



УДК 547.963.32+541.127

ИССЛЕДОВАНИЕ КОМПЛЕМЕНТАРНО АДРЕСОВАННОГО  
АЛКИЛИРОВАНИЯ ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ  
2',3'-О-{4-[N-(2-ХЛОРЕТИЛ)-N-МЕТИЛАМИНО]}-  
БЕНЗИЛИДЕНОВЫМИ ПРОИЗВОДНЫМИ С КОРОТКИМ  
ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫМ АДРЕСОМ

Енорре Д. Г., Кутявин И. В., Левина А. С.,  
Пичко Н. П., Подуст Л. М., Федорова О. С.

Новосибирский институт биоорганической химии  
Сибирского отделения Академии наук СССР

Исследовано алкилирование додекадезоксирибонуклеотида  $d(pC-C-C-C-T-G-T-T-T-G-G-C)$  (I) реагентами  $d(pA-A-C)-A > CH_2RCl$  (II) и  $d(pA-A-C)-U > CH_2RCl$  (III), где  $RCl - 4-[N-(2-хлорэтил)-N-метиламино]фенил$ . Константы скорости составляют при  $20^\circ C$   $6 \cdot 10^{-6} s^{-1}$  и совпадают с константой скорости ионизации C-Cl-связи в соединениях подобного типа. Из зависимости предельного выхода реакции от концентрации олигонуклеотида (I) определены константы ассоциации реагентов (II) и (III) с олигонуклеотидом (I) ( $300$  и  $160 M^{-1}$  соответственно). Предельный выход реакции соединений (I) и (II) при сопоставимых условиях на порядок превышает выходы при алкилировании реагентом (II) олигонуклеотида  $d(pT-G-A-G-T-C-G-T-A-T-T-A)$ , не содержащего участков, комплементарных адресу, и олигонуклеотида (I) неадресованным реагентом  $d(pT-T-T)-U > CH_2RCl$  (IV). Алкилирование олигонуклеотида (I) реагентом (II) происходит преимущественно по C-2 (26%) и по G-10 (54%), а также по G-6 (6%) и G-11 (14%), а при алкилировании его же неадресованным реагентом (IV) соотношение степеней алкилирования гуанинов G-6 : G-10 : G-11 составляет 1 : 1,6 : 1. Таким образом, даже для реагентов с низким сродством к мишени наблюдается достаточно высокая селективность алкилирования. Модификация олигонуклеотида (I) по G-10, по-видимому, связана с существованием значительной части олигонуклеотида в виде шпильки за счет образования двух G-C-пар.

При алкилировании нуклеиновых кислот производными олигонуклеотидов, несущими ароматические 2-хлорэтиламиногруппы, селективность модификации существенно повышается за счет предварительного образования комплекса между олигонуклеотидным «адресом» и комплементарным участком нуклеиновой кислоты [1]. В последнее время было показано, что направленное алкилирование определенных участков нуклеиновых кислот производными олигонуклеотидов может быть осуществлено внутри клеток [2] и с помощью реагентов с должным образом подобранным адресом можно подавлять в клетках экспрессию определенных мРНК [3] и размножение вирусов [4]. Это открывает перспективу использования такого подхода в химиотерапии [5].

В связи с этим представляют интерес имеющиеся в литературе данные об избирательном алкилировании нуклеиновых кислот производными коротких олигонуклеотидов, обеспечивающих образование комплементарных комплексов всего с двумя — четырьмя парами оснований. Такие олигонуклеотиды, естественно, значительно доступнее для широких испытаний биологической активности их производных, чем более длинные, обеспечивающие прочное комплексообразование. Так, было показано, что 2',3'-О-{4-[N-(2-хлорэтил)-N-метиламино]}бензилиденовое производное тринуклеотида,  $pdCpdGpA > CH_2RCl$  селективно алкилирует три точки в дрожжевой тРНК<sub>1</sub><sup>Val</sup> [6]. При этом все три точки однотипно расположены относительно CpG-фрагментов тРНК<sub>1</sub><sup>Val</sup>, способных давать лабильный дуплекс с  $dCpdG$ -фрагментом адреса. Реагент  $(ClCH_2NH)pd(ApApCp-$

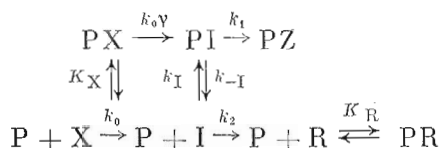
Сокращения: RCl — 4-[N-(2-хлорэтил)-N-метиламино]фенил, EB — этидийбромид, Lev — левулинил.

·СрА) избирательно алкилирует остаток G-24 в тРНК<sup>Phe</sup> *E. coli* [7]. Судя по положению точки модификации, селективность в основном обеспечивается образованием двух пар С·G с помощью остатков цитозина реагента и остатков гуанина D-петли тРНК<sup>Phe</sup>. В рибосомной РНК (сумма 16S и 23S рРНК) происходит селективная внутрикомплексная реакция с реагентом (Ap)<sub>5</sub>A>CHRCI по 30 участкам [8], хотя в рибосомных РНК отсутствуют фрагменты U<sub>5</sub> и длиннее, способные обеспечить образование достаточно протяженного дуплекса, и имеются лишь три последовательности U<sub>4</sub> и 24 последовательности U<sub>3</sub> [9].

Настоящая работа посвящена в первую очередь определению количественных характеристик алкилирования реагентами с коротким адресом на модельных олигодезоксирибонуклеотидах-мишенях. Основное исследование выполнено с олигонуклеотидом d(pC-C-C-C-T-G-T-T-T-G-G-C) (I). Ранее было показано, что с реагентом, имеющим протяженный элементарный участок d(pT-G-C-C-A-A-A-C)-A>CHRCI, реакция проходит в основном по участку длиной 1–2 олигонуклеотида (I) [10]. В настоящей работе в качестве реагентов использованы производные d(pA-A-C)-A>CHRCI (II) и d(pA-A-C)-U>CHRCI (III). Это позволило оценить степень участия в адресованном алкилировании рибонуклеозидного фрагмента, конформация которого, по-видимому, существенно искажена связанным с рибофуранозным кольцом диоксалановым циклом [11].

Для определения степени алкилирования использовали реагенты, меченные <sup>14</sup>C по СН-фрагменту диоксаланового цикла. Реакционную смесь разделяли ионообменной хроматографией. Из рис. 1 видно, что происходит достаточно четкое отделение радиоактивного продукта алкилирования от избытка непрореагировавшего реагента и продукта его гидролиза по С–Cl-связи. Для обеспечения более высокого уровня включения реагента в продукт эксперименты проводились с избытком олигонуклеотида-мишени (I).

Комплементарно-адресованное алкилирование, согласно работе [12], описывается схемой



где P — олигонуклеотид-мишень; X — реагент, I — промежуточный этиленммониевый катион, образующийся из реагента в лимитирующей стадии; PZ — продукт адресованной модификации; R — продукт гидролиза иона I; PX, PI, PR — соответствующие комплексы с мишенью; K<sub>X</sub>, K<sub>R</sub> — константы ассоциации для PX и PR; k<sub>0</sub>γ, k<sub>0</sub>, k<sub>1</sub>, k<sub>2</sub>, k<sub>1</sub>, k<sub>-I</sub> — константы скоростей реакций, указанных на схеме. Полагая концентрации I и PI квазистационарными, а концентрации PR и PX квазиравновесными для случая, когда P<sub>0</sub> (полная концентрация мишени) много больше начальной концентрации реагента x<sub>0</sub>, нетрудно получить выражение

$$[\text{PZ}]/x_0 = ([\text{PZ}]_\infty/x_0) \{1 - \exp(-k_{\text{эфф}}t)\}, \quad (1)$$

где величины [PZ]<sub>∞</sub> и k<sub>эфф</sub> выражаются через K<sub>X</sub>, P<sub>0</sub>, k<sub>0</sub>, k<sub>0</sub>γ и комбинации остальных параметров:

$$\frac{[\text{PZ}]_\infty}{x_0} = \frac{y_1 (k_1/k_2) (k_1/k_{-I})/K_X, \quad y_2 = k_{-I}/k_1,}{(1 + y_2 + y_1 y_2 K_X P_0) \{1 + K_X P_0 [\gamma (1 + y_1 y_2 K_X P_0) + y_1 y_2]\}}, \quad (2)$$

$$k_{\text{эфф}} = \frac{k_0 \{1 + K_X P_0 [\gamma (1 + y_1 y_2 K_X P_0) + y_1 y_2]\}}{(1 + y_1 y_2 K_X P_0)(1 + K_X P_0)}. \quad (3)$$

Величина [PZ]<sub>∞</sub> определяется как выход продукта алкилирования при достаточно большом времени реакции, k<sub>эфф</sub> — из зависимости [PZ] от времени по уравнению (1). Согласно уравнениям (2) и (3), как [PZ]<sub>∞</sub>, так

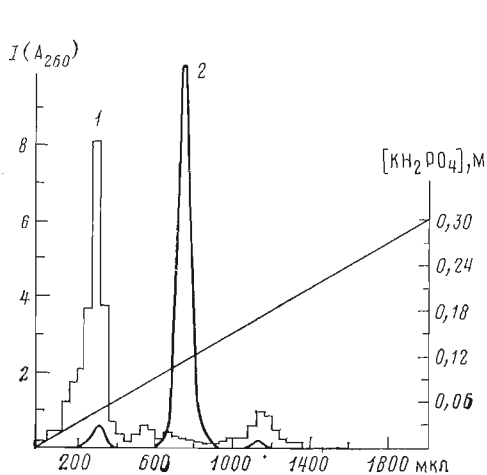


Рис. 1

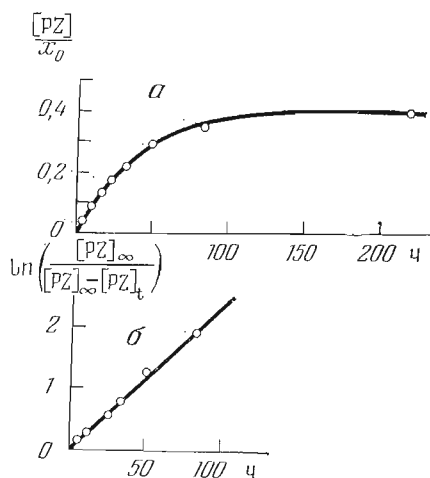


Рис. 2

Рис. 1. Хроматографическое разделение реакционной смеси алкилирования олигонуклеотида (I) реагентом (II) ( $[I]=1 \cdot 10^{-3}$  М,  $[II]=1 \cdot 10^{-4}$  М, время реакции 32 ч) на колонке с Partisil-10 SAX (1 — контроль по радиоактивности, 2 — контроль по оптическому поглощению)

Рис. 2. Зависимость степени расходования реагента (II) на алкилирование олигонуклеотида (I) ( $P_t/x_0$ ) от времени ( $[I]=2 \cdot 10^{-3}$  М,  $[II]=1 \cdot 10^{-4}$  М,  $20^\circ\text{C}$ ) (а) и линейная анаморфоза кинетической кривой (б)

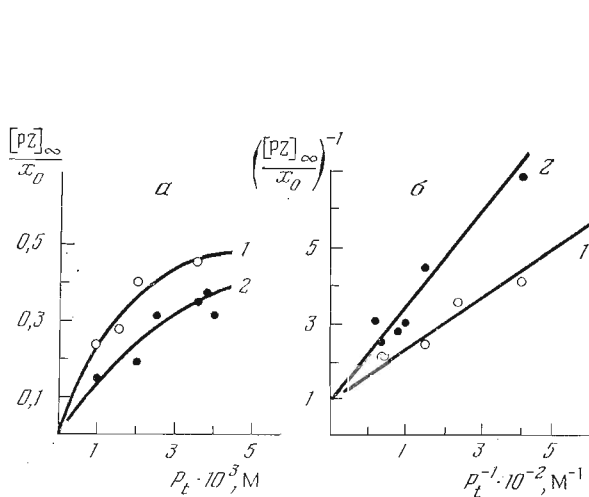


Рис. 3

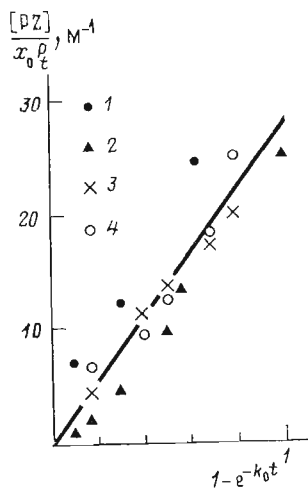


Рис. 4

Рис. 3. Зависимость предельной степени расходования реагентов (II) (1) и (III) (2) ( $[PZ]_{\infty}/x_0$ ) от концентрации олигонуклеотида (I) ( $P_t$ ) ( $[II]=1 \cdot 10^{-4}$  М,  $[III]=2,2 \cdot 10^{-4}$  М) в прямых (а) и обратных (б) координатах

Рис. 4. Зависимость величины  $[PZ]/x_0 P_t$  от  $(1 - \exp(-k_0 t))$  для алкилирования олигонуклеотида (I) реагентом (IV): 1 —  $[I]=2,9 \cdot 10^{-5}$  М,  $[IV]=4,8 \cdot 10^{-4}$  М,  $37^\circ\text{C}$ ; 2 —  $[I]=5,7 \cdot 10^{-5}$  М,  $[IV]=1,4 \cdot 10^{-3}$  М,  $37^\circ\text{C}$ ; 3 —  $[I]=7,5 \cdot 10^{-5}$  М,  $[IV]=2,4 \cdot 10^{-3}$  М,  $20^\circ\text{C}$ ; 4 —  $[I]=7,5 \cdot 10^{-5}$  М,  $[IV]=8 \cdot 10^{-4}$  М,  $20^\circ\text{C}$

и  $k_{\text{эфф}}$  зависят от концентрации олигонуклеотида мишени  $P_t$ . Схема и выражения для  $[PZ]_{\infty}/x_0$  и  $k_{\text{эфф}}$  существенно упрощаются, если превращение катиона в комплексе PI проходит много быстрее, чем диссоциация комплекса ( $k_1 \gg k_{-1}$ ), а гидролиз катиона в растворе быстрее, чем его ассоциация с мишенью ( $k_2 \gg k_1 P_t$ ). Если к тому же принять в соответствии с экспериментальными данными для реакций с реагентами, имеющими небольшой олигонуклеотидный адрес, что  $\gamma=1$  (лимитирующая стадия понижения 2-хлорэтиламиногруппы в комплексе и в растворе проходит с одной константой скорости [13]), то схему и выражения (2) и (3) мож-

но записать в виде



$$\frac{[\text{PZ}]_\infty}{x_0} = \frac{K_X P_t}{1 + K_X P_t}, \quad k_{\text{эфф}} = k_0. \quad (5)$$

Кинетическая кривая реакции алкилирования мишени (I) ( $2 \cdot 10^{-3}$  М) реагентом (II) и ее линейная анаморфоза в координатах  $\ln \{[\text{PZ}]_\infty / ([\text{PZ}]_\infty - [\text{PZ}]_t)\}$  (рис. 2) свидетельствуют о том, что соотношение (1) хорошо выполняется. Значение  $k_{\text{эфф}} = 6,0 \cdot 10^{-6} \text{ с}^{-1}$  в пределах точности эксперимента совпадает с величиной  $k_0 = 6,3 \cdot 10^{-6} \text{ с}^{-1}$ , вычисленной из данных работы [14] по ионизации CH<sub>3</sub>Cl-производных нуклеозидов и нуклеотидов. Такое же значение  $k_{\text{эфф}}$  получено и при концентрации мишени  $1 \cdot 10^{-3}$  М, т. е. действительно  $k_{\text{эфф}}$  не зависит от  $P_t$ . Это дает основание считать, что в наших экспериментах функционирует упрощенная схема (5).

На рис. 3 приведена в координатах  $x_0/[\text{PZ}]_\infty$ ,  $1/P_t$  зависимость предельной степени расходования реагента на алкилирование мишени от концентрации мишени. В соответствии с уравнением (5) зависимость линейна:  $K_X = 300 \text{ М}^{-1}$ .

В аналогичных экспериментах с реагентом (III) получены значения  $k_{\text{эфф}} = 7 \cdot 10^{-6} \text{ с}^{-1}$ ,  $K_X = 160 \text{ М}^{-1}$  ( $P_t = (1-4) \cdot 10^{-3}$  М,  $x_0 = (1-4) \cdot 10^{-4}$  М). Таким образом, замена в реагенте аденозина на уридин лишь в 2 раза снижает сродство реагента к мишени (I). Из данной работы [15] следует, что удаление одной дополнительной пары А-Т снижает константу ассоциации примерно на порядок. Таким образом, можно считать, что имеющий искаженную конформацию рибофуранозного остатка рибонуклеотидный фрагмент принимает незначительное участие в образовании комплементарного комплекса.

Сходный результат был получен при алкилировании реагентом (II) олигонуклеотида d(pA-A-C-C-T-G-T-T-T-G-G-C). В этом случае величина  $K_X$  также оказалась равной  $300 \text{ М}^{-1}$ .

Учитывая невысокое сродство реагентов (II) и (III) к обеим мишеням, можно ожидать существенного вклада неадресованного алкилирования олигонуклеотида. Для оценки этого вклада было исследовано алкилирование олигонуклеотида (I) реагентом d(pT-T-T)-U>CH<sub>3</sub>Cl (IV), для которого мишень (I) не имеет комплементарных участков, но который имеет то же число нуклеотидов, что и реагенты (II) и (III), а соответственно и тот же отрицательный заряд. Это существенно в связи со значительным вкладом электростатических эффектов в количественные характеристики алкилирования полинуклеотидов производными ароматических 2-хлорэтиламинов [16].

Реакция проводилась с меченым по 5'-концу олигонуклеотидом (I). Продукт алкилирования отделяли от непрореагировавшего олигонуклеотида (I) электрофорезом в полиакриламидном геле, степень алкилирования определяли из соотношения радиоактивности соответствующих полос.

Неадресованное алкилирование ароматическими 2-хлорэтилaminaми характеризуется фактором конкуренции, представляющим собой отношение константы скорости реакции промежуточного этилениммониевого катиона I к удельной скорости гидролиза этого катиона. Расчет проводили по формуле, выведенной в работе [17], которая при малых степенях модификации может быть записана в виде

$$\frac{[\text{PZ}]}{x_0 P_t} = p(1 - e^{-k_0 t}). \quad (6)$$

Из рис. 4 видно, что в соответствии с данными работы [18]  $p$  не зависит от температуры и составляет  $30 \text{ M}^{-1}$ . Полагая, что неадресованная реакция проходит преимущественно по остаткам гуанина, которых в олигонуклеотиде (I) всего три, для одного остатка получается величина  $\sim 10 \text{ M}^{-1}$ .

Ранее аналогичные величины были получены для алкилирования суммарной тРНК реагентами  $(\text{Me})\text{pU} > \text{CHRCI}$ ,  $\text{dTpU} > \text{CHRCI}$ ,  $\text{dTpPdTpU} > \text{CHRCI}$  [19]. Из приведенных в этой работе данных, полагая содержание гуанина в тРНК  $\sim 25\%$ , нетрудно оценить фактор конкуренции как величину порядка  $30 \text{ M}^{-1}$  для первых двух и  $10 \text{ M}^{-1}$  — для последнего реагента. Эти данные свидетельствуют о существенном влиянии числа фосфатных остатков в олигонуклеотидной части реагента на величину фактора конкуренции. Данные также согласуются с величиной фактора конкуренции, определенной в работах [20, 21] для индивидуальных остатков G в дрожжевой тРНК<sup>val</sup> и тРНК<sup>phe</sup> из *E.coli* при алкилировании реагентом  $(\text{Me})\text{pU} > \text{CHRCI}$ , где для открытых для алкилирования гуанинов эта величина составляет  $30\text{--}50 \text{ M}^{-1}$ .

Было также проведено алкилирование реагентом (II) олигонуклеотида  $\text{d}(\text{pT-G-A-G-T-C-G-T-A-T-T-A})$  (V), не содержащего участков, комплементарных адресу (возможно лишь образование комплементарных комплексов с двумя парами (одна из них А-Т), что не должно проявляться в процессе алкилирования). При этом получили, что  $p = 30 \text{ M}^{-1}$  и в расчете на один гуанин фактор конкуренции равен  $10 \text{ M}^{-1}$ , как и в реакции между соединениями (I) и (II).

Эффективность адресованной реакции может быть рассчитана как отношение скоростей адресованной и неадресованной реакций

$$f = v_{\text{ад}} / v_{\text{неад}}. \quad (7)$$

Из выражений (1) и (5) и формулы, выведенной для  $p$  в работе [17], легко можно получить, что величина  $f$  описывается выражением

$$f = \frac{K_X}{1 + K_X P_i} \cdot \frac{p P_i + 1}{p} = \frac{\xi_{\infty} (p P_i + 1)}{p P_i}, \quad (8)$$

где  $\xi_{\infty}$  — предельная степень расходования реагента при адресованной модификации мишени, имеющей концентрацию  $P_i$ .

Согласно формуле (8), при  $P_i = 1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$  величина  $f$  при модификации олигонуклеотида (I) реагентами (II) и (III) равна 7,1 и 4,1 соответственно. Таким образом, 11 и 20% продуктов соответственно получено за счет неадресованной реакции.

Для определения точек алкилирования в продукт модификации олигонуклеотида (I) реагентами (II) — (IV) вводили по 5'-концу метку  $^{32}\text{P}$  и смесь обрабатывали пиперидином. При этом происходило расщепление по модифицированным пуринам [22]. Разделение продуктов расщепления электрофорезом показало, что при реакции олигонуклеотида (I) с реагентом (IV) G-6, G-10 и G-11 модифицируются в соотношении 1 : 1,6 : 1, тогда как при модификации реагентами (II) и (III) — в соотношении 0,06 : 0,54 : 0,14 и 0,18 : 0,54 : 0,18. Следовательно, в реакции с адресованными реагентами преимущественно модифицируется G-10. Кроме того, при обработке пиперидином продуктов модификации олигонуклеотида (I) реагентами (II) и (III) не расщепилось 26 и 10% продуктов соответственно. Такие же количества нерасщепившегося продукта остаются при его выдерживании в условиях количественного элиминирования модифицированных пуринов при pH 6,0, температуре  $60^\circ\text{C}$  в течение 8 ч [23], что было зарегистрировано по уменьшению содержания радиоактивного материала в пике продукта при разделении реакционной смеси в ходе ионообменной хроматографии. Можно было ожидать, что нерасщепившийся продукт — результат модификации по остаткам цитозина, как и следует из предполагаемой структуры комплементарного комплекса олигонуклеотида (I) с реагентами (II) и (III). Действительно, при выделении нерасщепившегося продукта из геля с помощью электроосмосиса и последующей обработке в условиях расщепления по цитозинам методом Максама — Гилберта

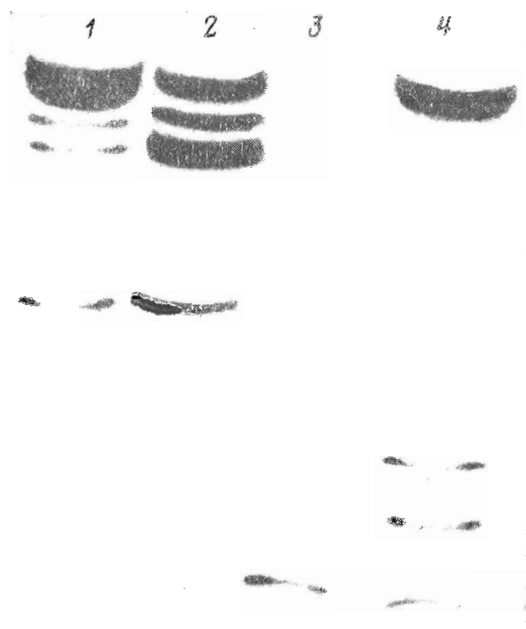
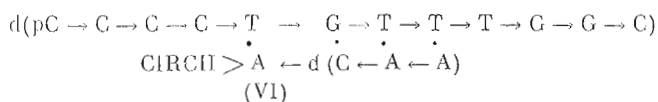


Рис. 5. Радиоавтограмма геля после электрофореза немодифицированного олигонуклеотида (1), расщепленного по пуринам (1); продукта модификации олигонуклеотида (1) реагентом (II), обработанного пиперидином (2); не расщепившегося при обработке пиперидином продукта (верхняя полоса на дорожке 2), обработанного в условиях расщепления по цитозинам (3); немодифицированного олигонуклеотида (1), расщепленного по цитозинам (4)

[22] при 37° С, когда расщепление по N3-алкилированным цитозинам протекает полностью, был получен один фрагмент  $^{32}\text{pSr}$ , отвечающий модификации по С-2 (рис. 5). Этот результат согласуется с данными [6, 24], в соответствии с которыми 3'-олигонуклеотидные производные, несущие реакционноспособную группу той же структуры, что и используемые в данной работе реагенты, модифицируют третий нуклеотид в сторону 5'-конца мишени, считая от последней комплементарной пары между адресом и мишенью.

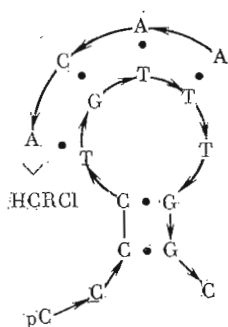
Образование модифицированных гуанинов и цитозинов доказано также методом бумажной хроматографии. При этом продукт, выделенный из реакционной смеси, подвергали кислому гидролизу [25]. Гидролизат, содержащий элиминированные основания, разделяли на бумаге FN-1, затем определяли профиль радиоактивности и рассчитывали значение хроматографических подвижностей компонентов, содержащих радиоактивную метку. Установлено, что продуктами являются соединения, имеющие значения хроматографических подвижностей такие же, что и у 7-[N-метил-N-(4-формилфенил)аминоэтил]гуанина и 3-[N-метил-N-(4-формилфенил)аминоэтил]цитозина [26].

Преимущественная модификация G-10 олигонуклеотида (I) реагентами (II) и (III) не может быть объяснена с позиции линейной структуры комплекса (VI)



в котором модификация должна была бы идти по 5'-концевым дезоксипитидинам. Следует, однако, учесть, что олигонуклеотид (I) может образовывать петлю за счет двух пар G·C. В такой конформации возможно образование комплекса с реагентами (II) и (III), в котором алкилирую-

ний фрагмент связан с G-10 и G-11:

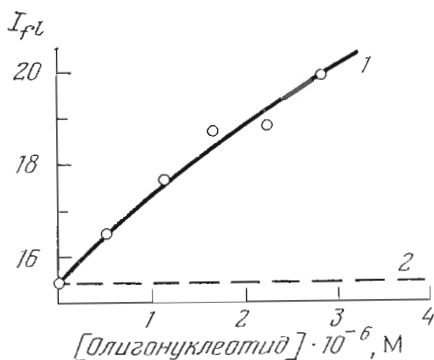


Возможность образования в олигонуклеотиде (I) шпильки, состоящей из двух G-C-пар, была доказана в экспериментах с интеркалирующим красителем — бромистым этидием, интенсивность флуоресценции которого значительно возрастает при встраивании в двойную спираль ДНК [27]. Было показано, что при добавлении к бромистому этидию олигонуклеотида (I) интенсивность флуоресценции бромистого этидия заметно увеличивается (рис. 6). Этот эффект не

наблюдается в присутствии олигонуклеотида (V), который в отличие от олигонуклеотида (I) не способен образовывать шпильку.

Модификация G-6 при алкилировании олигонуклеотида (I) реагентом (II) связана, вероятно, с неадресованной реакцией. В случае же алкилирования олигонуклеотида (I) реагентом (III) вклад неадресованной реакции недостаточен для того, чтобы обеспечить наблюдаемую степень модификации G-6. Не исключено, что в этом случае имеет также место образование комплекса между олигонуклеотидом (I) и реагентом (III) только за счет двух комплементарных пар с участием T-9 и G-10 мишени (I). При этом G-6 становится

Рис. 6. Зависимость интенсивности флуоресценции бромистого этидия ( $I_{Fe}$ ) от концентрации олигонуклеотида (I) (1) и олигонуклеотида (V) (2) ( $[EB] = 6,5 \cdot 10^{-6} M$ )



новиться доступным для атаки реакционноспособной группой реагента (III).

Таким образом, в данной работе показано, что даже в случае реагентов с низким сродством модификация может протекать в комплементарном комплексе и при этом достигается достаточно высокая селективность.

### Экспериментальная часть

*Синтез олигонуклеотидов* d(pC-C-C-C-T-G-T-T-T-G-G-C), d(pA-A-C-C-T-G-T-T-T-G-G-C), d(pT-G-A-G-T-C-G-T-A-T-T-A), d(pA-A-C)-A, d(pA-A-C)-U, d(pT-T-T)-U проводили по методу [28], используя в качестве стандартных блоков динуклеотиды (ClPh)(CNEt)<sub>2</sub>pdNp(ClPh)dN(Lev) или (CNEt)<sub>2</sub>pdNp(ClPh)dN(Lev) — 5'-концевой блок, а также (ClPh)pU(Ac)<sub>2</sub> или (ClPh)p[acA(Ac)<sub>2</sub>] — 3'-концевые блоки производства ОХП НИОХ СО АН СССР. Хлорфенильные защитные группы удаляли с полностью блокированных олигомеров с помощью *n*-нитробензальдоксимата магния по методу [29]. Остальные защитные группы удаляли концентрированным аммиаком (50° С, 5 ч или 20° С, 3 сут). Выделение и очистку олигонуклеотидов проводили с помощью ионообменной и высокоэффективной обращенно-фазовой хроматографии на хроматографе Altex (США). Для ионообменной хроматографии использовали колонку (10×250 мм) со смолой ПСМ-80, любезно предоставленной С. И. Ястребовым (ВНИИ МБ, п. Коль-

цово Новосибирской обл.), используя градиент концентрации  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (рН 6,5) от 0,02 до 0,3 М, содержащий 30% ацетонитрила. Для обращенно-фазовой хроматографии применяли колонку (10×250 мм) со смолой Lichrosorb RP-18 (Merck, ФРГ) и градиент концентрации ацетонитрила от 0 до 20% в 0,005 М растворе  $\text{LiClO}_4$ . Скорость элюирования 6 мл/мин.

Последовательность синтезированных додекадезоксинуклеотидов была подтверждена Е. Ф. Зайчиковым с помощью метода олигонуклеотидных карт.

*Синтез реагентов*  $d(\text{pA-A-C})\text{-A}>^{14}\text{CHRCI}$  (12,3 мКи/ммоль),  $d(\text{pA-A-C})\text{-U}>^{14}\text{CHRCI}$  (6,8 мКи/ммоль) и  $d(\text{pT-T-T})\text{-U}>\text{CHRCI}$  проводили по методу [30]. Очистку реагентов осуществляли с помощью обращенно-фазовой микроколоночной хроматографии на смоле Lichrosorb RP-18 (градиент концентрации ацетонитрила от 0 до 50% в 0,05 М тетраэтиламмоний-ацетате, рН 7,2).

*Радиоактивность* растворов просчитывали в диоксановом или толуольном скинтилляторе на счетчике Delta 300 (Голландия).

*Реакцию модификации* проводили в буфере состава: 0,2 М NaCl, 0,01 М  $\text{MgCl}_2$ , 0,01 М трис-HCl (рН 7,4). Продукты анализировали методом ионообменной хроматографии на микроколоночном хроматографе «Милихром» (г. Орел) на микроколоночке (1×50 мм) со смолой Partisil-10 SAX (Whatman, США) (градиент концентрации  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (рН 7,5) — от 0,03 до 0,30 М, содержащий 7 М мочевины). Скорость элюирования 50–100 мкл/мин. В ходе хроматографирования регистрировали оптическое поглощение элюата, который затем собирали порциями по 50 мкл и просчитывали в них радиоактивность.

*Гидролиз бензилиденовой связи* в реагентах (II) и (III) осуществляли при рН 4, температуре 40°С в течение 1 ч [31].

*Элиминирование модифицированных пуринов* проводили при рН 6, температуре 60°С в течение 8 ч [23].

*Идентификация алкилированных оснований методом бумажной хроматографии.* Выделяли продукт из реакционной смеси, гидролизовали его в 1 н. HCl при 100°С в течение 1 ч [25]. Гидролизат упаривали для удаления избытка HCl, растворяли в 0,1 н. HCl, наносили на бумагу FN-1 и хроматографировали в системах изопропанол — HCl —  $\text{H}_2\text{O}$  (170:41:39) и изопропанол —  $\text{NH}_3$  —  $\text{H}_2\text{O}$  (7:1:2).

*Электрофорез* проводили в 20% полиакриламидном геле, содержащем 7 М мочевины. По 5'-концу олигонуклеотида вводили метку  $^{32}\text{P}$  с помощью полинуклеотидкиназы (2,5 ед/мкл, НИКТИ БАН, г. Бердск, Новосибирской обл.). На 1–5 пмоль олигонуклеотида брали 1–5 пмоль  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  ( $1\cdot 10^3\text{--}5\cdot 10^3$  Ки/ммоль) и проводили реакцию 1 ч при 37°С.

*Для определения точек модификации* продукт выделяли из реакционной смеси с помощью ионообменной хроматографии, обессоливали гelfильтрацией на сефадексе G-10 (Pharmacia, Швеция), проводили гидролиз бензилиденовой связи, отделяли адресующую часть реагента от модифицированного олигонуклеотида ионообменной хроматографией, обессоливали и вводили по 5'-концу  $^{32}\text{P}$  фосфат. Меченый продукт отделяли от избытка  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  с помощью электрофореза, последующей электроэлюции с геля и осаждения в виде литиевой соли из водно-ацетонового раствора. Затем продукт выдерживали 1 ч в 1 М пиперидине при 95°С. При этом происходило расщепление по модифицированным пуринам [22]. Нерасщепившийся продукт обрабатывали гидразингидратом в присутствии KOH при 37°С, а затем выдерживали в пиперидине для расщепления по модифицированным цитозинам [22]. В качестве контроля проводили расщепление исходного олигонуклеотида по пуриновым [32] и пиримидиновым [22] нуклеотидам. Для радиоавтографии геля использовали рентгеновскую пленку РТ-1.

*Интенсивность флуоресценции* бромистого этидия измеряли на спектрофлуориметре Hitachi MPF-4 (Япония).

Авторы благодарят А. А. Годовикова и А. Г. Плетнева за помощь при проведении электрофореза.

1. Гринева Н. И. В кн.: Аффинная модификация биополимеров. Новосибирск: Наука, 1983, с. 187-212.
2. Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Карпова Г. Г., Кнорре Д. Г., Пичко Н. П., Райт А. С., Стефанович Л. Е. Биоорганич. химия, 1981, т. 7, № 10, с. 1512-1522.
3. Власов В. В., Годовиков А. А., Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Кнорре Д. Г., Кутявин И. В. Докл. АН СССР, 1984, т. 276, № 5, с. 1263-1265.
4. Власов В. В., Горн В. В., Кутявин И. В., Юрченко Л. В., Шарова Н. К., Букринская А. Г. Мол. генетика, микробиология и вирусология, 1984, № 11, с. 36-41.
5. Кнорре Д. Г., Власов В. В. Вестн. АН СССР, 1983, № 12, с. 74-81.
6. Grineva N. I., Karпова G. G., Kuznetsova L. M., Venkstern T. V., Bayev A. A. Nucl. Acids Res., 1977, v. 4, № 5, p. 1609-1631.
7. Гимаутдинова О. И., Горшкова И. И., Карпова Г. Г., Кутявин И. В., Грайффер Д. М. Молекулярн. биология, 1984, т. 8, № 4, с. 1419-1423.
8. Гринева Н. И., Карпова Г. Г. Молекулярн. биология, 1974, т. 8, № 6, с. 832-844.
9. Brosius J., Dull T. J., Sleeter D. P. J. Mol. Biol., 1981, v. 148, № 2, p. 107-127.
10. Горн В. В., Карпова Г. Г., Кнорре Д. Г., Кутявин И. В., Пичко Н. П. Докл. АН СССР, 1983, т. 270, № 3, с. 613-615.
11. Belikova A. M., Grineva N. I., Kabasheva G. N. Tetrahedron, 1973, v. 29, № 15, p. 2277-2283.
12. Кнорре Д. Г., Чимитова Т. А. Молекулярн. биология, 1978, т. 12, № 4, с. 814-821.
13. Бенимечкая Л. З., Гринева Н. И., Карпова Г. Г., Пичко Н. П., Чимитова Т. А. Биоорганич. химия, 1977, т. 3, № 7, с. 903-913.
14. Власов В. В., Гринева Н. И., Кнорре Д. Г. Изв. СО АН СССР. Сер. хим. н., 1969, вып. 1, с. 104-109.
15. Scheffler I. E., Sturtevant J. M. J. Mol. Biol., 1969, v. 42, № 3, p. 577-580.
16. Гринева Н. И., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Курбатов В. А. Докл. АН СССР, 1970, т. 194, № 2, с. 331-334.
17. Беликова А. М., Вахрушева Т. Е., Власов В. В., Гринева Н. И., Кнорре Д. Г., Курбатов В. А. Молекулярн. биология, 1969, т. 3, № 2, с. 210-219.
18. Гринева Н. И., Кнорре Д. Г., Сенженко Л. П., Теплова Н. М. Молекулярн. биология, 1970, т. 4, № 3, с. 307-312.
19. Власов В. В., Гринева Н. И., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г. Молекулярн. биология, 1970, т. 4, № 2, с. 201-203.
20. Власов В. В., Кнорре Д. Г. Молекулярн. биология, 1974, т. 8, № 2, с. 234-243.
21. Власов В. В., Скобельцина Л. М. Биоорганич. химия, 1978, т. 4, № 4, с. 550-561.
22. Maxam A. M., Gilbert W. Meth. Enzymol., 1980, v. 65, p. 499-560.
23. Бенимечкая Л. З., Герасимова Л. М., Гринева Н. И., Карпова Г. Г. Молекулярн. биология, 1978, т. 12, № 5, с. 988-1001.
24. Горн В. В., Карпова Г. Г., Кнорре Д. Г., Кутявин И. В., Пичко Н. П. Биоорганич. химия, 1982, т. 8, № 9, с. 1225-1233.
25. Кочетков Н. К., Будовский Э. И., Смирнова Н. А., Свердлов Е. Д., Турчинский М., Шибанов В. Н. Органическая химия нуклеиновых кислот. М.: Наука, 1970. 718 с.
26. Гринева Н. И., Карпова Г. Г. Биоорганич. химия, 1975, т. 1, № 5, с. 588-597.
27. Борисова О. Ф., Суrowая А. Н. В кн.: Итоги науки и техники. Молекулярная биология/Ред. Волькенштейн М. В. М.: ВИНТИ, 1973, с. 141-196.
28. Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Романенко В. И. Биоорганич. химия, 1982, т. 9, № 4, с. 516-521.
29. Jones S. S., Rayner B., Reese C. B., Ubasawa A., Ubasawa M. Tetrahedron Lett., 1980, № 36, p. 3075-3085.
30. Райт В. К., Карпова Г. Г., Гринева Н. И. Биоорганич. химия, 1977, т. 3, № 1, с. 31-37.
31. Бенимечкая Л. З., Карпова Г. Г., Гринева Н. И. Биоорганич. химия, 1978, т. 4, № 10, с. 1372-1381.
32. Коробко В. Г., Грачев С. А. Биоорганич. химия, 1977, т. 3, № 10, с. 1420-1422.

Поступила в редакцию  
5.VII.1985

# INVESTIGATION OF COMPLEMENTARY-ADDRESSED ALKYLATION OF OLIGODEOXYRIBONUCLEOTIDES WITH 2',3'-O-{4-[N-(2-CHLOROETHYL)-N-METHYLAMINO]}BENZYLIDENE DERIVATIVES HAVING A SHORT OLIGONUCLEOTIDE ADDRESS

KNORRE D. G., KUTJAVIN I. V., LEVINA A. S., PICHKO N. P., PODUST L. M.,  
FEDOROVA O. S.

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

Alkylation of oligodeoxyribonucleotide d(pC-C-C-C-T-G-T-T-T-G-G-C) (I) with reagent d(pA-A-C)>ACHRCl (II) and d(pA-A-C)>UCHRCl (III), where RCl is 4-[N-(2-chloroethyl)-N-methylamino]phenyl, was investigated at 20° C. The rate constant,

$6 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ , is equal to the ionization rate constant of the C - Cl bond in similar compounds. Constants of association of (I) with (II) ( $300 \text{ M}^{-1}$ ) and (III) ( $160 \text{ M}^{-1}$ ) were determined from the concentration dependence of the limit reaction yield. The limit yield of the reaction of (I) with (II) is by an order of magnitude higher than in case of the alkylation with the reagent (II) of oligonucleotide d(pT-G-A-G-T-C-G-T-A-T-T-A), that has no region complementary to the address, and of the alkylation of (I) with the nonaddressed reagent d(pT-T-T)>UCHRCI (IV). The alkylation of (I) with (IV) proceeds preferentially at C2 (26%) and G10 (54%), and in some extent at G6 (6%) and G11 (14%). Upon alkylation of (I) with the nonaddressed reagent (IV), the ratio of alkylation degrees G6:G10:G11 is 1:1,6:1. Thus, rather high alkylation selectivity is observed even for reagents with low affinity. The modification of (I) at G10 is probably associated with the existence of (I) mainly as a hairpin due to formation of two G-C pairs.