



УДК 577.113.4

АЛКИЛИРОВАНИЕ ДНК ГАЛОГЕНАЦЕТИЛЬНЫМИ  
ПРОИЗВОДНЫМИ АМИНОКИСЛОТ

Волошин О. Н., Монастырская Г. С., Свердлов Е. Д.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва

Как известно, при алкилировании двухцепочечных ДНК помимо фосфатных групп модифицируются N7-положения пуринов, выходящие в большую бороздку дуплекса, и N3-положения аденинов в малой бороздке [1]. Модификация по N7 дает возможность расщепить полинуклеотидную цепь по прореагировавшим звеньям обработкой пиперидином, поскольку алкилирование по N7 ослабляет N-гликозидную связь в пуриновых нуклеотидах. Алкилирующие агенты с объемными заместителями в углеводородной цепи можно использовать как для дискриминирования одно- и двухцепочечных участков в ДНК [2], так и для исследования степени экспонированности имидазольного кольца пуринов в большую бороздку двойной спирали [3].

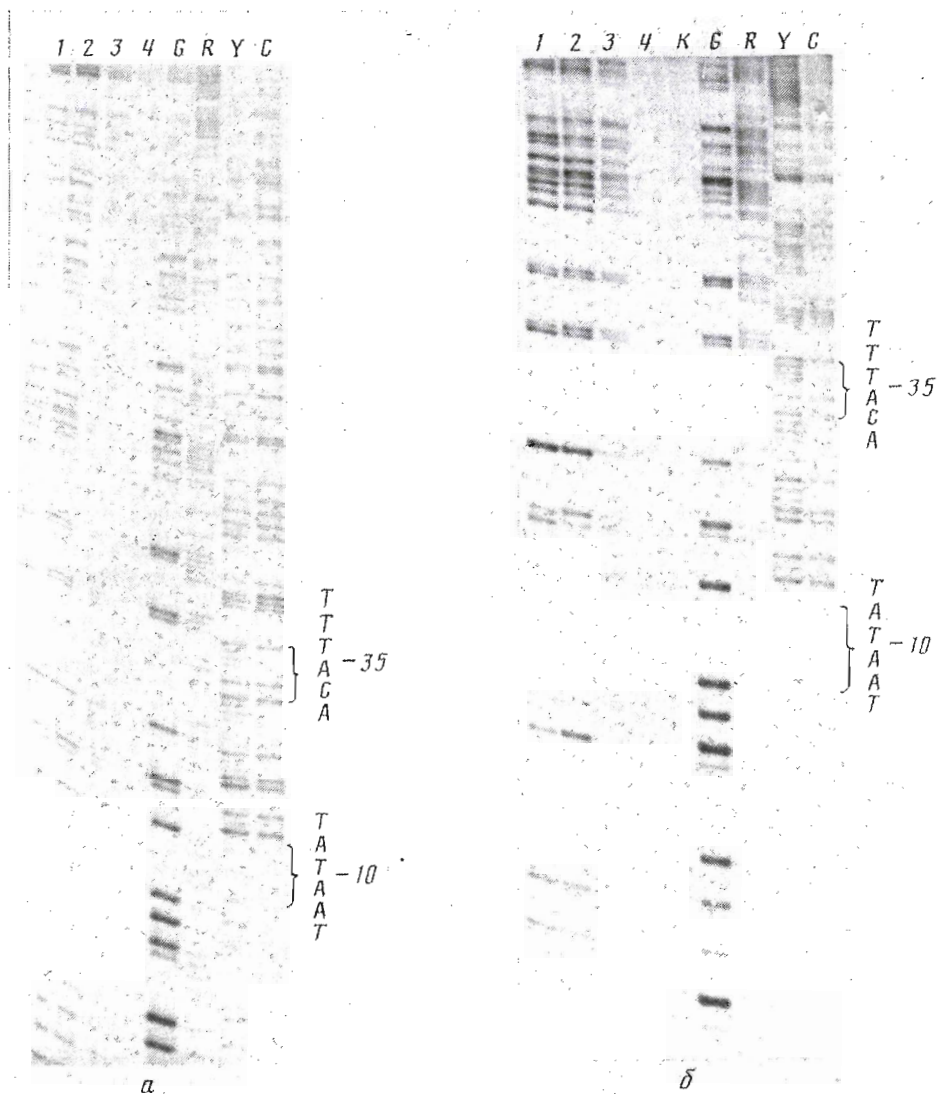
С этой целью нами были синтезированы четыре алкилирующих агента: N-хлорацетилглицин, N-бромацетилглицин, N-бромацетил-L-серин и N-бромацетилэтанолламин. Различная стерическая доступность этих молекул для атаки нуклеофилами может влиять на их способность проникать в бороздку дуплекса и вступать в химическую реакцию.

Введение именно остатков аминокислот, а не других заместителей в состав алкилирующих агентов продиктовано следующими обстоятельствами. В работе [4] Хендри с соавторами на основе компьютерного анализа показали, что между боковым радикалом аминокислоты и полостью, образованной кодирующим ее триплетом нуклеотидов с удаленным средним основанием и комплементарным антикодоном, существует стерическое соответствие. Эти авторы предположили, что такое соответствие могло играть роль в процессе безрибосомного синтеза белка на ранних этапах эволюции [5]. Была выдвинута также гипотеза, согласно которой специфическое белково-нуклеиновое взаимодействие может осуществляться путем связывания аминокислот белковой молекулы и кодирующих их триплетов в составе дуплексных молекул ДНК [6]. Структурное соответствие аминокислоты и кодирующего ее кодона с удаленным средним основанием было продемонстрировано экспериментально. В работе [7] показано, что L-лизин специфически связывается с частично апуринизированным дуплексом poly(A)·poly(U). В связи с этим было интересно проверить, не будут ли места преимущественной модификации при алкилировании двухцепочечных ДНК соответствовать кодирующим триплетам для аминокислоты, входящей в состав алкилирующего агента.

На рисунке представлены результаты модификации одно- и двухцепочечного фрагментов, содержащих *lac* UV5-промотор *E. coli*. В отличие от азотистых ипритов, таких, как N,N,N'-три(β-хлорэтил)-N'-(*n*-формилфенил)пропилендиамин [2], наши агенты алкилируют одно- и двухцепочечную ДНК с примерно одинаковой скоростью, что свидетельствует о возможности их проникновения в большую бороздку дуплекса.

Бромпроизводные являются более эффективными алкилирующими агентами, чем хлорпроизводное, которое реагирует с очень низкой скоростью.

Скорость алкилирования гуанинов по N7 выше, чем аденинов. Реагенты, содержащие глицин, модифицируют однопольные основания с оди-



Авторадиограмма структурного геля. Модификация  $^{32}\text{P}$ -меченных по 3'-концу одно- (а) и двухцепочечного (б) фрагментов, содержащих нематричную цепь *lac* UV5-промотора, N-хлорацетилглицином (4), N-бромацетилглицином (3), N-бромацетил-L-серином (2) и N-бромацетилэтаноламином (1). К — контрольный эксперимент, в котором ДНК инкубировали в условиях химической реакции, но без добавления алкилирующих агентов. Модификацию проводили в 100 мМ трис·НСl, рН 8,0, с 1 мМ EDTA 3 ч при 25° С. Концентрация реагентов в реакционной смеси 0,5 М. После расщепления пиперидином продукты химической деградации разделяли в 10% полиакриламидном геле, содержащем 7 М мочевины. G, R, Y и C — расщепление по гуанинам, пуринам, пиримидинам и цитозинам соответственно по методу Максама — Гилберта [11] с модификациями [12]. Последовательности, соответствующие областям -10 и -35, указаны справа от авто-радиограмм

наковой скоростью на протяжении всей длины использованных нами фрагментов. При алкилировании производными серина и этаноламина однотопные основания в различных положениях полинуклеотидной цепи реагируют с различной скоростью. Особенно ярко это выражено в случае модификации двухцепочечного фрагмента N-бромацетил-L-серином. Однако места преимущественной модификации не локализуются в функционально важных участках промоторной последовательности, как это имеет место при модификации *lac* UV5-промотора боргидридом натрия [8], перекисью водорода [9] и четырехокисью осмия [10].

Не удалось также связать места предпочтительной модификации с последовательностями, содержащими кодирующие серин триплеты. Та-

ким образом, наши эксперименты не подтвердили гипотезу о возможности специфического взаимодействия между аминокислотой и кодирующим ее триплетом.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Singer B. // *Progr. Nucl. Acids Res. Mol. Biol.* 1975. V. 15. P. 219—284.
2. Мазин А. В., Кузьминов А. В., Дианов Г. Л., Салганик Р. И. // *Биоорганик. химия.* 1985. Т. 11. № 12. С. 1690—1692.
3. Mattes W. B., Hartley J. A., Kohn K. W. // *Nucl. Acids Res.* 1986. V. 14. № 7. P. 2971—2987.
4. Hendry L. B., Bramsone E. D., Hutson M. S., Campbell L. K. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1981. V. 78. № 12. P. 7440—7444.
5. Hendry L. B., Bramsone E. D., Petersheim M. // *Origin of Life.* 1981. V. 11. № 2. P. 203—220.
6. Пермогоров В. И., Карнов А. В. // *Молекулярн. биология.* 1984. Т. 18. № 3. С. 676—680.
7. Отрошенко В. А., Шведова Т. А., Васильева Н. В., Стригунова Т. Ф. // *Докл. АН СССР.* 1987. Т. 294. № 1. С. 241—244.
8. Свердлов Е. Д., Калинина Н. Ф. // *Биоорганик. химия.* 1984. Т. 10. № 3. С. 418—421.
9. Свердлов Е. Д., Калинина Н. Ф. // *Докл. АН СССР.* 1984. Т. 274. № 6. С. 1508—1510.
10. Свердлов Е. Д., Волошин О. Н., Кушко Я. Г., Карнов А. В., Монастырская Г. С. // *Докл. АН СССР.* 1987. Т. 297. № 1. С. 225—228.
11. Maxam A., Gilbert W. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1977. V. 74. № 2. P. 560—564.
12. Ouchinnikov Yu. A., Guryev S. O., Krayev A. S., Monastyrskaya G. S., Skryabin K. G., Sverdlov E. D., Zakhar'ev V. M., Bayev A. A. // *Gene.* 1979. V. 6. № 3. P. 235—249.

Поступило в редакцию  
1. III. 1988.

#### DNA ALKYLATION BY HALOGENOACETYL DERIVATIVES OF AMINO ACIDS

VOLOSHIN O. N., MONASTYRSKAYA G. S., SVERDLOV E. D.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,  
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

Four alkylating agents (N-chloroacetyl-glycine, N-bromoacetyl-glycine, N-bromoacetyl-serine, and N-bromoacetyl-L-ethanolamine) were synthesized and their ability to alkylate N7 of purines in ds and ss fragments of DNA, containing the *E. coli lac UV5* promoter, was studied. Modification assay showed that: i) ss and ds DNA fragments are modified with the similar efficiency; ii) guanine residues are alkylated at a higher rate than adenine ones; iii) glycine-containing reagents modify bases of the same type with equal rate; iv) in the case of ethanolamine and serine derivatives, bases of the same type differently located in polynucleotide chain react with different rates; however, we did not succeed in finding a correlation between the sites of preferential modification and sequences containing serine-coding triplets.

Технический редактор А. В. Рудницкая

Сдано в набор 20.04.88 Подписано к печати 09.06.88 Т-01909 Формат бумаги 70×108<sup>1/16</sup>  
Высокая печать Усл. печ. л. 11,2 Усл. кр.-отг. 10,5 тыс. Уч.-изд. л. 13,2 Бум. л. 4,0  
Тираж 917 экз. Зак. 1532

Ордена Трудового Красного Знамени издательство «Наука»,  
103717 ГСП, Москва, К-62, Подсосенский пер., 21  
2-я типография издательства «Наука», 121099, Москва, Г-99, Шубинский пер., 6