированной ДНК фага T7 и ее отдельных цепей от концентрации реагента, вероятно, связано также с различием конформации oligo(T)-участков отдельных цепей и их смеси (рис. 6).

Ступенчатый характер изотерм алкилирования и комплексообразования может быть связан с включением в комплексообразование с реагентами при их низкой концентрации вначале длинных oligo(T)-последовательностей, конкурентно подавляющих комплексообразование с более короткими участками, средство которых к реагентам значительно слабее. При больших избытках реагентов связывание с короткими oligo(T)-участками становится заметным. Еще одной причиной ступенчатости изотерм

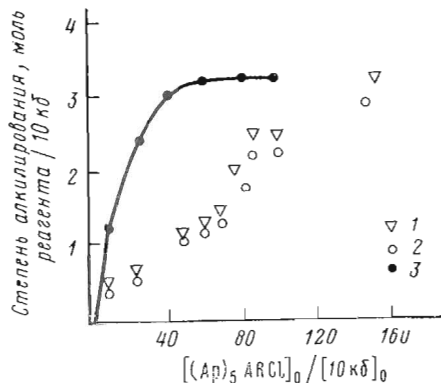


Рис. 6

Рис. 6. Изотермы алкилирования депатурированных *l*-цепи (1), *r*-цепи (2) и смеси цепей ДНК фага T7 (3) реагентом  $(Ap)_5ARCl$  при  $40^\circ C$  в буфере 1

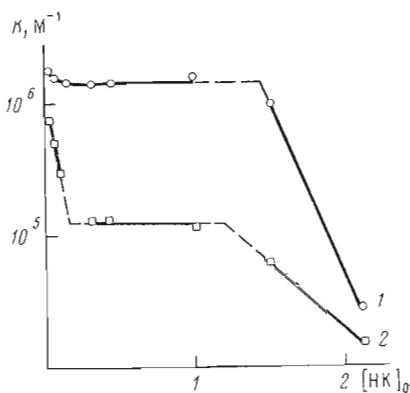


Рис. 7

Рис. 7. Зависимость константы комплексообразования  $(Ap)_5ARCl$  с ДНК *E. coli* при  $20^\circ C$  от концентрации ДНК в буфере 1 (1) и буфере 2 (2)

может быть появление в ходе взаимодействия новых участков связывания, что ранее наблюдалось для связывания рРНК с  $(Ap)_5ARCl$  [8]. Эти две причины мы пытались дискриминировать по величине константы комплексообразования  $K$ . Появление новых участков связывания обычно имитирует повышение константы связывания или незначительное ее уменьшение (в 2—3 раза). Включение в комплексообразование более коротких последовательностей с образованием комплексов с меньшим на единицу числом А·Т-пар ведет к понижению константы в 10—30 раз [9, 13].

Константы комплексообразования можно определить по данным алкилирования в комплексах [6]. Согласно [6, 7], алкилирование рРНК с помощью  $(Ap)_{n-1}ARCl$  имитирует комплексообразование по крайней мере до половины изотермы комплексообразования. На этом участке изотермы конечная степень алкилирования в каждой точке совпадает с начальной концентрацией комплексов. Это позволяет оценить константы в предположении независимости участков связывания, если общее число участков связывания  $b$  определено независимым путем и если  $K$  не зависит от концентрации нуклеиновой кислоты в достаточно большом интервале концентраций (при которых межмолекулярная агрегация не исказит параметров равновесия [6]).

Действительно,  $K$  комплексообразования  $(Ap)_5ARCl$  с ДНК *E. coli* при  $20^\circ C$ , вычисленная по данным алкилирования, не зависит от концентрации ДНК в широком интервале (рис. 7). В присутствии ионов магния при ионной силе 0,2 М она постоянна от 0,02 до 1,2 мМ концентрации нуклеотидов ДНК. При низкой ионной силе  $K$  постоянна практически в том же интервале, хотя ее величина, как и следует ожидать, на порядок ниже. Повышение концентрации ДНК выше 1,3 мМ снижает  $K$  на 1—2 порядка.

Для оценки констант комплексообразования по данным алкилирования в комплексах, как уже упоминалось, необходима величина  $b$  — число участков связывания в нуклеиновой кислоте. Поскольку вследствие конкурентного ингибирования модификации продуктом превращения реагента —  $(Ap)_5ARON$  [7, 14] экспериментально определяемое плато степени алкилирования может быть ниже числа участков связывания, для оценки  $K$  число  $b$  было принято равным 50 на 10 кб ДНК *E. coli* (несколько выше второй ступени насыщения (рис. 5), выявляемой равновесным диализом). Для ДНК фага T7  $b$  принято равным 30 (несколько выше максимальной степени алкилирования при  $20^\circ C$ ). Как следует из рис. 1, плато первой ступени алкилирования существенно зависит от температуры, но

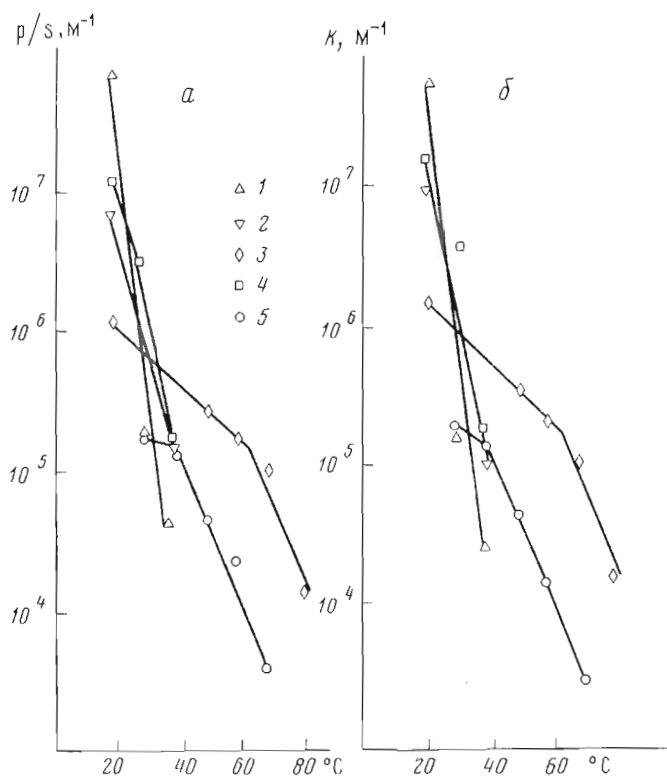


Рис. 8. Зависимость от температуры эффективности алкилирования ( $p/s$ ) (а) и констант комплексообразования (б)  $(Ap)_5ARCl$  (1, 2, 4) и  $(Ap)_7ARCl$  (3 и 5) с ДНК *E. coli* (1, 5); ДНК фага  $\lambda$  (2), T7 (4) и ДНК селезенки (3)

для некоторых ДНК значения плато близки. Так, ДНК *E. coli* и фага  $\lambda$  имеют одинаковое плато ( $\sim 25 (T)_n/10$  кб); ДНК фагов T7, T2 и T4 имеют предельную степень алкилирования 16–18 ( $(T)_n/10$  кб). Видимо, значения  $b$  для других ДНК могут быть аналогичными. Поэтому для оценки  $K$  связывания  $(Ap)_5ARCl$  с ДНК фага  $\lambda$  и селезенки, как и для ДНК *E. coli*, мы использовали  $b$  50; для остальных ДНК  $b$  было принято равным 30. Определить истинное плато насыщения по данным алкилирования, вероятно, можно, сравнив комплексообразование и алкилирование на примере олиго- или полинуклеотида, содержащего одинаковые по строению и доступности участки связывания, не включающиеся ни в какие взаимодействия с другими участками полинуклеотида.

Величины усредненных значений  $K$  и эффективностей алкилирования, вычисленные из начальных участков изотерм алкилирования (рис. 1 и 2) по формулам работы [6], с увеличением температуры на  $10\text{--}20^\circ\text{C}$  для большинства ДНК падают на порядок (рис. 8). Связывание  $(Ap)_5ARCl$  с разными ДНК протекает практически с одинаковыми значениями  $K$  (табл. 1) и зависимости их от температуры, как и следовало ожидать, для oligo(T)-участков одинаковой длины. С ДНК *E. coli* оба реагента —  $(Ap)_5ARCl$  и  $(Ap)_7ARCl$  — образуют при  $30^\circ\text{C}$  комплексы с близкими значениями  $K$  (табл. 1). Однако с повышением температуры от  $30$  до  $40^\circ\text{C}$  константа связывания  $(Ap)_7ARCl$  с ДНК *E. coli* не меняется, и лишь дальнейшее повышение температуры приводит к падению ее величины. Выше  $40^\circ\text{C}$  увеличение температуры на  $20^\circ$  вызывает уменьшение величины  $K$  на порядок.

Заметное отличие от наблюдаемой закономерности имеет место при связывании  $(Ap)_7ARCl$  с ДНК селезенки, oligo(T)-последовательности

которой длиннее таковых в ДНК *E. coli*. При повышении температуры от 20 до 50° С константа связывания падает всего в 3 раза. Для ее понижения на порядок требуется повышение температуры от 20 до 60—70° С. Выявленная для ДНК *E. coli* закономерность падения величины  $K$  на порядок при повышении температуры на 20° С для ДНК селезенки начинает проявляться лишь выше 50° С.

Обращает на себя внимание заметное сродство  $(Ar)_{n-1}ARCl$  к ДНК даже при повышенной температуре (табл. 1). Вероятно, из-за недоступности реагенту длинных  $(T)_n$ -участков кажущуюся неизменность  $K$  при 20—60° С для  $(Ar)_7ARCl$  можно объяснить участием в комплексообразовании и алкилировании более коротких  $(T)_n$ -последовательностей. Более длинные участки освобождаются при повышении температуры. Величины констант, оцененных для разных ступеней изотерм алкилирования, оказались либо несколько ниже, либо одного порядка. Таким образом, ступенчатый характер комплексообразования и алкилирования в комплексах обусловлен в основном появлением по ходу комплексообразования новых участков связывания как той же длины, что и реагент, так и более коротких.

Известно, что величина  $K$  с уменьшением на единицу числа А·Т-пар в образующихся комплексах падает в 10—30 раз и в 80—100 раз при уменьшении на единицу числа G·С-пар [9, 13]. Повышение температуры вызывает такое же уменьшение концентрации комплексов ( $[ДНК \cdot R] = K[ДНК][R]$ ). Отсюда с повышением температуры на 10—20° С понижается концентрация всей смеси комплексов с одновременным исчезновением комплексов лигандов пониженного сродства. При низкой температуре, возможно, сродство  $(T)_n$ -участков с разными  $n$  достаточно велико, концентрация всех комплексов близка к насыщению и все доступные реагенту участки образуют комплексы и алкилируются. С повышением температуры комплексы, образованные лигандами с высоким сродством, присутствуют в высокой концентрации, комплексы с числом  $(A \cdot T)$ -спариваний на единицу короче — в 10 раз меньше и т. д., т. е. в смеси присутствуют комплексы  $(Ar)_{n-1}ARCl$  с участками ДНК  $(T)_n$ ,  $(T)_{n-1}$  и  $(T)_{n-2}$  в соотношении 1:0,1:0,01. Повышая температуру, можно добиться исключительного или преимущественного образования комплексов с полностью спаренными основаниями.

Таким образом, благодаря большим различиям в константах комплексообразования мало различающихся по длине участков связывания ДНК с олигомером возникает возможность с помощью температуры регулировать состав образующихся комплексов, различающихся по длине участков связывания. Это ведет к повышению комплементарной точности при алкилировании в комплексах. Совокупность полученных данных позволяет сформулировать эмпирическое правило при алкилировании ДНК реагентами  $(Ar)_{n-1}ARCl$  в 0,01 М  $MgCl_2$  и 0,2 М  $NaCl$ : повышение температуры на 10—20° С в интервале 20—80° С повышает точность 5'-комплементарно адресованного алкилирования открытых независимых участков связывания на единицу А·Т-спаривания (в комплексах с общим числом А·Т-пар от 4 до 8).

Отметим, что уменьшение числа алкилируемых участков связывания  $(Ar)_{n-1}ARCl$  в ДНК *E. coli*, фагов T7 и  $\lambda$  с повышением температуры на 10—20° С коррелирует с изменением суммы  $(T)_n$ -последовательностей в этих ДНК с постепенно увеличивающейся длиной  $n$  от 4 до 7. Эти значения были оценены [3, 15, 16] из состава пиримидиновых блоков указанных ДНК, определенного в работах [17—19] с помощью апурицизации ДНК по Бартопу.

Специфическое изменение связывания, а не просто равномерное уменьшение концентрации комплексов подтверждается составом оснований, алкилированных в комплексах при разной температуре. Значительное



Состав алкилированных оснований, образующихся при модификации ДНК в комплексах с  $(Ar)_n$ ARCl в условиях насыщения

ДНК	Температура реакции, °С	Степень модификации, моль/10 мб ДНК		
		ДНК	гуанина в ДНК	аденина в ДНК
<i>E. coli</i>	20	26	12,5	13,5
	30	6,3	5,3	1,0
	40	4,2	3,6	0,6
фага T7	20	17,5	5,1	12,4
	40	3,2	0,6	2,6
селезенки быка	20	25	8	17
фага $\lambda$	20	21,5	2,1	19,4
	40	4,3	1,6	2,7
фага T2	20	18,2	1,4	16,8
	40	4,5	1,6	2,9
фага T4	20	18,2	2,6	15,9
	40	4,3	2,0	2,3

изменение состава алкилированных оснований (табл. 2) свидетельствует о том, что определенные комплексы исключаются из связывания. Равномерное изменение концентрации всех комплексов заметно не влияет на состав алкилированных оснований. Как видно из табл. 2, при алкилировании с помощью  $(Ar)_n$ ARCl во всех исследованных ДНК модифицированы только пурины. Соотношение алкилированных пуринов резко зависит от вида ДНК и от температуры. Это указывает на неравномерное изменение концентрации комплексов при повышении температуры и на потерю способности к комплексообразованию наиболее коротких  $(T)_n$ -участков с  $n < 4$ .

Резкое различие в характере изотерм алкилирования с помощью  $(Ar)_n$ ARCl денатурированной ДНК фага T7 и ее отдельных цепей (рис. 7) при 40° С определяется существенной (на порядок) разницей в константах комплексообразования (табл. 1). Следствием этого является пониженная эффективность алкилирования. Поскольку средство одинаковых участков связывания в этих ДНК к реагенту должно быть одинаковым, то кажущаяся высокая константа связывания реагента смесью цепей отражает, скорее всего, кооперативный процесс появления новых доступных участков связывания или образования трехтяжевых комплексов [20], к которому способны, вероятно, не все, а определенным образом расположенные в ДНК  $(T)_{n \geq 6}$ -участки. Специфичное расположение  $(T)_n$ -участков в ДНК фага T7 обнаружено в работе [3]. Можно предположить, что именно эти районы ДНК особенно легко изменяют свою пространственную структуру под действием  $(Ar)_n$ -ARCl.

### Экспериментальная часть

ДНК *E. coli* выделяли из биомассы *E. coli* MRE-600 четырехкратной экстракцией фенолом [21]. ДНК фага T7 получали щелочным лизированием фага T7 (получен на опытной установке НИОХ СО АН) при ультрацентрифугировании фага в щелочном градиенте плотности сахарозы и последующей двукратной фенольной депротенизацией [3, 22]. ДНК фагов  $\lambda$ , T4 и T2 любезно предоставлены Л. И. Ли и А. М. Крутиловой (ИБиФМ АН СССР). ДНК селезенки — производства Олайнского завода химреактивов (Латвийская ССР). ДНК очищали ультрацентрифугированием в щелочном градиенте плотности сахарозы (5—25%) в соответствии с [5].

Константы седиментации ДНК вычисляли по данным ультрацентрифугирования в щелочном градиенте плотности сахарозы (5—25%) («Spinco L-65», ротор SW-25, США, 25 000 об/мин, 7—17 ч) с помощью маркера фага T7 (33,5 S) (ДНК селезенки —8—10, ДНК *E. coli* —9—11 или 50, ДНК фага  $\lambda$  —36, T4 —42, T2<sup>+</sup> —36 или 62,5 S). Константа седиментации ДНК фага T7 в щелочном градиенте плотности сахарозы совпадала с константой седиментации лизированного в процессе центрифугирования фага T7.

Концентрацию ДНК определяли по УФ-поглощению при 260 нм и экстинкции усредненного нуклеотида, равной  $7,25 \cdot 10^3$  для денатурированной ДНК *E. coli*;  $7,20 \cdot 10^3$  — ДНК селезенки;  $7,0 \cdot 10^3$  — ДНК фага T7;  $6,95$  — ДНК фага  $\lambda$ ;  $6,96 \cdot 10^3$  — ДНК фагов T4 и T2 [3,15], и выражали в моль полимера длиной в 10 кб или в М нуклеотидов. Меченые [<sup>14</sup>C](Ar)<sub>n-1</sub>ARCl (n 6 и 8) получали по [23]. Удельная радиоактивность реагентов —5 мКи/ммоль. Радиоактивность растворов просчитывали в диоксановом сцинтиллаторе, радиоактивность на бумаге — в толуольном, используя счетчик «Mark-2» (Nuclear Chicago, США).

*Зависимость связывания (Ar)<sub>5</sub>ARCl с ДНК от концентрации реагента* определяли с помощью равновесного диализа по методу [14] в модификации [6] при 0° С в 0,01 М трис-НСl (рН 7,4), 0,2 М NaCl, 0,01 М MgCl<sub>2</sub> (буфер 1). Концентрация ДНК 0,3 мМ, объем ячеек 0,25 или 0,5 мл. Для определения концентрации реагента в ячейках отбирали по 2 пробы объемом 0,05—0,15 мл и просчитывали их радиоактивность. Равновесие в ячейках устанавливалось через 2 сут (концентрация реагента в ячейках в последующие сутки не изменялась). Результаты по связыванию выражали в моль реагента на 10 кб ДНК.

Каждые усредненные константы комплексобразования (K, M<sup>-1</sup>) вычисляли как в работе [1]. Эффективность алкилирования определяли из данных алкилирования по методике работы [24].

*Алкилирование ДНК в комплексах с (Ar)<sub>n-1</sub>ARCl* проводили аналогично описанному ранее [3, 5]. Раствор 4—5 ОЕ<sub>260</sub>/мл ДНК в 0,01 М трис-НСl, рН 7,4 (буфер 2) денатурировали, выдерживая 15 мин в кипящей водяной бане, и быстро охлаждали до температуры опыта. Добавляли NaCl до 0,2 М, MgCl<sub>2</sub> до 0,01 М и раствор [<sup>14</sup>C](Ar)<sub>n-1</sub>ARCl в 0,01 М трис-НСl (рН 7,4) в возрастающей концентрации. Конечная концентрация ДНК —1—2 ОЕ<sub>260</sub>/мл. Растворы выдерживали при 20° С в течение 7 сут, при 30° — 3 сут, при 40° — 8 ч, при 50° — 3,3 ч, при 60° — 1 ч, при 70° — 20 мин, при 80° С — 7 мин до полного расходования реагента в соответствии с [25].

ДНК, алкилированную реагентом (Ar)<sub>5</sub>ARCl, выделяли спиртовым осаждением [3, 5] и далее анализировали во фракциях радиоактивность и УФ-поглощение [3, 5, 15]. Степень модификации определяли по радиоактивности и УФ-поглощению алкилированной ДНК, растворенной в 0,01 М трис-НСl (рН 7,4), и контролировали по соотношению радиоактивности в ДНК и объединенных супернатантах в расчете на исходное количество ДНК. Алкилированную с помощью (Ar)<sub>7</sub>ARCl ДНК выделяли гель-фильтрацией на сефадексе G-75 при 60° С. Степень модификации вычисляли по содержанию [<sup>14</sup>C](Ar)<sub>7</sub>AR-остатков во фракции ДНК (контролируя величину по распределению радиоактивности в обеих фракциях и проверяя выход ДНК) и выражали в моль остатков (Ar)<sub>7</sub>AR, присоединившихся к 10<sup>4</sup> моль нуклеотидов ДНК; при этом учитывали долю реагента, оставшегося связанным с ДНК из-за неполного разрушения комплекса при 60° С (~1,2%).

*Зависимость степени модификации ДНК с помощью (Ar)<sub>7</sub>ARCl от температуры* определяли, алкилируя 2 ОЕ<sub>260</sub>/мл ДНК селезенки при 20, 50, 60, 70, 80° С и ДНК *E. coli* при 30, 40, 50, 60 и 70° С в течение времени, достаточного для полного расходования реагента [25] при 50- и 30-кратных избытках реагента соответственно (по отношению к концен-

трации ДНК) длиной в 10 кб. Алкилированную ДНК выделяли гель-фильтрацией и определяли степень модификации, как описано выше.

Элиминирование и анализ состава алкилированных оснований из ДНК проводили по [13].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Гринева Н. И., Карлова Г. Г., Мызина С. Д., Чемасова А. П. (1975) Биоорганическая химия, 1, 1707-1715.
2. Grineva N. I., Karlova G. G., Kusnetzova L. M., Venkstern T. V., Baycev A. A. (1977) Nucleic Acids Res., 4, 1609-1631.
3. Бенимецкая Л. З., Герасимова Л. М., Карлова Г. Г., Гринева Н. И. (1978) Мол. биол., 12, 988-1001.
4. Pörschke D., Eigen M. (1971) J. Mol. Biol., 62, 361-381.
5. Pörschke D., Uhlenbeck O. C., Martin F. N. (1973) Biopolymers, 12, 1313-1335.
6. Гринева Н. И., Карлова Г. Г., Пичко Н. П. (1978) Мол. биол., 12, 135-147.
7. Гринева Н. И., Карлова Г. Г., Кнорре Д. Г., Пичко Н. П., Чимитова Т. А. (1980) Мол. биол., 13, 1301-1307.
8. Гринева Н. И., Карлова Г. Г., Шамоветский Г. Г. (1974) Мол. биол., 8, 351-371.
9. Lewis J. V., Brass L. F., Doty P. (1975) Biochemistry, 14, 3164-3171.
10. Miller P. S., Barret J. C., Ts'o P.O.P. (1973) Biochemistry, 13, 4887-4896.
11. Бенимецкая Л. З., Карлова Г. Г., Гринева Н. И. (1978) Биоорганическая химия, 4, 1372-1381.
12. Кочетков Н. К., Будовский Э. И., Сямукова Н. А., Свердлов Е. Д., Турчинский М., Шпбаев В. Н. (1970) в кн.: Органическая химия нуклеиновых кислот, «Наука», М.
13. Uhlenbeck O. C. (1972) J. Mol. Biol., 65, 25-41.
14. Кнорре Д. Г., Чимитова Т. А. (1978) Мол. биол., 12, 814-821.
15. Бенимецкая Л. З., Герасимова Л. М., Карлова Г. Г., Крутилина А. И., Ли Л. И., Гринева Н. И. (1979) Биохимия, 44, 803-810.
16. Гринева Н. И., Карлова Г. Г., Мызина С. Д., Фодор И., Басв А. А. (1975) Докл. АН СССР, 223, 1477-1480.
17. Rudner R., LeDoux M. (1974) Biochemistry, 13, 118-125.
18. Mushinsky W. E., Spencer J. H. (1970) J. Mol. Biol., 52, 91-106.
19. Mushinsky W. E., Spencer J. H. (1970) J. Mol. Biol., 52, 107-120.
20. Барам Г. И., Будкер В. Г., Гринева Н. И., Кнорре Д. Г., Козоровицкий А. Я., Шамоветский Г. Г. (1971) Докл. АН СССР, 201, 95-98.
21. Thomas C. A., Berns K. I., Kelly T. J. (1967) in: Procedures in Nucleic Acids Research (Cantoni C. L., Davies D. R., eds), pp. 535-540, Publ. Harper and Row, New York - London.
22. Thomas C. A., Berns K. I., Kelly T. J. (1967) in: Procedures in Nucleic Acids Research (Cantoni C. L., Davies D. R., eds), pp. 553-561, Publ. Harper and Row, New York - London.
23. Grineva N. I., Karlova G. G. (1973) FEBS Letters, 32, 351-355.
24. Бенимецкая Л. З., Гринева Н. И., Карлова Г. Г., Пичко Н. П., Чимитова Т. А. (1977) Биоорганическая химия, 3, 903-913.
25. Власов В. В., Гринева Н. И., Кнорре Д. Г. (1969) Изв. СО АН СССР. Сер. хим., вып. 1, 104-109.

Поступила в редакцию  
15.II.1980

#### EFFECT ON DNA 5'-COMPLEMENTARILY ADDRESSED MODIFICATION OF THE COMPLEXATION PARAMETERS OF OLIGOADENYLATE ALKYLATING DERIVATIVES

BENIMETSKAYA L. Z., GERASIMOVA L. M., KARLOVA G. G.,  
GRINEVA N. I.

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

Extent of alkylation within the complexes and complex formation of  $(Ap)_{5-7}ARCl$  with denatured DNA unevenly depend on the reagent concentration: both at first are proportional to and then independent of the reagent concentration, while further increase in the reagent concentration produces additional saturable binding. The maximal extent of alkylation depends on the temperature, reagent excess and DNA nature. Basing on the temperature dependence of the complexation constant (one order of magnitude decrease upon a 10-20° rise within the 20-80° C range), maximal extent of alkylation and of the composition of alkylated bases, a conclusion is reached about higher accuracy of complexation and alkylation in the DNA complexes with  $(Ap)_{5-7}ARCl$  as related to one unit of A-T base-pairing. Higher affinity of  $(Ap)_5ARCl$  for the denatured phage T7 DNA, as compared to its separated chains, is indicative of a cooperative reagent binding.