



УДК 577.113.4

СТРОЕНИЕ ПРОДУКТОВ МОДИФИКАЦИИ НУКЛЕОТИДОВ И ДНК ЭТИЛЕНИМИНОМ И ТИОТЭФОМ

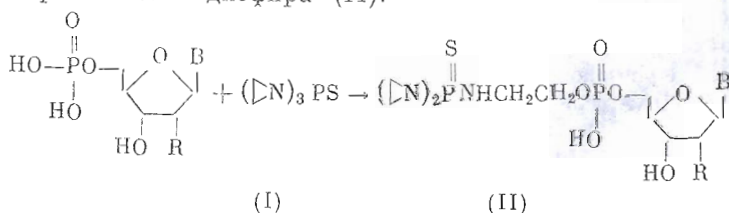
*Серебряный А. М., Андриевский Г. В., Беккер А. Р.,
Сибельдина Л. А., Шарова О. Л.*

Институт химической физики Академии наук СССР, Москва

Впервые выделены и охарактеризованы продукты амноэтилирования dGMP, GMP, AMP, dCMP и TMP этиленимином и N,N',N''-триэтилендиофосфамидом (тиотэфом) — амноэтиловые эфиры этих нуклеотидов со свободной или замещенной аминогруппой. Показано, что при действии этих агентов на dGMP или GMP параллельно с амноэтилированием фосфатной группы происходит и амноэтилирование остатка основания по положению 7, причем амноэтильные производные, образующиеся при действии тиотэфа, выделены и охарактеризованы, а соответствующие производные этиленимина разлагаются в щелочной среде уже при выделении. Люминесцентным методом впервые показаны способность тиотэфа алкилировать ДНК по положению 7 остатков гуанина.

В предыдущей работе [1] мы впервые показали, что известный противоопухольевый агент — тиотэф (N,N',N''-триэтилендиофосфамид, I) реагирует с dGMP. Основным направлением этой модификации является алкилирование фосфатной группы нуклеотида с образованием диэфира. Кроме того, было установлено, что тиотэф алкилирует dGMP в положении 7. Однако первичные продукты модификации выделены и охарактеризованы не были, так как использованный в работе [1] метод анализа предусматривал расщепление введенного в молекулу dGMP заместителя. Изменения в методике проведения реакции dGMP с тиотэфом и переход к более мягкому способу разделения продуктов реакции — анионообменной хроматографии на DEAE-целлюлозе — позволили выделить первичные продукты реакции dGMP с тиотэфом и охарактеризовать их. Разработанный метод был применен затем к анализу продуктов реакции и других канонических нуклеотидов с тиотэфом, а также позволил выделить и впервые описать продукты реакции нуклеотидов с этиленимином.

Реакцию нуклеотидов с тиотэфом проводили при 37°С в течение 2 ч в воде при pH 6,2–6,5 и после удаления избытка тиотэфа массу фракционировали на DEAE-целлюлозе (рис. 1). Обращает на себя внимание тот факт, что объем элюции основного продукта реакции нуклеотидов с тиотэфом мало зависит от природы основания в нуклеотиде (фракция 2, объем элюции 400–430 мл). Выход его не зависит от природы основания и составляет 1,2%. Это означает, что продукты образуются в результате однотипной модификации исходного нуклеотида тиотэфом, и, учитывая результаты нашего предыдущего сообщения [1], можно полагать, что такой модификацией является этерификация фосфатной группы нуклеотида с образованием диэфира (II).



IIa: B=Cua; R=H

IIб: B=Cua; R=OH

IIв: B=Ade; R=OH

IIг: B=Cyt; R=H

IIд: B=Thy; R=H

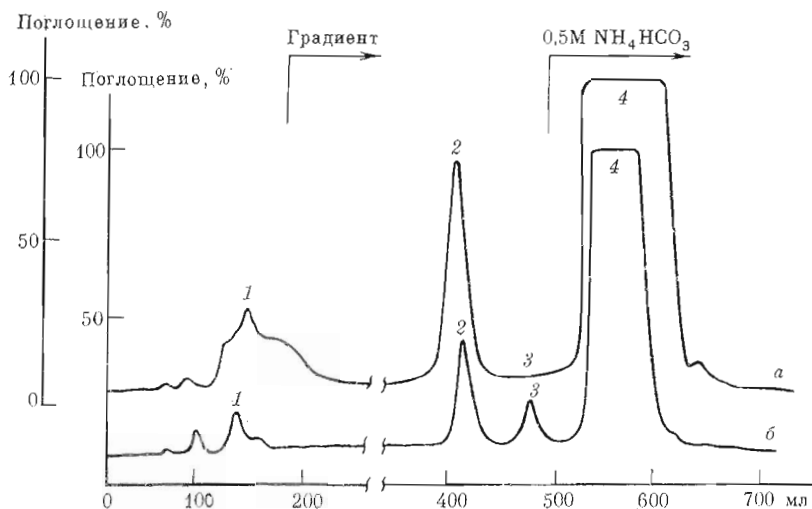


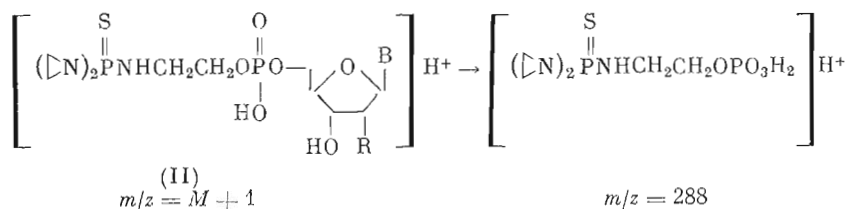
Рис. 1. Хроматография на DEAE-целлюлозе продуктов реакции тиотэфа с dCMP, TMP, AMP (а) и dGMP, GMP (б). Условия элюции описаны в «Экспер. части»: 1 — фракции, в которых элюируются примеси соответствующего нуклеозида, продукты не-установленного строения и полимеры тиотэфа; 2 — фракция эфиров нуклеотидов; 3 — продукт алкилирования гуаниновых нуклеотидов по основанию; 4 — исходный нуклеотид

Это предположение было доказано следующими спектральными и химическими данными.

УФ-спектры соединений (II) при pH 1,7 и 13 не отличаются от УФ-спектров соответствующих нуклеотидов, снятых в тех же условиях. Соединение (IIа) гидролизуетея 0,1 н. HCl, а соединения (IIб) и (IIв) — 1 н. HCl (100°С, 1 ч) с образованием гуанина и аденина соответственно. Так как в указанных условиях гидролиза все алкилгуанины и алкиладенины (кроме O⁶-алкилпроизводных гуаниловой кислоты, УФ-спектр которых отличается от спектра исходного нуклеотида) стабильны, ясно, что введенный заместитель находится в сахарофосфатной части молекулы.

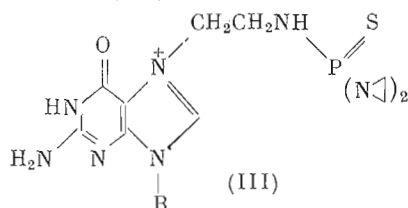
В ПМР-спектрах соединений (II) кроме сигналов от протонов исходного нуклеотида присутствует мультиплет сигналов протонов двух этилениминовых групп с δ 1,86 м.д. и сигналы от двух связанных между собой метиленовых групп (δ 3,01 и 3,57 м.д., $^3J_{\text{H,H}}$ 6,0 Гц), причем методом двойного резонанса установлено, что обе они связаны спин-спиновым взаимодействием с атомами фосфора. Учитывая данные работы [1], можно заключить, что сигнал с δ 3,01 м.д., $^3J_{\text{P,H}}$ 12,4 Гц принадлежит метиленовой группе, расположенной вблизи атома фосфора тиофосфамидной группы, а сигнал с δ 3,57 м.д., $^3J_{\text{P,H}}$ 6,1 Гц — метиленовой группе, связанной с нуклеотидной фосфатной группой. Следует отметить, что протоны этой метиленовой группы неэквивалентны. Например, в соединении (IIв) разность в химических сдвигах этих протонов достигает 0,07 м.д. и вместо одного мультиплета в спектре в области 3,57 м.д. наблюдается два симметричных мультиплета. В спектрах остальных соединений этого ряда также проявляется неэквивалентность этих протонов, но она менее выражена.

Полностью соответствуют приведенным на схеме формулам продуктов реакции (II) также их вторично-эмиссионные масс-спектры, полученные при ионизации быстрыми атомами аргона (3,6 кэВ). В спектрах всех соединений (II) имеется пик молекулярного иона с $m/z = M + 1$, где M равно сумме молекулярных масс нуклеотида и тиотэфа и, кроме того, во всех случаях присутствует ион с $m/z = 288$, отвечающий продукту, который образуется из молекулярного иона в результате разрыва связи между фосфатной группой и нуклеозидом:



Подробно закономерности фрагментации соединений этого ряда будут обсуждены в отдельном сообщении.

Аналогично было доказано строение продуктов алкилирования dGMP и GMP по положению 7 гуанинового цикла (III,) элюирующихся с DEAE-целлюлозы позднее диэфиров (II), но ранее исходного нуклеотида (рис. 1). Выход соединений (III) равен 0,7%.



IIIa: R=2'-дезоксирибозил-5'-фосфат; IIIб: рибозил-5'-фосфат.

По данным вторично-эмиссионной масс-спектрометрии, молекулярная масса соединений (III) равна сумме молекулярных масс исходного нуклеотида и тиотэфа. Их УФ-спектр отличен от УФ-спектра GMP и dGMP, что указывает на присоединение триэтилендиофосфамидной группы к основанию; в ПМР-спектре (в D₂O) отсутствует сигнал протона Н8 гуанинового цикла вследствие быстрого обмена этого протона на дейтерий из растворителя — типичное свойство N⁷-замещенных производных гуанозина, вытекающее из наличия положительного заряда на атоме азота в этих соединениях [2]. В согласии с формулами (III), по данным ПМР, введенный заместитель имеет две этилениминовые группы (мультиплет с δ 1,80 м. д.) и две связанные между собой метиленовые группы (мультиплеты вследствие неэквивалентности протонов в них, δ 4,32 и 3,43 м. д., ³J_{Н,Н} 5,2, ³J_{Р,Н} 9,8 Гц, константы ²J_{Н,Н} в соединении (IIIa) составляют 12 и 9,8 Гц соответственно).

При действии 0,1 М HCl (100° С, 1 ч) соединение (IIIa) превращается в продукт, строение которого установлено не было, но для нашей работы существенно, что его УФ-спектр при трех различных рН не отличается от УФ-спектра 7-метилгуанина, снятого в тех же условиях. Известно, что УФ-спектры 7-алкилзамещенных гуанина не зависят от природы заместителя [3]. Вероятно, соединение (IIIa) гидролизуеться в указанных условиях с образованием свободного основания, но, кроме того, происходит неизвестная нам модификация заместителя; поскольку продукт имеет характерный спектр 7-замещенного гуанина, это доказывает структуру соединения (IIIa) как 7-замещенного производного dGMP.

Таким образом, проведенное исследование подтвердило результаты нашего предварительного сообщения [1] и показало, что основным центром модификации тиотэфом в нуклеотидах является фосфатная группа. Кроме того, в dGMP и GMP тиотэф алкилирует остаток гуанина в положении 7; алкилирования других оснований в нуклеотидах мы не обнаружили.

Недавно в работе [4] методом полевой масс-спектропии были проанализированы реакционные смеси, возникающие при реакции оснований с тиотэфом, и был сделан вывод, что тиотэф может модифицировать все основания. Нам кажется, что расхождение выводов нашей статьи и работы [4] обусловлено тем, что авторы этой работы изучали модификацию свободных оснований, в то время как мы исследовали модификацию нуклеотидов. Известно, что введение рибозил(дезоксирибозил)фосфатного заместителя в молекулы оснований существенно изменяет их реакционную способность.

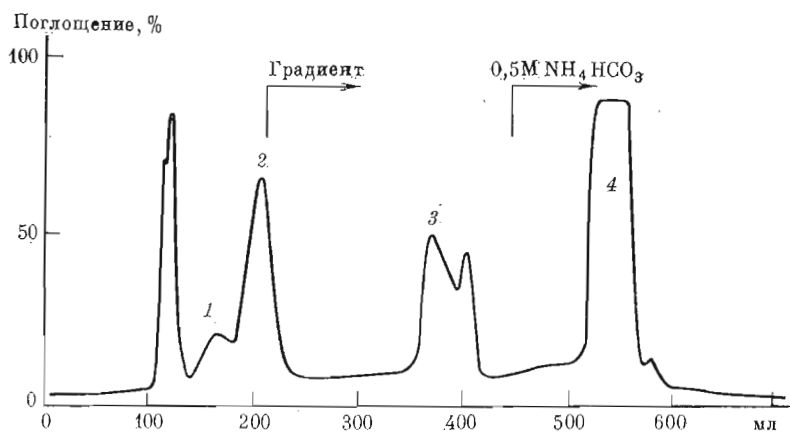
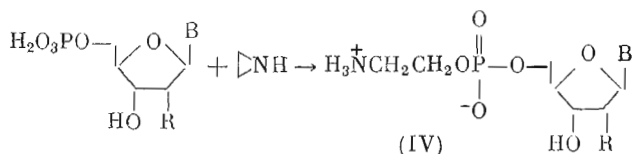


Рис. 2. Хроматография на DEAE-целлюлозе продуктов реакции этиленимина с GMP. Условия элюции описаны в «Экспер. части». 1 — примесь Guo; 2 — фракция аминоэтилового эфира GMP (IVa); 3 — продукты разложения 7-аминоэтильного производного GMP; 4 — исходный нуклеотид

Способны ли кроме тиотэфа и другие производные этиленимина алкилировать фосфатную группу в нуклеотидах? Для ответа на этот вопрос мы исследовали реакцию нуклеотидов с этиленимином при 37° С и рН среды 6,2—6,5 в течение 2 ч. Продукты реакции разделяли тем же методом, что и продукты реакции нуклеотидов с тиотэфом, — ионообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе.

Картина разделения продуктов реакции этиленимина с GMP (рис. 2) (профили элюции продуктов реакции этиленимина с другими нуклеотидами подобны, но в них отсутствует пик 3) аналогична приведенной на рис. 1 с той разницей, что пик 2 имеет объем элюции не 400, а приблизительно 200 мл и элюируется водой вскоре после выхода свободного объема колонки. Этот факт сразу указывает на возможную структуру продуктов в пике 2 как аминоэтиловых эфиров нуклеотидов (IV):



IVa: R=OH; B=Gua IVb: R=H; B=Thy

IVб: R=OH; B=Ade

Действительно, pK_a кислотной диссоциации дивалентной фосфатной группы равен приблизительно 1, pK_a первичной аминогруппы — 10; следовательно, аминоэтиловые эфиры нуклеотидов при физиологических значениях рН являются цвиттер-ионами и суммарный заряд их молекулы равен нулю. Поэтому объем элюции этих соединений с DEAE-целлюлозы лишь незначительно превышает свободный объем колонки.

Рехроматографией на сефадексе G-10 (элюция водой) соединения (IV) очищали от примеси солей, выходящих в свободном объеме колонки, и от небольшого количества неидентифицированных примесей. Выход соединений (IV) составил 8,7%. Строение соединений (IV) доказывают, во-первых, вторично-эмиссионные масс-спектры, в которых присутствуют линии с $m/z = M + 1$, где M равно сумме молекулярных масс исходного нуклеотида и этиленимина, и пик осколочного иона с $m/z = 142$ (молекулярная масса β-аминоэтилового эфира фосфорной кислоты + H⁺, см. выше). Во-вторых, со структурами (IV) согласуются и ПМР-спектры соединений, в которых кроме сигналов протонов исходного нуклеотида присутствуют сигналы от двух связанных между собой метиленовых групп, одна из которых связана спин-спиновым взаимодействием с атомом фосфора (в D₂O, мультиплет с δ 3,83 м. д., ³J_{H,H} 5,4—6,1 Гц; ³J_{P,H} 5,4—6,6 Гц и триплет

с δ 3,00 м. д.). В-третьих, соединения (IVa) и (IVб) количественно гидролизуются соляной кислотой соответственно до гуанина и аденина и, следовательно, не содержат заместителя в остатке основания. Таким образом, этиленимин действительно способен алкилировать фосфатную группу в нуклеотидах с образованием их β-аминоэтиловых эфиров.

На примере соединений (IIд), (IVa) и (IVб) оценена стабильность эфиров нуклеотидов. Фосфодиэфирная связь в соединении (IIд) в водном растворе не расщепляется при 100°С за 20 мин. Не расщепляется она и при инкубации этого эфира в трис-НСl-буфере с рН 7,18—8,95 при 37°С в течение 1 ч, 0,1 М НСl или 0,1 М NaOH за 2 ч при 37°С гидролизуют соединение (IIд) на 30 и 50% соответственно, причем продуктом гидролиза является нуклеотид, а образования тимидина при гидролизе обнаружить не удалось. Высокая стабильность эфиров в нейтральной среде подтвердилась и в опытах с соединениями (IVa) и (IVб), которые в 0,1 М фосфатном буфере с рН 6,2 при 20°С стабильны по крайней мере 3 сут.

Специального обсуждения заслуживают также свойства нуклеотидов и нуклеозидов, модифицированных этиленимином и его производными в остатке основания. Вышеописанные соединения (III) являются 7-аминоэтильными производными dGMP и GMP, имеющими электроноакцепторный

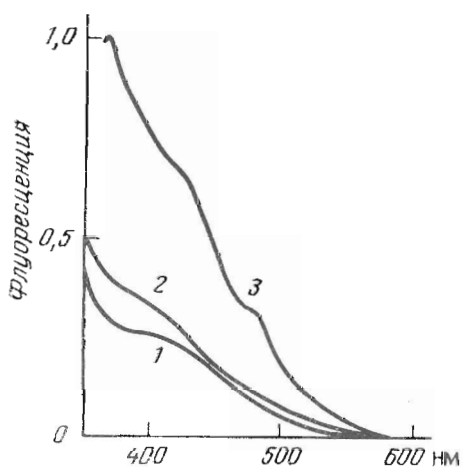


Рис. 3. Люминесценция растворов тиотэфа (1), ДНК (2) и реакционной смеси ДНК — тиотэф (3) в 0,15 М NaCl + 0,015 М тринатрий-цитратном буфере после инкубации в течение 4 ч при 37°С

этиленимином с GMP и dGMP 7-аминоэтильные производные разлагаются при хроматографии на DEAE-целлюлозе. Таким образом, из сравнения свойств 7-замещенных гуаниловых нуклеотидов и нуклеозидов следует, что экстремальная нестабильность их 7-аминоэтильных производных в щелочной среде обусловлена нуклеофильными свойствами незамещенной аминогруппы.

Обнаруженная способность тиотэфа алкилировать остаток основания в dGMP побудила нас исследовать возможность аналогичной модификации в составе ДНК. Для этого мы воспользовались люминесцентным методом [6] и нашли, что действительно после модификации тиотэфом ДНК начинает люминесцировать (рис. 3) и параметры люминесценции соответствуют тем, которые наблюдались при люминесценции 7-алкилированного dGMP [1]; следовательно, тиотэф способен алкилировать ДНК в положении 7 остатков гуанина.

Таким образом, в изложенной работе нами установлено строение продуктов модификации нуклеотидов тиотэфом и этиленимином и показано, что тиотэф способен алкилировать основания в ДНК. Полученные результаты полностью подтверждают высказанное нами в работе [1] предположение о механизме биологического действия соединений этого класса.

Хроматографические свойства полученных соединений

Соединение	Колодка	Способ очистки	
		элюент	объем удерживания, мл
IIa	Separon	A	2,5
		Б	2,1
IIб	Lichrosorb	A	10,6
		Б	4,6
IIв	»	Б	4,1
IIг	»	Б	4,8
IIд	Servachrom	Б	4,9
IIIa	Separon	A	3,4
		Б	2,7
IIIб	Lichrosorb	A	5,9
		Б	4,0
IVa	Servachrom	Б	3,6
IVб	»	Б	3,8
IVв	»	Б	3,5

Примечание. Элюент А — 5% водный ацетонитрил, Б — 10% водный ацетонитрил.

Экспериментальная часть

Спектры ¹H-ЯМР снимали в D₂O на приборе WH-360 (Bruker, ФРГ) с рабочей частотой 360 МГц. В качестве внутреннего стандарта использовали D₂O (δ 4,60 м. д.) Точность измерения химических сдвигов 0,01 м. д., констант спин-спинового взаимодействия — 0,1 Гц. Величины химических сдвигов определены как центры мультиплетов, при отнесении сигналов к определенным протонам использовали протонный магнитный двойной резонанс. УФ-спектры сняты на приборе Spereord UV-VIS (ГДР), вторично-эмиссионные масс-спектры — на приборе МИ-1201, оборудованном для вторично-эмиссионных измерений. Спектры люминесценции сняты на спектрофлуориметре «Элюмин» отечественного производства под углом 90° при возбуждении люминесценции светом с длиной волны 300 нм. Проточный денситометр для одновременного контроля электропроводности и поглощения элюатов при жидкостной хроматографии — отечественного производства. ВЭЖХ проводили на хроматографе ХЖ 1304 с колонками (4,6 × 250 мм, 5 мкм) Servachrom Si 100: polyol RP18 (Serva) и Lichrosorb RP18 (Molnar, ФРГ) и Separon Six C18 (3,2 × 300 мм, 5 мкм, СССР).

В работе использованы DEAE-целлюлоза, высокополимерная ДНК из эритроцитов цыплят, dGMP и AMP (Reanal), сефадекс G-10 (Pharmacia); GMP, dCMP и TMP (НИКТИ БАВ, Бердск), тиотэф (отечественное производство), NH₄НСO₃ получен по способу [7].

Жидкостную хроматографию проводили на колонке (36 × 2,3 см) с DEAE-целлюлозой в HCO₃⁻-форме. Элюцию осуществляли водой, затем градиентом концентрации NH₄НСO₃ (смеситель — 200 мл воды, резервуар — 200 мл 0,2 М NH₄НСO₃, рН 8) и 0,5 М NH₄НСO₃ с рН 8,0. Скорость элюции 1,5 мл/мин. Фракции нейтрализовали и упаривали при 40° С/20 мм рт. ст. до объема ~ 1 мл. Для очистки и обессоливания их рехроматографировали либо на колонке (36 × 1,6 см) с сефадексом G-10 с элюцией водой, либо на обратно-фазовой колонке, указанной выше (элюент — 5 или 10% водный ацетонитрил, см. таблицу).

Реакция нуклеотидов с тиотэфом. Раствор 0,28 ммоль динатриевой соли нуклеотида и 0,28 ммоль тиотэфа растворяли в 2,8 мл воды, добавив 3 М HCl доводили рН до 6,0—6,1 и инкубировали 2 ч при 37° С; рН в конце инкубации 6,15—6,25. Если использовали нуклеотид в виде свободной кислоты, то 0,28 ммоль нуклеотида растворяли в 2,8 мл воды, добавлением 3 М NaOH доводили рН до 6,1, прибавляли тиотэф и инкубировали при 37° С. После окончания инкубации экстрагировали бензолом (3 × 2 мл) и упаривали до объема 1—1,5 мл при 40° С/20 мм рт. ст. Объем доводили водой до 2,8 мл и хроматографировали на DEAE-целлюлозе.

Реакция нуклеотидов с этиленимином. 0,1 ммоль нуклеотида и 1,0 ммоль этиленимина растворяли в 4 мл воды, рН смеси доводили 3 М HCl до 6,0—6,1, инкубировали 2 ч при 37° С (рН в конце инкубации 6,2—6,3), упаривали на ротаторном испарителе при 40° С/20 мм рт. ст. до объема 1—2 мл и остаток фракционировали на DEAE-целлюлозе.

Гидролиз соединений (IIa)–(IIb), (IIIa), (IVa) и (IVb) соляной кислотой. Фракции, содержащие ~ 0,4 ммоль очищенного соединения, упаривали в вакууме досуха, растворяли в 2 мл 0,1 или 1 М НСl, выдерживали 1 ч при 100° С, нейтрализовали и выделяли продукт гидролиза гель-фильтрацией на сефадексе G-10. Идентичность продукта гидролиза с основанием-свидетелем устанавливали параллельной ТСХ на силуфоле в системах пропанол — конц. NH₃ (3:2 по объему) и ацетонитрил—этилацетат—изопропанол—*n*-бутанол—конц. NH₃ (40 : 30 : 20 : 10 : 30 по объему).

Стабильность эфиров нуклеотидов. 5,0 — 10 ОЕ соединения (IIд), (IVa) или (IVb) растворяли в 1—2 мл 0,1 М НСl (или в воде, или в 0,1 М NaOH), выдерживали определенное время при желаемой температуре, после чего раствор при необходимости нейтрализовали и анализировали методом ВЭЖХ.

Модификация ДНК тиотэфом. К 3 мл раствора ДНК (0,64 мг/мл) в буфере (0,15 м NaCl и 0,015 М цитрат натрия) добавляли 22,7 мг тиотэфа, растворенного в том же буфере. Молярное отношение тиотэф — Р_{ДНК} в полученном растворе 20 : 1. Смесь выдерживали 4 ч при 37° С, после чего снимали спектры люминесценции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Серебряный А. М., Андреевский Г. В., Беккер А. Р., Сибельдина Л. А., Шоволоцкая М. И. // Биоорг. химия. 1986. Т. 12. № 4. С. 499—506.
2. Tomasz M. // Biochim. et biophys. acta. 1970. V. 213. № 3. P. 288—295.
3. Singer B. // Progr. in Nucl. Acids Res. and Mol. Biol. V. 15./Ed. Cohn W. E. N. Y.: Acad. Press, 1975. P. 219—280.
4. Суздуб Л. Ф., Шелковский В. С., Косевич М. В., Пятигорская Т. Л., Жилкова О. Ю. // Докл. АН СССР. 1985. Т. 283. № 3. С. 714—716.
5. Hemtinki K. // Chem.-Biol. Inter. 1984. V. 48. № 3. P. 249—260.
6. Hemtinki K. // Carcinogenesis. 1980. V. 1. № 4. P. 311—316.
7. Карякин Ю. В., Ангелов И. И. Чистые химические реактивы. М.: ГНТИ хим. лит-ры, 1955. С. 54—55.

Поступила в редакцию

21.VII.1986

После доработки

2.X.1986

THE STRUCTURE OF THE PRODUCTS OF NUCLEOTIDES AND DNA MODIFICATION BY ETHYLENIMINE AND THIO-TEPA

SEREBRYANYI A. M., ANDRIEVSKY G. V., BECKER A. R.,
SIBELDINA L. A., SHAROVA O. L.

Institute of Chemical Physics, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Previously undescribed products of dGMP, GMP, AMP, dCMP and TMP amino-ethylation by ethylenimine and N,N',N''-triethylenethiophosphoamide (thio-TEPA) have been obtained and shown to be aminoethyl esters of nucleotides with the free or substituted amino group. In case of dGMP and GMP ethylenimine and thio-TEPA alkylate not only phosphate but also the base residue at the N7 position. The 7-aminoethyl derivatives of dGMP and GMP, which thio-TEPA afforded, were characterized whereas the corresponding ethylenimine derivatives are decomposed under alkaline conditions in the course of the isolation. Possible reasons of extreme instability of these compounds are given. For the first time the ability of thio-TEPA to alkylate DNA at position 7 of guanine residue is shown by means of the luminescence method.