



УДК 577.113(4+7)

МОДИФИКАЦИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ  
В СТАБИЛИЗИРОВАННЫХ КОМПЛЕМЕНТАРНЫХ КОМПЛЕКСАХII \*. ЭФФЕКТИВНОСТЬ И ПОЗИЦИОННАЯ НАПРАВЛЕННОСТЬ  
АЛКИЛИРОВАНИЯ ДОДЕКАДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДА  
d (pA-A-C-C-T-G-T-T-T-G-G-C)  
4-(N-2-ХЛОРЭТИЛ-N-МЕТИЛАМИНО)БЕНЗИЛДЕНОВЫМ  
ПРОИЗВОДНЫМ КОМПЛЕМЕНТАРНОГО ГЕПТАНУКЛЕОТИДА  
d(pC-C-A-A-A-C)-A, СОДЕРЖАЩИМ НА 5'-КОНЦЕ ЦЕПИ ОСТАТОК  
N-(2-ОКСИЭТИЛ)ФЕНАЗИНИИ*Зарытова В.Ф., Кутявин И.В., Подылиногин М.А.,  
Сильников В.Н., Шинкин Г.В.**Новосибирский институт биоорганической химии Сибирского  
отделения Академии наук СССР*

Исследована реакция модификации додекадезоксирибонуклеотида pA-A-C-C-T-G-T-T-T-G-G-C (I) 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензилденовым производным гептануклеотида - pC-C-A-A-A-C-gA >CHRCI (II) и аналогичным реагентом - Phn-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH-pC-C-A-A-A-C-gA >CHRCI (III), содержащим дополнительно на 5'-конце цепи остаток N-(2-оксиэтил)феназиния (Phn). Показано, что наличие в структуре комплементарного комплекса остатка Phn практически не влияет на позиционную направленность алкилирования, которое в случае реагента (II) (не менее чем на 90%) и в случае (III) (не менее 80%) протекает по 5'-концевому фосфату додекануклеотида (I). Стабилизация комплекса олигонуклеотид (мишень) - модифицирующий реагент ковалентно присоединенным красителем приводит к значительному повышению эффективности и скорости реакции алкилирования додекануклеотида.

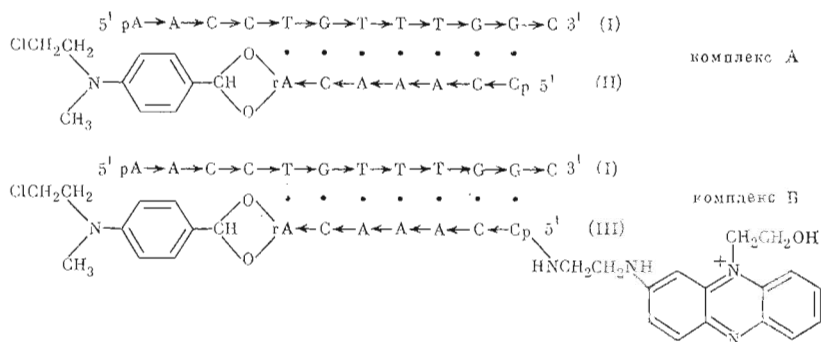
Метод адресованной модификации [2], основанный на внутрикомплексной реакции полинуклеотида и реакционноспособного производного олигонуклеотида, открывает перспективы избирательного воздействия на НК живых организмов [3, 4] и их направленного фрагментирования [5, 6]. В связи с этим особую актуальность приобретают исследования по повышению стабильности комплементарных комплексов НК, так как от их прочности зависит возможность снижения концентраций используемых олигонуклеотидных реагентов, а следовательно, и понижение общего уровня неадресованной модификации биополимеров, который в опытах по направленному воздействию на НК в клетках достаточно высок [4].

Один из подходов к стабилизации комплементарных комплексов НК основывается на использовании олигонуклеотидов, несущих остатки интеркалирующих красителей -- производных акридина [7, 8] или фенаинтридина [9]. В предыдущем сообщении [1] нами было показано, что эффект стабилизации комплексов НК достигается и при присоединении к 5'-концевому фосфату олигонуклеотида остатка четвертичной соли феназина. Впервые были получены реакционноспособные производные олигонуклеотидов, содержащие в своем составе одновременно алкилирующую 4-(N-метиламино-N-2-хлорэтил)бензилденовую группу и остаток N-(2-оксиэтил)феназиния.

В настоящей работе с целью изучения влияния поллароматических систем на эффективность и позиционную направленность при комплементарно адресованной модификации на примере додекадезоксирибонуклеотида pA-A-C-C-T-G-T-T-T-G-G-C (I) и комплементарных его 3'-концевой

\* Сообщение I см. [1]. Сокращения: символ d в аббревиатуре дезоксирибонуклеотидов опущен, gA - рибоаденозин, >CHRCI - 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензилденовый остаток, Phn - остаток N-(2-оксиэтил)феназиния, НК - нуклеиновые кислоты.

последовательности гептануклеотидных алкилирующих производных (II) и (III) (схема) осуществлена модификация нуклеиновых кислот в стабилизированных комплементарных комплексах.



5'-<sup>32</sup>P-Меченый додекануклеотид (I) выдерживали в условиях образования комплементарного комплекса в присутствии алкилирующих соединений (II) и (III) и за ходом реакции модификации следили по данным электрофореза (рис. 1). Продукты реакции алкилирования додекануклеотида (I) — аддукты А' и Б' — имеют меньшую электрофоретическую подвижность, чем исходный додекануклеотид, и могут быть, таким образом, зарегистрированы и выделены из реакционной смеси.

На радиоавтографе геля (рис. 1) видно, что и А'- и Б'-аддукты представляют собой смесь продуктов. В случае А' регистрируются два пятна, на которые соответственно приходится 80% (нижнее пятно, фракция Н) и 20% (верхнее пятно, фракция В) радиоактивности. При модификации нуклеотида (I) алкилирующим производным (III) наряду с основным пятном (фракция Н) обнаруживаются три минорных (фракция В), на на которые приходится 17% радиоактивности аддукта Б'. Отметим, что бензилиденовая связь весьма кислотолабильна, что приводит к ее заметному гидролизу даже при pH 7. <sup>32</sup>P-Меченые продукты расщепления по диоксолаповому циклу аддуктов А' и Б' имеют одинаковую электрофоретическую подвижность (рис. 1). В небольших количествах (менее 5% общей радиоактивности смесей) они всегда присутствуют при анализе продуктов реакций (I)+(II) и (I)+(III). В случае проведения мягкой кислотной обработки (0,4 М водный ацетат натрия, pH 4,0; 37° С, 1 ч [10]) в указанных реакционных смесях электрофорезом регистрируется только пятно модифицированного додекануклеотида (IV).

Несмотря на несколько меньший суммарный отрицательный заряд и большую молекулярную массу, аддукт Б' более подвижен при электрофорезе, чем соответствующие продукты реакции (I)+(II). Одной из причин, лежащих в основе указанных различий, может быть несовпадающая для комплексов А и Б позиционная направленность алкилирования. Поэтому первым этапом настоящей работы явилось установление структуры продуктов реакции модификации додекануклеотида (I) реагентами (II) и (III). Основные продукты алкилирования (фракции Н) отделяли от минорных (фракции В), и в дальнейшем полученные фракции сшитых комплексов исследовались отдельно.

По аналогии с данными, полученными при модификации додекануклеотида (I) нонапуклеотидным алкилирующим производным T-G-C-C-A-A-A-C-gA > CH<sub>2</sub>Cl [11], можно было ожидать, что для реагентов (II) и (III) алкилирование будет проходить преимущественно по остаткам аденинов олигонуклеотидной мишени (I). Однако оказалось, что содержание продуктов модификации, лабильных к обработке пиперидином (расщепление цепи по алкилированным пуринам [12]), а также гидразипом и пиперидином (расщепление по N<sup>3</sup>-алкилцитидинам [13]), в выделенных фракциях Н аддуктов А' и Б' не превышает 5–10%. Аналогичные результаты были получены в случае трех других додекануклеотидов pB-B-C-C-T-G-T-T-T-G-G-C (где В = G, C или T), исследованных ранее



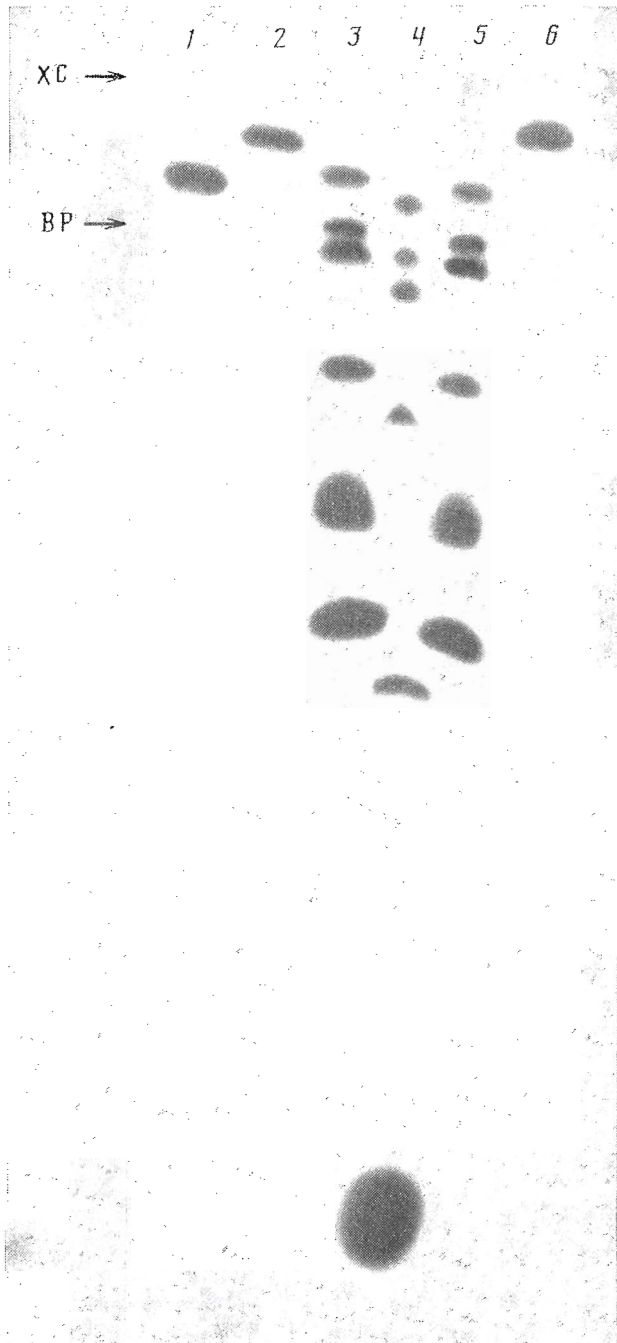


Рис. 2. Результаты электрофоретического анализа  $^{32}\text{P}$ -меченых продуктов разрушения препаратов фракций Н аддуктов А' и Б' (основных продуктов модификации нуклеотида (1), см. рис. 1) действием 2% дифенил-амина в 66% муравьиной кислоте: 1 — додекануклеотид (1); 2 и 6 — фракции Н аддуктов Б' и А' соответственно; 3 и 5 — продукты кислотной разрушения фракций Н, Б' и А' соответственно; 4 — продукты частичной апуринизации додекануклеотида (1)

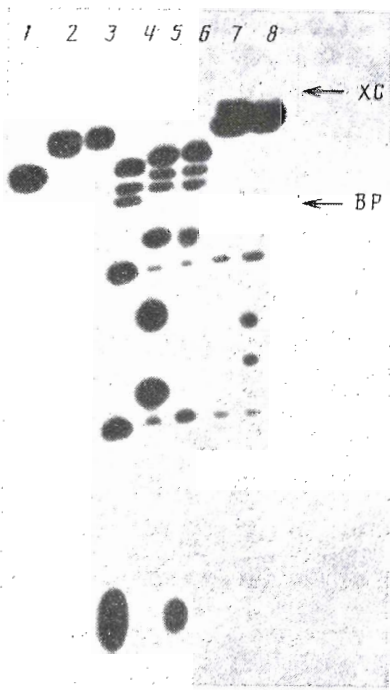


Рис. 3

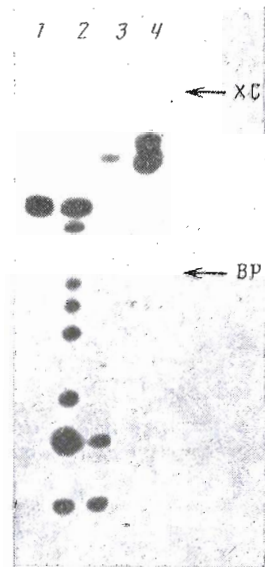


Рис. 4

Рис. 3. Анализ минорных продуктов модификации (I) — фракций В (рис. 1) аддуктов А' и Б' (аналогично рис. 2): 1 — додекануклеотид (I); 2 и 3 — фракции В аддуктов А' и Б' соответственно; 4 — продукты частичной апуринизации додекануклеотида (I); 5 и 6 — продукты кислотной деструкции А' и Б' (фракции В) соответственно; 7 и 8 — аддукты А' и Б' (фракции В) соответственно после обработки пиперидином

Рис. 4. Результаты электрофоретического анализа устойчивости препаратов фракций H и В аддукта Б' в условиях реакции расщепления олигонуклеотидной цепи по остаткам алкилированных цитидинов: 1 — додекануклеотид (I); 2 — продукты статистического расщепления (I) по остаткам цитидинов; 3 и 4 — препараты аддукта Б' (фракции В и H соответственно) после обработки гидразином и пиперидином

[11, 14]. Основным продуктом алкилирования (не менее 80%) реагентами (II) и (III) этих трех олигонуклеотидных мишеней также был устойчив к обработкам гидразином и пиперидином.

Другим высококонулеофильным центром в выступающем тетра-нуклеотидном фрагменте рВ-В-С-С-..., общим для всех четырех исследованных мишеней, является 5'-концевая фосфатная группа. Преимущественное алкилирование ее в НК реагентами, содержащими остаток 2-хлорэтиламина, отмечалось ранее в ряде работ [15—17]. Как следует из анализа представленных ниже данных по частичной кислотной деструкции основных продуктов модификации в комплексах А и Б (рис. 2), алкилированию в обоих случаях также подвергается концевая фосфатная группа додекануклеотида (I).

В использованных нами условиях деградации (2% дифениламин в 66% водной  $\text{HOONH}$ , 37° С, 30—45 мин [18]) наряду с частичным расщеплением олигонуклеотида-мишени по остаткам пуринов происходит количественное разрушение бензильденовой связи. Поэтому при анализе реакционных смесей электрофорезом регистрируется додекануклеотид с ковалентно присоединенной алкилирующей группой (IV) и соответствующие продукты его расщепления по остаткам пуринов нуклеотидной цепи (рис. 2). Бартина кислотной деструкции модифицированного додекануклеотида (IV) совпадает для аддуктов А' и Б'; кроме того, она схожа с картиной частичной апуринизации немодифицированного додекануклеотида (I). Различие заключается в том, что продукты расщепления модифицированной мишени имеют меньшую электрофоретическую подвижность, чем соответствующие им фрагменты деструкции немодифи-

цированного додекануклеотида, причем разница в подвижности соответствующих продуктов увеличивается с уменьшением длины фрагментов цепи. Данная ситуация возможна лишь в случае, когда алкилирующий остаток ковалентно присоединен к 5'-концевому фосфату мишени (I). Если бы в заметной степени модификации подвергались какие-либо другие нуклеофильные центры додекануклеотида (как это оказалось при анализе фракции В аддукта Б', см. далее), в дорожках 3 и 5 (рис. 2) появились бы полосы, идентичные продуктам деструкции исходного додекануклеотида (I).

При алкилировании реагентами типа (II) протяженных фрагментов ДНК модификации подвергаются гетероциклические основания [5, 6]. Возможно, что в случае алкилирования додекануклеотида (I) на позиционную направленность модификации влияет электростатическое взаимодействие между отрицательно заряженной концевой фосфатной группой (заряд  $-2$  при рН 7,4) и образующимся на первой стадии реакции азиридиниевым катионом.

Различия в позиционной направленности алкилирования реагентами (II) и (III) были обнаружены при анализе минорных продуктов модификации додекануклеотида (I). Исследование устойчивости препаратов аддуктов А' и Б' в выделенных фракциях В (см. рис. 1) при обработках гидразином и пиперидином, а также дифениламином в водной муравьиной кислоте позволило сделать следующие выводы о структуре продуктов модификации нуклеотида (I), содержащихся в этих фракциях.

В случае реагента (II) минорный компонент спитого комплекса, так же как и основной, является продуктом алкилирования по 5'-концевому фосфату додекануклеотида (I). На это указывают данные электрофоретического анализа продуктов его кислотной деструкции: картины расщепления цепи по пуринам для фракции Н (рис. 2, 5) и В (рис. 3, 5) в основном совпадают. Обработка фракции В аддукта А' пиперидином (рис. 3, 7) указывает на присутствие в данной фракции продуктов модификации олигонуклеотида (I) по остаткам пуринов: отчетливо регистрируется алкилирование по второму и шестому основанию додекануклеотида с 5'-конца цепи. Продукты модификации по указанным выше положениям обнаруживаются и при кислотной деструкции (рис. 3, 5), однако содержание их в выделенной фракции В аддукта А' не превышает 5%.

В случае же реагента (III) в препарате фракции В в основном (не менее 80%) содержатся продукты алкилирования додекануклеотида по остаткам цитозинов во фрагменте рА-А-С-С-Т-.... Об этом свидетельствует лабильность выделенного препарата аддукта Б' при обработке гидразином и пиперидином (рис. 4, 3), а также данные кислотной деструкции последнего (рис. 3, 6), указывающие на то, что олигонуклеотидная цепь мишени (I) алкилируется преимущественно между вторым и шестым нуклеотидами от 5'-конца цепи по фрагменту ...-С-С-Т-.... Обработка препарата пиперидином (рис. 3, 8) указывает на присутствие во фракции В аддукта Б' продуктов модификации по остаткам пуринов (менее 20%). Алкилированный по основаниям цитозинов додекануклеотид в условиях этой химической обработки практически стабилен. Поэтому для расщепления модифицированной олигонуклеотидной цепи по остаткам N<sup>3</sup>-алкилцитидинов (см. рис. 4, 3) проводили предварительную обработку гидразином по методике [13].

Как уже отмечалось в предыдущем сообщении [1], использованные в работе реакционноспособные олигонуклеотидные производные представляют собой смесь двух диастереомеров по диоксолановому циклу алкилирующего остатка. Обнаружение алкилирования концевого фосфата для комплекса А в виде двух продуктов, имеющих различную электрофоретическую подвижность (рис. 1), обусловлено, вероятно, наличием изомеров в модифицирующем реагенте, которые, по предварительно полученным данным, с различной эффективностью модифицируют додекануклеотид (I). Результаты исследования внутрикомплексного алкилирования (I) индивидуальными диастереомерами реагента (II) будут представлены в отдельном сообщении.

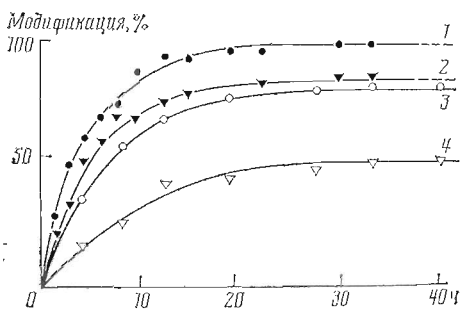


Рис. 5

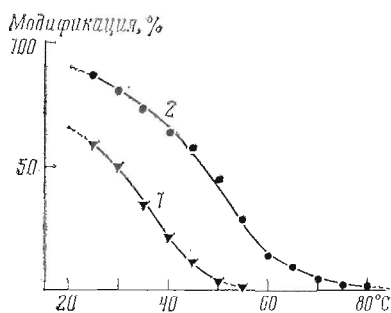


Рис. 6

Рис. 5. Кинетические кривые алкилирования додекануклеотида (I) реагентами (II) (2 и 4) и (III) (1 и 3) при 30° С. Для кривых 1 и 2 концентрации компонентов реакционной смеси как на рис. 1; для 3 и 4: додекануклеотид —  $1 \cdot 10^{-5}$  М, реагенты —  $2 \cdot 10^{-5}$  М

Рис. 6. Кривые зависимости предельной степени модификации от температурного режима реакции при алкилировании додекануклеотида (I) реагентами (II) (1) и (III) (2). Концентрация (1)  $1 \cdot 10^{-5}$  М, реагентов —  $2 \cdot 10^{-5}$  М

Суммируя изложенные выше данные по позиционной направленности алкилирования в комплексах А и Б, можно сделать следующие выводы. Преимущественному внутрикомплексному алкилированию реагентами (II) (не менее 90%) и (III) (не менее 80%) подвергается 5'-концевой фосфатный остаток додекануклеотида (I). В случае реакционноспособного производного (III) регистрируется также алкилирование остатков цитозинов (~13%) во фрагменте рА-А-С-С-Т-... . Продукты модификации по остаткам пуринов мишени (I) также были обнаружены, однако содержание их в аддуктах А' и Б' не превышало 5–10%.

Следующим этапом настоящей работы явилось исследование и сравнение эффективности реакции модификации комплементарной мишени (I) реагентами (II) и (III). Результаты накопления продуктов модификации додекануклеотида в реакциях (I)+(II) и (I)+(III) во времени представлены на рис. 5. Из хода кинетических кривых видно, что скорость и предельная степень алкилирования модифицирующим производным (III) (кривые 1 и 3) выше, чем в случае реагента (II) (кривые 2, 4), не содержащего в своей структуре остаток N-(2-оксиптил)феназилия. Трудно представить, что введение на 5'-конец цепи олигонуклеотида остатка красителя существенно повлияло на реакционную способность 2-хлорэтиламиногруппы, расположенной на 3'-конце. Данные кинетики модификации матрицы (I) указывают не на повышение, а даже на незначительное понижение наблюдаемой в опытах константы ионизации С—Сл-связи при 30° С в случае реагента (III) ( $(2,08 \pm 0,1) \cdot 10^{-5}$  с<sup>-1</sup>) по сравнению с реагентом (II) ( $(2,86 \pm 0,1) \cdot 10^{-5}$  с<sup>-1</sup>). Следовательно, повышение скорости и предельной степени алкилирования обеспечено не изменениями в реакции образования активной промежуточной частицы — азиридинового катиона, а повышением в реакционной смеси концентрации комплекса Б, содержащего в отличие от комплекса А ковалентно присоединенный к 5'-концу цепи олигонуклеотидного реагента стабилизирующий остаток четвертичной соли феназина.

Более высокая предельная степень модификации в случае феназиниевого производного указывает на повышение эффективности нового реагента (III), причем, как следует из рис. 6, значительное повышение эффективности последнего по сравнению с реагентом (II) сохраняется в широком диапазоне температур. Как уже отмечалось, эффективность модификации в первую очередь определяется стабильностью комплексов А и Б в выбранных условиях, поэтому кривые зависимости предельной степени модификации додекануклеотида (I) реагентами (II) и (III) от температурного режима реакции имеют характерный S-образный вид и косвенно отражают процесс термической денатурации комплексов А и Б.

Ранее нами было показано [1], что введение на 5'-конец гептануклеотида рС-С-А-А-А-С-гА через этилендиаминовый мостик остатка N-(2-оксиэтил)феназия повышает температуру плавления комплекса с олигонуклеотидом (I) на 19° С. Интервал смещения кривой 2 относительно кривой 1 (рис. 6) на 18–20° С, отражающий стабилизацию комплекса для реагента (III), хорошо коррелирует с этой величиной.

Стабилизирующим вторичную структуру эффектом ковалентно присоединенного красителя можно также объяснить более высокую электрофоретическую подвижность аддукта B' по сравнению с A' (рис. 1). Аддукт, содержащий остаток Phn, по-видимому, менее подвержен денатурации и в условиях электрофореза (20% ПААГ, 8 М мочевины, ~40° С) и представляет собой поэтому пространственно более компактную структуру. Степень же компактности биополимеров — один из наиболее существенных факторов, определяющих их электрофоретическую подвижность в гелях. Поэтому, например, дестабилизация комплекса B', вызванная лабильностью ковалентно присоединенного остатка красителя в условиях ряда щелочных обработок [19], приводит к появлению продуктов, имеющих меньшую подвижность при электрофорезе (рис. 4, А).

Таким образом, наличие стабилизирующего остатка в комплексе B, с одной стороны, повышает скорость и предельную степень модификации исследуемой мишени при определенной температуре, а с другой — делает возможным повышение температурного режима реакции более чем на 15° С, что значительно сокращает время реакции при использовании алкилирующих реагентов данного класса. Не менее важное следствие эффекта стабилизации заключается в возможности снижения концентрации алкилирующего производного, что при работе *in vivo* должно привести к снижению общего уровня неадресованной модификации биополимеров.

Результаты частой работы противоречат данным, полученным ранее при исследовании модификации мишени (I) нонануклеотидным алкилирующим производным T-G-C-C-A-A-A-C-gA > CHRCI [11]. Возможно, это связано с различием в способах выделения алкилирующих реагентов, химических подходах и методах исследования продуктов реакций модификации, так как при использовании перечисленных в данной работе химических обработок и экспериментальных методик воспроизвести ранее полученные результаты не удалось.

### Экспериментальная часть

Синтез и основные характеристики использованных в работе олигонуклеотидов и их алкилирующих производных описаны ранее [1, II, 14].

<sup>32</sup>P-Меченые олигонуклеотиды получали по методике [20], используя [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]АТФ (3000 Ки/ммоль) отечественного производства, T4-полинуклеотидкиназу (КФ 2.7.1.78) и АДФ.

Модификацию додекануклеотидной мишени (I) реакционноспособными производными (II) или (III) проводили в 0,2 М NaCl, 0,01 М трис-НСl, рН 7,4 (рис. 1, 5, 6). Время полупревращения реагента в активную промежуточную частицу для определенной температуры рассчитывали по данным работы [21]. Предельную степень модификации определяли после инкубации реакционной смеси более пяти периодов полупревращения реагента. Константы ионизации связи С-Cl в реагентах (II) и (III) при модификации додекануклеотида (I) рассчитывали, исходя из общего кинетического уравнения реакции модификации [22], используя данные кинетики алкилирования (рис. 5, 1 и 2).

Реакционные смеси подвергали электрофорезу в 20% ПААГ (8 М мочевины; 0,05 М трис-борат (рН 8,5), 1 мМ EDTA; ~40° С; рис. 1–4). После радиоавтографии геля на пленку РМ-1 участки, содержащие радиоактивный материал, вырезали и измеряли их радиоактивность в толуальном сцинтилляторе, используя счетчик Mark III (Nuclear Chicago, США).

Расщепление цепи модифицированного додекануклеотида по остаткам алкилированных пуринов проводили при 95–100° С 10% водным раствором пиперидина в течение 30–40 мин [12], по N<sup>3</sup>-алкилцитозинам — обработкой модифицированной мишени смесью гидразин-гидрат-диоксан-вода, 2:1:1 (по объему) в течение 1,5–2 ч при 0° С с последующей обработкой пиперидином, как описано в работе [13]. Продукты статистического расщепления цепи по пуринам получали, обрабатывая олигонуклеотид 30–45 мин 2% раствором дифениламина в 66% водной муравьиной кислоте при 37° С [18]. Для получения продуктов частичной деструкции олигонуклеотидной цепи по остаткам пиримидинов применяли последовательно обработку гидразин-гидратом (37° С, 30–40 мин), а затем пиперидином при 95–100° С в течение 30–40 мин [12]. По завершении указанных процедур олигонуклеотидный материал



выделяли из реакционных смесей осаждением, добавляя 10–15-кратный избыток (по объему) 2% перхлората лития в ацетоне [23]. В экспериментах, приведенных на рис. 2 и 3, из-за растворимости в ацетоне коротких фрагментов деструкции модифицированного додекануклеотида (IV) процедуру осаждения не применяли – реакционные и контрольные смеси упаривали в вакууме масляного насоса досуха, растворы в формамиде и подвергали электрофорезу.

Гидролиз бензилиденевой связи в реагентах (II) и (III), а также в аддуктах А' и Б' проводили при pH 4,0 (0,1 М ацетат натрия) при 37°С в течение 1 ч [10].

Авторы благодарят Д. Г. Кнорре и О. С. Федорову за интерес к работе и помощь при обсуждении результатов, а также Н. В. Булычева за помощь, оказанную при анализе реакционных смесей электрофорезом.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Зарытова В. Ф., Кутявин И. В., Сильников В. Н., Шишкин Г. В. // Биоорганическая химия. 1986. Т. 12. № 7. С. 911–920.
2. Belikova A. M., Zarytova V. F., Grineva N. I. // Tetrahedron Lett. 1967. № 37. P. 3557–3562.
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. Иванова Е. М., Карпова Г. Г., Кнорре Д. Г., Попова В. С., Райт А. С., Стефанович Л. Е. // Молекулярная биология. 1984. Т. 18. Вып. 3. С. 613–619.
5. Бросалина Е. Б., Власов В. В., Кутявин И. В., Мамаев С. В., Плетнев А. Г., Подыминогин М. А. // Биоорганическая химия. 1986. Т. 12. № 2. С. 240–248.
6. Бросалина Е. Б., Власов В. В., Кутявин И. В., Мамаев С. В., Плетнев А. Г., Подыминогин М. А. // Докл. АН СССР. 1985. Т. 285. № 6. С. 1475–1478.
7. Asseline V., Toulme F., Thuong N. T., Delarue M., Montenay-Carestier T., Helene C. // EMBO J. 1984. V. 3. № 4. P. 795–800.
8. Asseline V., Delarue M., Laucelot G., Toulme F., Thuong N. T., Montenay-Carestier T., Helene C. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. № 11. P. 3297–3301.
9. Letsinger R., Schott M. E. // J. Amer. Chem. Soc. 1981. V. 103. № 24. P. 7394–7396.
10. Власов В. В., Гринева Н. И., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г. // Молекулярная биология. 1970. Т. 4. Вып. 2. С. 201–204.
11. 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.
12. Mazam A. M., Gilbert W. // Meth. Enzymol. 1980. V. 65. P. 499–560.
13. Kirkegaard K., Bus H., Spassky A., Wang J. C. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1983. V. 80. № 9. P. 2544–2548.
14. Горн В. В., Карпова Г. Г., Кнорре Д. Г., Кутявин И. В., Пичко Н. П. // Биоорганическая химия. 1982. Т. 8. № 9. С. 1225–1233.
15. Власов В. В., Гринева Н. И., Карпова Г. Г. // Молекулярная биология. 1974. Т. 8. Вып. 5. С. 752–761.
16. Grachev M. A., Rivkin M. I. // Nucl. Acids Res. 1975. V. 2. № 8. P. 1237–1260.
17. Ошевский С. И., Грачев М. А., Мустаев А. А. // Биоорганическая химия. 1983. Т. 9. № 7. С. 958–965.
18. Коробко Д. Г., Грачев С. А. // Биоорганическая химия. 1977. Т. 3. № 10. С. 1420–1422.
19. McIlwain H. // J. Chem. Soc. 1937. № 6. P. 1704–1708.
20. Berkner K. L., Folk W. R. // J. Biol. Chem. 1977. V. 252. № 10. P. 3176–3184.
21. Власов В. В., Гринева Н. И., Кнорре Д. Г. // Изв. СО АН СССР. Сер. хим. наук. 1969. Вып. 1. С. 104–109.
22. Кнорре Д. Г., Чилигова Т. А. // Молекулярная биология. 1978. Т. 12. № 4. С. 814–821.
23. Барам Г. И., Грачев С. А. // Биоорганическая химия. 1985. Т. 11. № 10. С. 1420–1422.

Поступила в редакцию 11.VIII.1986

После доработки 9.I.1987

#### MODIFICATION OF NUCLEIC ACIDS IN STABILIZED COMPLEMENTARY COMPLEXES. II. EFFICIENCY AND DIRECTION OF ALKYLATION OF DODECADEOXYRIBONUCLEOTIDE d(pA-A-C-C-T-G-T-T-G-G-C) WITH 4-(N-2-CHLOROETHYL-N-METHYLAMINO)BENZYLIDENE DERIVATIVE OF COMPLEMENTARY HEPTANUCLEOTIDE d(pC-C-A-A-A-C)-A BEARING A N-(2-HYDROXYETHYL) PHENAZINIUM RESIDUE AT ITS 5'-TERMINUS

ZARYTOVA V. F., KUTYAVIN I. V., PODYMINOGIN M. A., SILNIKOV V. N., SHISHKIN G. V.

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

Modification of dodecadeoxyribonucleotide d(pA-A-C-C-T-G-T-T-G-G-C) (I) with a heptanucleotide 4-(N-2-chloroethyl-N-methylamino)benzylidene (RCI) derivative d(pC-C-A-A-A-C)ARCI (II) and with similar reagent (III) bearing an additional 5'-terminal N-(2-hydroxyethyl)phenazinium residue (Phn) has been investigated. Both reagents (II) and (III) alkylated dodecanucleotide (I) mainly at the 5'-terminal phosphate, Phn residue not affecting specificity of the alkylation. Stabilization of the complementary complex target oligonucleotide – oligonucleotide derivative by the Phn group resulted in substantial increase of efficiency and rate of the intracomplex alkylation of the dodecanucleotide.