



УДК 547.963 + 547.854 + 547.416

ХИМИЧЕСКАЯ НАПРАВЛЕННОСТЬ И ПОЗИЦИОННАЯ  
СПЕЦИФИЧНОСТЬ АЛКИЛИРОВАНИЯ РИБСОМАЛЬНОЙ РНК  
2', 3'-O-[4-(N-2-ХЛОРЭТИЛ-N-МЕТИЛАМИНО)БЕНЗИЛИДЕН]-  
ОЛИГОНУКЛЕОТИДАМИ В КОМПЛЕМЕНТАРНОМ КОМПЛЕКСЕ \*

Гринева Н. И., Картова Г. Г.

Институт органической химии Сибирского отделения  
Академии наук СССР, Новосибирск

На примере реакции рРНК из *E. coli* с  $(Ap)_{n-1}ACH-R-Cl$  исследована химическая направленность и позиционная специфичность комплементарно адресованного алкилирования нуклеиновых кислот реагентами с модифицирующей группировкой на 3'-конце. Алкилирование в комплексе протекает с чрезвычайно высокой позиционной специфичностью, но без какой-либо химической избирательности. Вне комплексов алкилируется преимущественно гуанин. С помощью кислотного гидролиза рРНК, алкилированной в комплексе с  $(Ap)_5ACH-R-Cl$ , идентифицированы 7-алкилгуанин ( $OCHR\ Gua$ ), 3-алкилцитидиловая кислота ( $OCHR\ Cp$ ), продукты превращения в кислоте 1-алкиладенина ( $OCHR\ Ade$ ) и эфиров пуриновых 5'-нуклеотидов. Содержание алкилированных оснований в гидролизате соответствует нуклеотидному составу рРНК. Алкилирование в комплексе протекает по одному определенному положению вблизи 5'-конца участка связывания рРНК. Реакция в комплексе протекает количественно, если в этом конформационно удобном для алкилирования положении находятся гуанин, цитозин или аденин; урацил в реакцию не вступает. Оценена позиционная ошибка алкилирования в комплексах. В условиях неполного связывания комплементарных участков скорость алкилирования в комплексе может превосходить скорость реакции в растворе на 4—5 порядков. Позиционная ошибка комплементарно адресованного алкилирования в этих условиях 0,03%.

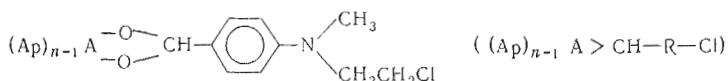
Ранее нами было показано, что при взаимодействии рРНК с алкилирующими производными олигонуклеотидов образуются комплементарные комплексы [1], в которых протекает «комплементарно адресованное» алкилирование рРНК со скоростью, примерно на 3 порядка превышающей скорость алкилирования в растворе (при одинаковых концентрациях реагентов) [2, 3]. После модификации большей части участков связывания в рРНК алкилирование практически останавливается [3].

Специфичность модификации нуклеиновых кислот является весьма важной характеристикой в оценке пригодности метода модификации для

\* Принятые сокращения:  $(Ap)_{n-1}A > CH-R-Cl$  — 2',3'-O-[4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензилиден]олигоаденилаты ( $n = 4-6$ );  $OCHR-pRHK$  —  $\beta$ -[N-метил-N-(4-формилфенил)амино]этил-pРНК;  $OCHR\ Gua$  — 7-[ $\beta$ -(N-метил-N-(4-формилфенил)амино)этил]гуанин;  $OCHR\ Cp$  — 3-[ $\beta$ -(N-метил-N-(4-формилфенил)амино)этил]цитидин-3'(2')фосфат;  $OCHR\ Cyt$  — 3-[ $\beta$ -(N-метил-N-(4-формилфенил)амино)этил]цитозин;  $OCHR\ Ade$  — 1-[ $\beta$ -(N-метил-N-(4-формилфенил)амино)этил]аденин;  $UCH-R-Cl$  — 2',3'-O-[4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензилиден]уридин;  $OCHR\ pZ$  —  $\beta$ -[N-метил-N-(4-формилфенил)амино]этиловый эфир производного 5'-рибозофосфата.

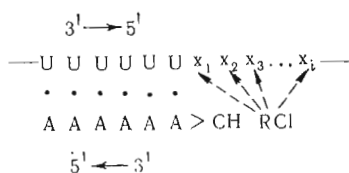
структурно-функциональных исследований. Еще более важной эта характеристика становится для комплементарно адресованной модификации — метода, предназначенного для модификации определенных оснований в избранном участке полинуклеотидной цепи и претендующего на подобие ферментативным процессам.

В данной работе исследовалась специфичность алкилирования рРНК в комплексе с алкилирующими производными олигонуклеотидов, содержащими модифицирующую группировку на 3'-конце — 2',3'-O-[4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензилиден]олигоаденилатами с  $n$  от 4 до 6:



Общая специфичность алкилирования в комплексе будет определяться, очевидно, химической направленностью реакции, точностью узнавания реагентом соответствующих последовательностей в нуклеиновой кислоте (комплементарная специфичность) и соотношением степени модификации оснований, расположенных вблизи участков связывания и удаленных от них (позиционная специфичность). К последней можно, вероятно, отнести и точность алкилирования мономерного звена ( $x$ ), расположенного на определенном расстоянии от участка связывания ( $x_1$  —  $x_i$ ).

Что касается комплементарной специфичности алкилирования в комплексе, то она, как показано в работе [3], определяется комплементарными свойствами олигонуклеотидной части реагента и температурными условиями реакции, поскольку алкилирование в комплексе подчиняется тем же закономерностям, что и ассоциация реагентов и соответствующих олигонуклеотидов. Алкилирование реагентами модифицирующей группой на 3'-конце будет, очевидно, вызывать модификацию оснований на 5'-конце участка связывания в нуклеиновой кислоте в силу того, что комплементарные комплексы образуются антипараллельными цепями поли- и олигонуклеотидов.



Позиционная специфичность алкилирования производными олигонуклеотидов будет зависеть от различий в реакционной способности реагентов в комплексах и в растворе. Согласно [4], реакционная способность хлорэтилариламинов по отношению к нуклеиновым кислотам определяется отношением констант скоростей реакций этих реагентов с нуклеиновой кислотой и низкомолекулярными нуклеофилами, присутствующими в реакционной среде (эффективностью реагентов). На алкилирование нуклеиновых кислот нуклеотидными производными хлорэтилариламинов в растворе (без образования комплексов) расходуется незначительная часть реагента: 0,1—0,3% [2—4].

При алкилировании рРНК в комплексах с  $(Ap)_{n-1}A > \text{CH---R---Cl}$  ( $n = 4$ —6) в условиях, не приводящих к насыщению всех участков связывания, с рРНК ковалентно связывается 80—96% реагентов, взятых в реакцию (рис. 1). Однако эффективность использования реагента не отражает его реакционной способности в комплексе, поскольку часть реагента не связана в комплекс (находится в растворе в свободном состоянии из-за обратимости комплексообразования). Возможно также, что не все участки связывания реагента содержат по соседству основания, способ-

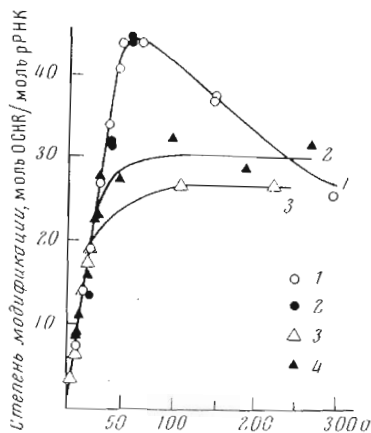


Рис. 1

Рис. 1. Зависимость степени алкилирования рРНК в комплексе с  $(Ar)_{n-1}A > CH-R-Cl$  ( $a = [(Ar)_{n-1}A > CH-R-Cl]_0 / [рРНК]_0$ ) от концентрации реагентов при  $5^\circ$ : 1, 2 —  $n = 6$ ; 3 —  $n = 5$ ; 4 —  $n = 4$ ; концентрация рРНК  $0,061 \text{ мкМ}$

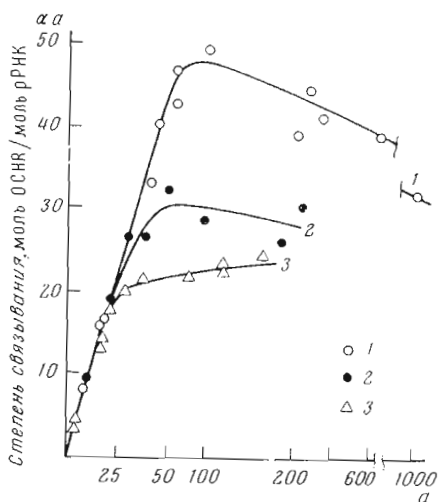


Рис. 2

Рис. 2. Изотермы адсорбции  $(Ar)_{n-1}A > CH-R-Cl$  с рРНК при  $0^\circ$  [1]: 1 —  $n = 6$ ; 2 —  $n = 5$ ; 3 —  $n = 4$

ные алкилироваться; в этом случае образуются непродуктивные комплексы, в которых реагент вынужден реагировать с низкомолекулярными нуклеофилами, присутствующими в среде. На рис. 1 приведена концентрационная зависимость алкилирования рРНК в комплексе с  $(Ar)_5A > CH-R-Cl$ . Видно, что после алкилирования всех способных алкилироваться участков реакция останавливается. Сопоставление изотермы связывания (рис. 2) и концентрационной зависимости алкилирования в комплексе в тех же условиях (рис. 1) показывает, что степень алкилирования может быть несколько выше степени нековалентного связывания реагента с рРНК (до 5%). В то же время предельная степень алкилирования рРНК в комплексе с  $(Ar)_5A > CH-R-Cl$  ( $\sim 44$  участка в молекулах  $16 + 23$  S-рРНК) иногда ниже числа участков связывания того же реагента ( $\sim 50$ ). Вероятно, часть комплексов все же не способна алкилироваться. Тот факт, что доля реагента, прореагировавшего с матрицей, выше степени ассоциации реагента, может означать сдвиг равновесия при ковалентном связывании реагента.

Высокая эффективность реагента (алкилирование 80–90% участков связывания) указывает либо на способность алкилироваться в комплексе любого основания в одном положении  $x_i$ , либо на алкилирование некоторых (или одного) оснований в нескольких положениях  $x_1 - x_i$ .

Если вблизи участков связывания имеется статистическое распределение нуклеотидов, то вероятность нахождения каждого из них в положениях  $x_1 - x_i$  можно вычислить на основании нуклеотидного состава рРНК. Из табл. 1 видно, что при способности к алкилированию только одного определенного основания, например гуанина в одном положении  $x_i$  число непродуктивных комплексов должно быть весьма большим ( $\sim 70\%$ ). Для алкилирования одного основания при наблюдаемой степени алкилирования (80% участков связывания) алкилированию должны быть доступны 4 положения ( $4 x_i$ ); алкилирование двух видов оснований требует доступности  $3 x_i$  (табл. 1). Если алкилированию подвергаются несколько различных оснований только в одном положении  $x_i$ , то содержание алкилированных производных должно соответствовать вероятности нахождения

Вероятность нахождения оснований вблизи участка связывания  
(Ap)<sub>n-1</sub>A > CH-R-Cl в рРНК *E. coli*

Основания	Нуклеотидный состав, %	$x_i$	$x_1$	$2x_i$	$3x_i$	$4x_i$
Gua	32,4	0,324	0,41	0,54		
Cyt	21,5	0,215	0,27	0,38	0,69	0,79
Ade	25,2	0,252	0,32	0,44		
Ura	20,8	0,208	0,0	0,25		
Gua + Cyt	53,9	0,539	0,68	0,79	0,90	0,93
Gua + Cyt + Ade	79,1	0,791	1,00	0,89*	0,97*	
				0,956		

\* Для  $x_1 + nx_i$ .

Таблица 2

Идентификация продуктов алкилирования рРНК <sup>14</sup>C-(Ap)<sub>5</sub>A > CH-R-Cl  
в комплексе после кислотного гидролиза модифицированной рРНК

Номер фракции	Продукты алкилирования						Заведомые вещества							
	Содержание, %	$R_j$ в системах					Вещество	$R_j$ в системах						
		1	2	3	4	5		1	2	3	4	5		
1	17	0,33	0,43	0,45	0,34	0,28	OCHRpUp?							
	83	0,83	0,89	0,87	0,88	0,86	OCHRpZ	0,85	0,90	0,88				
2	14	0,33	0,42	0,44	0,32	0,28	OCHRpU	0,59	0,70	0,65				
	70	0,41	0,57	0,54	0,50	0,44	OCHRUp	0,52	0,60	0,64	0,46	0,65		
	16	0,63	0,79	0,75	0,80	0,62	OCHRpCp?	0,39	0,55	0,53	0,52	0,40		
							OCHRCp	0,70	0,70	—	0,70	0,43		
3	14	0,42	0,60	0,63	0,42	0,69	OCHRC	0,70	0,70	—	0,70	0,43		
	86	0,70	0,78	0,77	0,72	0,86	OCHRGua	0,44	0,64	0,62	0,42	0,68		
							OCHRAde *	0,70	0,78	—	0,72	—		
4	6	0,13	0,20	0,30	0,23	0,32	I—OCHRAde		0,74	—	0,61	0,72		
	7	0,26	0,34	0,48	0,35	0,48								
	48	0,42	0,63	0,61	0,44	0,65	OCHRGua	0,44	0,64	0,62	0,42	0,68		
	3	0,56	0,75	0,74	0,59	0,76	OCHRCyt	0,60	0,78	0,76	0,59	0,76		
	32	0,70	0,82	0,84	0,76	0,88	OCHRAde *	0,71	0,77	—	0,70	—		
	4	0,84	0,96	0,94	0,92	0,97	OCHRAde *	—	0,96	—	0,93	—		
5	100	0,84	0,68	0,60	0,47	0,58	OCHRGua *	—	—	—	0,44	0,54		
							N <sup>6</sup> —OCHRAde	—	0,88	—	0,75	0,86		

\* Продукты превращений OCHRGua, OCHRAde и OCHRCp в кислоте.

ния этих оснований в данном положении, т. е. сумме содержания этих оснований в положении  $x_i$ . Таким образом, строение и состав продуктов алкилирования в комплексе позволяют определить не только химическую направленность, но и позиционную специфичность реакции в комплексе.

Для выяснения, какие основания алкилируются в комплексе, 16 + + 23 S-рРНК алкилировали <sup>14</sup>C-(Ap)<sub>5</sub>A > CH-R-Cl при 20° в условиях ~90%-ного связывания реагента. Полученную <sup>14</sup>C-OCHR-рРНК гидролизовали в 1н. HCl при 100°, гидролизат хроматографировали на дауэксе-50 (рис. 3). Вещества из объёмных фракций (I—V) разделяли на бумаге и сравнением с заведомыми веществами, полученными нами ранее [6—8], идентифицировали следующие алкилированные соединения: OCHRGua, который идентичен веществу, полученному гидролизом соответствующего алкилгуанозина [6]; OCHRCp, идентичную веществу, выделенному из OCHR-рРНК [7], и OCHRpZ — вещество, идентичное эфиру, образующемуся при кислотном гидролизе соответствующих эфиров пуриновых

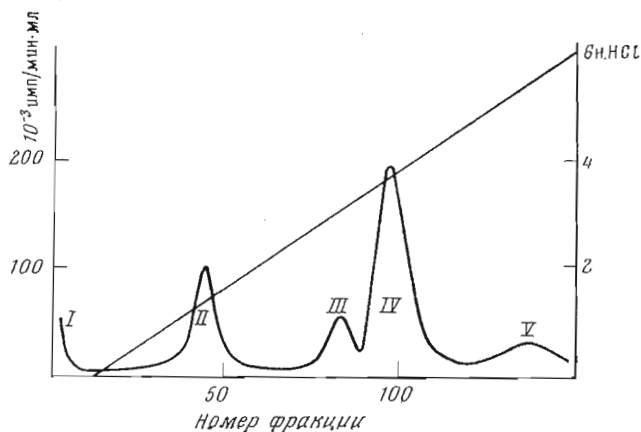


Рис. 3. Профиль разделения алкилированных веществ, образующихся при кислотном гидролизе рРНК, алкилированной  $(Ar)_3AsH-R-Cl$  в комплексе. Дауэкс 50 W  $\times$  4 (колонка  $26 \times 1,7$  см), линейный градиент от 0 до 6 н. HCl. Общий объем элюата 700 мл, скорость элюции 30 мл/ч, объем фракций 5 мл

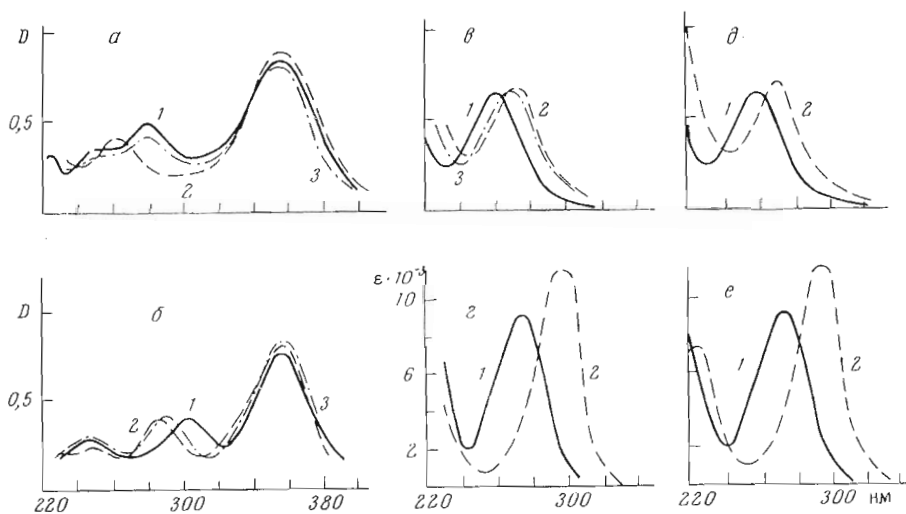


Рис. 4. УФ-спектры 1-алкиладенина (а), 3-алкилцитидина (б), их разностные спектры с 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензальдегидом (с и е), 1-метиладенина (д) [15] и 3-метилцитозина (е) [16]: 1 — рН 2 (а, б) или рН 1 (с—е); 2 — рН 11 (а), рН 13 (б, в, д), рН 10 (е) или рН 9,45 (е), 3 — рН 7

5'-нуклеотидов. Эфиры пиримидиновых 5'-нуклеотидов в этих условиях не гидролизуются [8]. Свойства выделенных и заведомых веществ приведены в табл. 2 и на рис. 4. Кроме того, в гидролизате обнаружен ряд веществ, образующихся из перечисленных выше в условиях кислотного гидролиза в результате взаимодействия альдегидной и аминогрупп в продуктах алкилирования [6, 7, 9], а также гидролиза гликозидной связи в ОСНРСр. Для их идентификации были получены ОСИРСyt и соответствующий 1-алкиладенин (ОСНРАде) алкилированием дезоксицитидина и дезоксиадепозина с помощью УСНРСl по аналогии с реакциями соответствующих рибонуклеозидов [9]. В образующихся производных без выделения их из реакционной смеси гидролизовали гликозидную и бензилденоную связи в мягких условиях. Полученные вещества идентифициро-

Состав продуктов алкилирования рРНК  $^{14}\text{C}-(\text{Ar})_5\text{ACH}-\text{R}-\text{Cl}$  в комплексе при  $20^\circ$  после кислотного гидролиза модифицированной рРНК

Степень модификации — 29,6 моль остатков ОСНR на молекулу  $16+23\text{S}-\text{pРНК}$ .

Профиль разделения гидролизата приведен на рис. 3

Продукты		Нуклеотидный состав рРНК, %	Число модифицированных участков	Содержание веществ во фракциях, % **				
Название	Содержание в смеси, %			1(10)	2(23)	3(8)	4(52)	5(7)
OCHRGua	25,1	Gua	7,42			14	48	100
OCHRGua*	7	32,4	2,08					
OCHRAde <sub>I</sub> *	16,6		4,9				32	
OCHRAde	6,9	Ade	2,05			86		
OCHRAde <sub>II</sub> *	2,1	25,2	0,62				4	
OCHRCp	16,2		4,8		70			
OCHRCp*	3,7	Cyt	1,1		16			
OCHRCyt	1,5	21,5	0,45				3	
OCHRpZ	8,3		2,45	83				
OCHRpUp?	1,7	Ura	0,51	17				
OCHRpCp?	3,2	20,8	0,95		14			
Вещества с $R_f$ 0,26 ***	3,5		1,07				7	
$R_f$ 0,13 ***	3,1		0,93				6	

\* Продукты превращения указанных веществ в кислоте.

\*\* В скобках содержание радиоактивных веществ в гидролизате, %.

\*\*\*  $R_f$  в системе I.

вали сравнением их разностных УФ-спектров со спектрами аналогичных метилированных соединений. Полученные OCHRAde, OCHRCyt, а также OCHRCp и OCHRGua выдерживали в условиях гидролиза OCHR-pРНК, определяли  $R_f$  образующихся веществ и степень превращения исходных.

В гидролизате OCHR-pРНК был обнаружен OCHRCyt, но не найдено неизмененного OCHRAde. Выдерживание заведомых веществ в 1 н. HCl при  $100^\circ$  в течение часа позволило сравнением  $R_f$ , последовательности элюции с дауэкса-50 и степени превращения идентифицировать продукт превращения OCHRGua (обозначаемый OCHRGua\*), три продукта превращения OCHRAde (OCHRAde<sub>I-III</sub>) и, вероятно, продукт превращения OCHRCp (OCHRCp\*).

Продуктов алкилирования урацила (OCHRUp) в гидролизате OCHR-pРНК не найдено.

Состав продуктов алкилирования (табл. 2) свидетельствует о том, что гуанин, аденин и цитозин в комплексе алкилируются в соответствии с их содержанием в рРНК (табл. 3). В сумме их содержание составляет 79%. Следует отметить, что при алкилировании тРНК Cl-R-SH-производными [10] в растворе образуется в 5—10 раз больше OCHRGua, чем OCHRCp; аденин и уридин в этих условиях не алкилируются.

Итак, в комплексе алкилируются три основания: гуанин, аденин и цитозин; их алкилирование протекает с близкими, если не одинаковыми скоростями; содержание алкилированных оснований соответствует содержанию исходных оснований в рРНК и, следовательно, вероятности их нахождения в одном положении  $x_i$ . Совокупность этих данных означает, что в комплексе Cl-R-SH-реагенты алкилируют любое из этих оснований количественно, если оно расположено в одном определенном, конформационно удобном для алкилирования, положении  $x_i$  вблизи 5'-конца участка связывания.

Присутствие в гидролизате OCHRpZ означает, что в комплексе алкилируются и фосфоэфирные группы. Можно предполагать, что это про-

исходит в тех комплексах, в которых конформационно способное алкилироваться положение занято уридином. Однако количество обнаруженного ОСНРрZ в 2,5 раза меньше вероятности нахождения в данном положении уридина (табл. 1 и 2). Как указывалось выше, ОСНРрZ образуется из эфиров пуриновых нуклеотидов. Если ОСНРрZ возникает в результате алкилирования межнуклеотидных фосфатов, находящихся в 5'-положении к пуриновому нуклеозиду

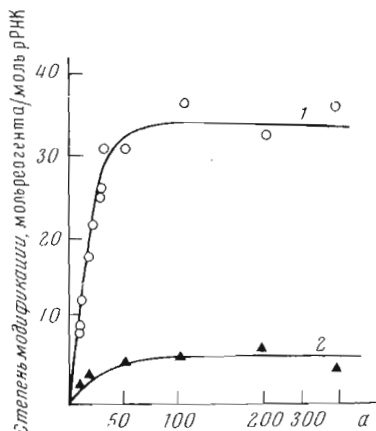


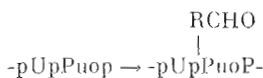
Рис. 5. Влияние температуры и избытка  $(Ar)_4ASn-R-Cl$  на степень модификации рРНК в комплексе: 1—5°, 2—20°;  $[pPНК]_0 = 0,063$  мкМ

положительно отнести вещества с  $R_f$  0,33 (система 1) из первой и второй фракции (рис. 5, табл. 2 и 3). В сумме с ОСНРрZ они составляют 60% от содержания уридина в рРНК. Однако для реализации изложенной схемы расщепления фосфотриэфиров следует допустить, что эти фосфотриэфиры достаточно устойчивы, гидролизуются в кислоте при нагревании не через циклофосфаты. Единственным свидетельством такого аномального расщепления служит отсутствие среди продуктов гидролиза 4-(N-2-оксиптил-N-метиламино)бензальдегида (НО-R-CHO), который должен образоваться в случае гидролиза фосфотриэфиров через циклофосфаты.

Следует отметить, что образование ОСНРрZ означает, что при алкилировании РНК в комплексе с  $(Np)_{n-1}N > CH-R-Cl$  положение  $x_1$  не затрагивается, так как при действии на рРНК  $(Ar)_5A > CH-R-Cl$  в случае возможности алкилирования  $x_1$  модифицированные основания составили бы 100%, поскольку вероятность нахождения уридина в  $x_1$  положении близка 0. В действительности этого не наблюдается. Кроме оснований, алкилируются фосфоэфирные группы, и количество образующихся эфиров вполне объясняет алкилирование более 79% комплексов. При алкилировании  $Cl-R-CH$ -реагентами в растворах алкилирования фосфодиэфирных связей не наблюдалось [11].

Анализ взаимодействия бензилиденовых производных олигонуклеотидов с комплементарной цепью, проведенный Д. Г. Кнорре и В. Ф. Зарытовой с помощью моделей, показал, что в конформации совершенной двойной спирали алкилирующая группировка способна реагировать с основанием в положении  $x_3$  и  $x_4$ , с некоторым напряжением с основанием в положении  $x_2$ , но не с основаниями  $x_1$ . Конформационные изменения в реагенте, возникающие благодаря нековалентным взаимодействиям модифицирующей группы с соседним гетероциклом, не учитывались.

На основании изложенного можно заключить, что при алкилировании в комплексе различия в реакционной способности гуанина, аденина и



а не конечных 5'-фосфатов 16 и 23 S-РНК\*, то, вероятно, должны алкилироваться и фосфодиэфирные группы рядом с пиримидиновыми нуклеозидами ( $-pUpPuop-$ ), а при их гидролизе — возникнуть эфиры нуклеозиддифосфатов (ОСНРрPuop). Вероятность их образования равна 0,09.

Если бы протекало алкилирование 5'-фосфата конформационно способного алкилироваться нуклеозида, в данном случае уридина, то вместо ОСНРрZ и других эфиров был бы получен только ОСНРрUp. К эфирам ОСНРрPuop в гидролизате по  $R_f$  и месту элиции с колонки можно пред-

\* Что не исключено, так как найденное количество ОСНРрZ отвечает за модификацию 2,5 участка в рРНК.

цитозина исчезают. Степень модификации оснований соответствует их содержанию в рРНК и, следовательно, вероятности их нахождения в одном положении вблизи 5'-конца участка связывания реагента  $x_2 - x_i$ , но не  $x_1$ . Реакция в комплексе протекает количественно, если конформационно способное алкилироваться положение занято гуанином, аденином или цитозином. Если в нем находится уридин, то алкилированию, вероятно, подвергается фосфодиэфирная группа.

То, что в комплексе модифицируются активные группировки, находящиеся в одном положении вблизи участка связывания, указывает на достаточно благоприятную конформацию реагентов  $(Np)_{n-1}N > CH-R-Cl$  для модификации в комплексе. Позиционная специфичность такого алкилирования относительно 5'-конца участка связывания однозначна, и ошибка комплементарно адресованной модификации будет определяться различием в скоростях алкилирования в комплексе и в растворе. Скорость алкилирования в растворе (скорость статистического алкилирования) зависит от концентрации свободного реагента, что в свою очередь определяется константой диссоциации реагента и его избытком относительно участков связывания, взятым в реакцию.

Количество статистически модифицированных оснований  $P$  на 100 точек позиционно специфичного алкилирования, выражающее ошибку комплементарно адресованной модификации, можно вычислить по формуле

$$P = 0,3 (a - \alpha a) / \alpha a = 0,3 (1 - \alpha) / \alpha.$$

При избытке реагента

$$\alpha a \approx b \text{ и } P = 0,3 (a - b) / b,$$

где  $a = [(Np)_{n-1}N > CH-R-Cl]_0 / [rPHK]_0$ ;  $\alpha$  — степень ассоциации реагента в комплексе;  $b$  — число участков связывания; 0,3 — наибольшая доля реагента, расходуемого на алкилирование в растворе в процентах [2, 3]. При недостатке реагента (при  $a \leq b$ ) различие в скоростях направленного и статистического алкилирования 4–5 порядков и  $P = 0,03 - 0,05$ . Таким образом, ошибка при алкилировании в комплексе (при  $a \leq b$ ) сопоставима с ошибкой присоединения аминокислоты к тРНК в процессе аминоацилирования, катализируемого аминоацил-тРНК-синтезазами (0,01%) [12], и ошибкой кодон-антикодонного взаимодействия и переносе аминокислоты в растущую полипептидную цепь (0,03%) [13].

При равных концентрациях свободного и связанного реагента, т. е. при  $a = 2b$   $P = 0,3$ , а при  $a = 10b$   $P = 2,7$ . Но эти 2,7 точки алкилирования равномерно распределены среди 1600 способных алкилироваться гуанинов (из 5000 оснований в рРНК) на фоне 100 (если  $b = 100$ ) участков адресованной модификации. Степень модификации рРНК в итоге составит 2,05% (102,7 оснований из 5000); из них 2% — за счет специфичной и 0,05% — за счет статистической модификации.

Для решения ряда задач, безусловно, представляет интерес алкилирование всех участков связывания или максимально быстрое алкилирование (алкилирование в условиях насыщения). При низкой температуре насыщение всех участков связывания достигается при 2–3-кратном избытке реагента (рис. 1) и  $P$ , следовательно, не более 0,9. При повышенной температуре для алкилирования всех участков связывания необходим значительный избыток реагента, поскольку концентрация комплекса невелика (рис. 5). Так, при 20° и  $a = 10b$   $(Ap)_3A > CH-R-Cl$  алкилирует в молекуле 16 + 23 S-РНК позиционно специфично 5 оснований из 5000 (рис. 4); степень модификации рРНК 0,4%, статистически при этом алкилируется 0,14 оснований, и степень статистической модификации 0,003%. При  $a = 100b$  скорость алкилирования в комплексе еще превосходит скорость алкилирования в растворе на порядок, но  $P$  равно 30 и степень статистической модификации приближается к 25% от общей.



## Экспериментальная часть

pРНК выделяли из биомассы *E. coli* MRE 600 фенольной экстракцией, осаждением этанолом и переосаждением 2 М NaCl или из рибосом по методике работы [14].  $E_{260}^{0,1\%} = 16-20$  в 0,2 М NaCl + 0,01 М MgSO<sub>4</sub> в 0,01 М трис-HCl (буфер 1), pH 7,3. По данным электрофореза в полиакриламидном геле и центрифугирования в сахарозном градиенте, препарат содержит в основном 16 и 23 S-РНК. Содержание белка по Лоури менее 2%.

Концентрацию pРНК выражали в микромолях 16 + 23 S-РНК, определяя ее по поглощению при 260 нм в буфере 1; молярную экстинкцию определяли после щелочного гидролиза в расчете на 5000 нуклеотидов [5] ( $33 \cdot 10^6 - 36 \cdot 10^6$  л·моль<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup>). Характеристика реагентов (5 мКи/ммоль) и их получение приведены в работе [3]. Радиоактивность в растворах измеряли в диоксановом сцинтилляторе (на хроматограммах — в толуольном) на счетчике «Mark II» фирмы «Nuclear Chicago» (США). Комплементарные комплексы pРНК с (Ap)<sub>n-1</sub>A > CH-R-Cl (*n* = 4—6) получали по методу, описанному в работе [1]. Алкилирование в комплексе при разных температурах и разных концентрациях реагентов проводили в буфере 1; степень модификации определяли, как указано в работе [3]. Хроматографию проводили на бумаге FN3 в следующих системах растворителей: изопропанол — конц. аммиак — вода, 7 : 1 : 2 (1); изопропанол — вода, 6 : 4 (2); этанол — 1М ацетат аммония, pH 7,5, 7 : 3 (3); изопропанол — конц. HCl — вода, 170 : 41 : 39(4); трет-бутанол — метилэтилкетон — HCOOH — вода, 40 : 30 : 15 : 15 (5).

*Идентификация алкилированных оснований в pРНК, модифицированной в комплексе.* 64 мкМ pРНК и 2,1 мМ (Ap)<sub>5</sub>A > CH-R-Cl (*a* = 32,8) в буфере 1, содержащем СНCl<sub>3</sub>, выдержали при 20° 7 сут. После добавления 1 М ацетата Na и гидролиза бензильденевой связи при 40° 30 мин ОСНR—pРНК выделяли геле-фильтрацией (1-я фракция) на сефадексе G-75 (колонка 44 × 1,4 см) в 0,02 М трис-HCl буфере (pH 7,2). Степень модификации составила 29,6 моль реагента на моль 16 + 23 S-РНК (выход по реагенту 90%). Раствор ОСНR—pРНК упарили досуха и гидролизовали в 1 мл 1 н. HCl при 100° 1 ч. После разбавления водой до 10 мл гидролизат хроматографировали на колонке с дауэксом 50W × 4 (H<sup>+</sup>), 200—400 меш (26 × 1,7 см) в линейном градиенте от воды до 6 н. HCl. Скорость элюции 30 мл в 1 ч; объем фракций 5 мл (рис. 3). Выход радиоактивных веществ — 96%. Радиоактивность во фракциях определяли непосредственно, а для определения содержания радиоактивных веществ фракции объединяли, пробы из объединенных фракций упаривали для удаления HCl, растворяли в воде и просчитывали в диоксановом сцинтилляторе. Содержание радиоактивных веществ во фракциях приведено в табл. 2. Объединенные фракции упаривали, наносили на бумагу и хроматографировали в системах 1—5. Хроматограммы просчитывали в толуольном сцинтилляторе и вещества идентифицировали сравнением с известными. R<sub>f</sub> приведены в табл. 2; состав — в табл. 3.

1 [β-(*N*-Метил-*N*-4-формилфениламино)этил]аденин (1-ОСНRAdе). 1 мМ дезоксиаденозин и 2 мМ ОСНRCl выдерживали в 30%-ном диоксане 8 ч. при 40° и pH 7, добавляя 1 н. NaOH по мере необходимости. После охлаждения к раствору добавили конц. HCl до pH 2 и смесь выдержали 12 ч при 25°. ОСНRAdе выделили из 2-й фракции, полученной при хроматографировании смеси на SE-сефадексе («Gamma», Швеция) в линейном градиенте от 0 до 1,4 н. HCl и последующей ВХ в системах 2 и 4. Выход ~5%; свойства приведены в табл. 2 и на рис. 4.

3-[β-(*N*-Метил-*N*-4-формилфениламино)этил]цитозин (ОСНRCyt). Дезоксицитидин алкилировали ОСНRCl аналогично предыдущему. Гидролиз гликозидной связи проводили в 0,01 н. HCl при 100°. Выход ~5%. Свойства приведены в табл. 2 и на рис. 4.

*Действие кислоты на алкилированные основания.* OCHRGua, OCHRAde и OCHRCr выдерживали 1 ч при 100° в 1 н. HCl. Хроматографировали на даузксе 50W × 4 (H<sup>+</sup>) и на бумаге (табл. 3). OCHRGua дает 1 вещество (выход ~20%); OCHRCr — 2 (25—30%); OCHRAde превращается в 3 новых вещества полностью.

Авторы благодарят А. Н. Чемасову за активное участие в выполнении эксперимента.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Гринева Н. И., Карпова Г. Г., Шамовский Г. Г. (1974) Молекулярн. биология, 8, 358—371.
2. Grineva N. I., Karпова G. G., (1973) FEBS Lett., 32, 351—355.
3. Гринева Н. И., Карпова Г. Г. (1974) Молекулярн. биология, 8, 832—838.
4. Гринева Н. И., Власов В. В., Зарытова В. Ф., Кюрре Д. Г. (1970) Молекулярн. биология, 4, 201—204.
5. Спириин А. С., Гаврилова Л. П. (1971) Рибосома, «Наука», М.
6. Беликова А. М., Гринева Н. И., Еремеева Т. П., Курбагов В. А. (1970) Молекулярн. биология, 4, 663—672.
7. Беликова А. М., Гринева Н. И. (1971) Изв. СО АН СССР. Сер. хим., вып. 1, 111—117.
8. Веньяминова А. Г., Гринева Н. И., Карпова Г. Г. (1974) Изв. СО АН СССР. Сер. хим., вып. 2, 130—138.
9. Беликова А. М., Гринева Н. И., Карпова Г. Г. (1973) Химия гетероцикл. соедин., 413—418.
10. Беликова А. М., Гринева Н. И. (1971) Изв. СО АН СССР. Сер. хим., вып. 5, 119—127.
11. Гринева Н. И., Кюрре Д. Г., Курбагов В. А. (1970) Молекулярн. биология, 4, 814—820.
12. Loftfield R. B., Hecht L. I., Eigner E. A. (1963) Biochim. et biophys. acta, 72, 383—390.
13. Loftfield R. B. (1963) Biochem. J., 89, 82—92.
14. Nirenberg M. W., Matthaei J. H. (1961) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 47, 1588—1602.
15. Венкстерн Т. В., Баев А. А. (1967) Спектры поглощения минорных компонентов и некоторых олигонуклеотидов рибонуклеиновых кислот, «Наука», М.
16. Ueda T., Fox J. J. (1963) J. Amer. Chem. Soc., 85, 4024—4028.

Поступила в редакцию  
10.IX.1974

### ALKYLATION OF RIBOSOMAL RNA COMPLEMENTARILY COMPLEXED WITH 2',3'-O[4-(N-2-CHLOROETHYL-N- METHYLAMINO)-BENZYLIDENE] OLIGONUCLEOTIDES. CHEMICAL SELECTIVITY AND POSITIONAL SPECIFICITY

GRINEVA N. I., KARPOVA G. G.

*Institute of Organic Chemistry, Siberian Division  
of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk*

Chemical selectivity and positional specificity of the complementarily addressed modification of nucleic acids by alkylating reagents containing 3'-terminal modifying groups have been evaluated in alkylation of rRNA *E. coli* with 2',3'-O[4-(N-2-chloroethyl-N-methylamino)-benzylidene]hexaadenylate /( $\text{Ap}$ )<sub>5</sub>ACHRCI/. Alkylation in a complex is shown to proceed highly specifically, but not selectively, 7-alkilguanine (OCHRGu), corresponding 3-alkylcytidine-phosphate (OCHRCp), products of further transformation of purine nucleoside-5'-alkylphosphate (OCHRpZ) and 1-alkyladenine (OCHRAde) were isolated after acid hydrolysis of alkyl-rRNA (OCHR—rRNA) prepared by rRNA alkylation in a complex with ( $\text{Ap}$ )<sub>5</sub>A>CHRCI. Alkylation in a complex proceeds to a completion if guanine, cytosine or adenine are conformationally available for alkylation, uracil however does not react neither in a solution nor in a complexed state. The rate of alkylation within a complex is 5 orders of magnitude higher than that in a solution. Under conditions of low reagent concentration a positional error of complementarily addressed alkylation is 0.03%.