



УДК 547.963.32.057 : 577.113.6

© 1991 г.

*В. Ф. Зарытова, П. И. Комарова, А. С. Левина,
С. Г. Лохов, Д. Р. Табатадзе, Л. М. Халимская *,
Л. А. Александрова ***

СИНТЕЗ ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ МОДИФИЦИРОВАННЫЙ ПО С-5 ДЕЗОКСИУРИДИН С АЛИФАТИЧЕСКОЙ АМИНОГРУППОЙ

Новосибирский институт биоорганической химии СО АН СССР;

** Новосибирский государственный университет;*

*** Институт молекулярной биологии АН СССР, Москва*

Получены гексануклеотиды, содержащие алифатическую аминогруппу в 5-м положении дезоксиуридина — $d(U^R T C C C A)$ и $d(T U^R C C C A)$, где $R = CH_2NH_2$ и $CH_2NHCOCH_2CH_2NH_2$. К аминогруппе в составе олигонуклеотидов присоединены остатки N-(2-гидроксиэтил)феназиния (Phn); измерены температуры плавления комплементарных дуплексов, образованных Phn-содержащими гексануклеотидами. Показано, что длина спейсера существенно влияет на стабильность образующихся комплексов.

Производные олигонуклеотидов, содержащие различные метки или реакционноспособные группы, широко используются для решения различных задач молекулярной биологии. Модифицирующие группировки, как правило, присоединяют к NH_2 - или SH -группам, предварительно введенным в олигонуклеотиды. Для этого чаще всего проводят модификацию концевых фосфатных групп олигонуклеотидов.

В последнее время появляются работы, в которых описываются производные олигонуклеотидов, содержащие модифицирующие группы в гетероциклическом основании одного из нуклеозидов [1—4]. Такие производные при условии, что модификация не затрагивает групп, участвующих в комплексобразовании, могут быть использованы для воздействий на комплементарные участки нуклеиновых кислот. Олигонуклеотиды с модификацией в гетероциклах имеют ряд преимуществ: модифицирующие группировки могут быть введены в любое место олигонуклеотидной цепи (или в несколько мест); модифицирующая группа оказывается пространственно приближенной к комплементарной цепи и в силу этого, вполне вероятно, может оказывать на нее (или на дуплекс в целом) более сильное воздействие; если в качестве модифицирующей используется реакционноспособная группа, то можно ожидать более точного локального воздействия на противоположную цепь. Так, в работе [2] показано, что ионоацетамидная группа, введенная в 5-е положение остатка дезоксиуридина, находящегося в середине олигонуклеотида, расщепляет комплементарную олигонуклеотидную цепь в строго определенной точке. В работах [3, 4] описаны производные олигонуклеотидов, содержащие в гетероциклических основаниях флуоресцентные группы, остаток биотина, метки, содержащие комплексы с рутением. Исследовалось влияние введенных группировок на термодинамические и оптические свойства модифицированных олигонуклеотидов.

Описаны различные методы модификации гетероциклических оснований нуклеотидов с целью введения в них алифатической аминогруппы.

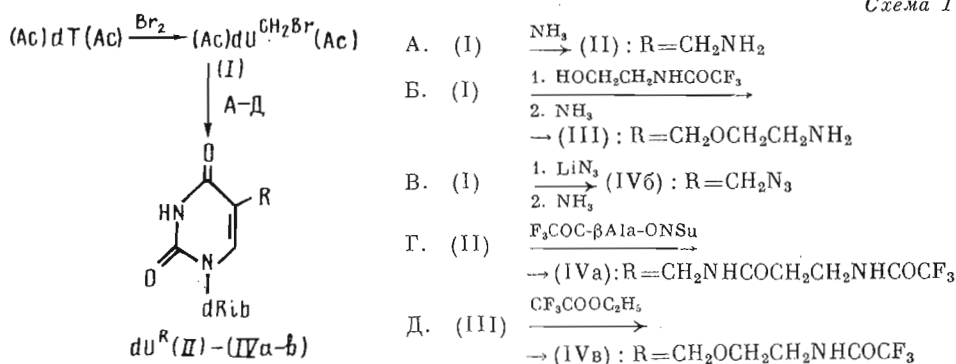
Сокращения: DMT — даметокситрил, βAla — β -аланин, Phn — остаток N-(2-гидроксиэтил)феназиния, dU^R — 5-R-дезоксиуридин, ONSu — сукцинимидооксид, ФДЭ — фосфодиэстераза.

Одним из распространенных методов является использование палладиевых катализаторов для присоединения аминокислотных алкенов или алкинов к гетероциклическим основаниям [1—5].

В настоящей работе описывается метод получения олигонуклеотидов, содержащих дезоксиуридин с алифатической аминогруппой в 5-м положении. Были получены производные дезоксиуридина с различными спейсерами (схема 1). Бромированием 3',5'-О-диацетилтимина получали защищенный 5-бромметилдезоксиуридин (I) [6], который является исходным соединением для получения производных (IVa—в).

Обработка аммиаком соединения (I) приводит к образованию 5-аминометилдезоксиуридина (II), который при взаимодействии с $\text{CF}_3\text{CO}-\beta\text{Ala}-\text{ONSu}$ дает соединения (IVa). При реакции соединения (I) с азидом лития или натрия после деблокирования образуется 5-азидометилдезоксиуридин (IVб). Использование N-защищенного аминокэтанола для взаимодействия с бромпроизводным (I) приводит в результате указанных в схеме 1 реакций к соединению (IVв).

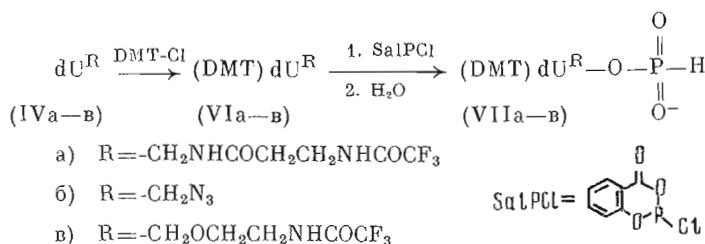
Схема 1



Структура полученных соединений подтверждена с помощью ИК- и ПМР-спектров. В ПМР-спектрах соединений (IVa,в) наряду с сигналами протонов дезоксиуридина присутствуют сигналы CH_2 - и NH -групп (табл. 1). В ПМР-спектре соединения (IVб) наблюдается смещение сигналов протонов 5- CH_2 -группы в слабое поле по сравнению с протонами 5- CH_3 -группы (табл. 1), что свидетельствует о замещении протона азидогруппой. В ИК-спектре этого соединения имеется полоса (2130 см^{-1}), соответствующая валентным колебаниям азидогруппы.

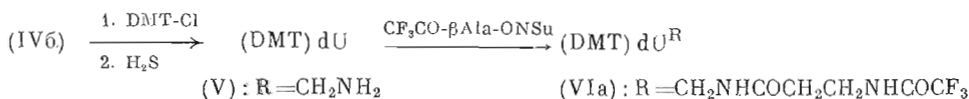
Из полученных соединений (IVa—в) были синтезированы Н-фосфонатные мономеры для олигонуклеотидного синтеза по стандартной схеме [7] (схема 2).

Схема 2

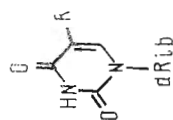


Соединение (VIa) можно получать также другим способом, исходя из 5-азидометилдезоксиуридина (IVб) (схема 3), применяя H_2S для восстановления N_3 - до NH_2 -группы.

Схема 3



С использованием полученных синтонов (VIIa, б) наряду со стандартными

Данные ПМР-спектров соединений (δ , м.д. (J, Гц))

R	NH(3) уш. с.	NH(e) уш. с.	NH(d) уш. с.	H6 с	H1' т	H3' м	H4' м	H5' м	H2' м	CH ₂ (CH ₃) (a)	CH ₂ (b)	CH ₂ (c)
CH ₃ (D ₂ O)				7,65	6,25	4,46	4,02	3,82	2,37	1,87с		
CH ₂ N ₃ (D ₂ O)				8,00	6,25	4,46	4,05	3,82	2,40	2,40с		
^a CH ₂ OCH ₂ ^b CH ₂ ^c NHCOCF ₃ ^d *	13,07		10,37	8,39	6,74	4,85	4,32	4,04	2,54	4,22д (5)	3,57м	
CH ₂ OCH ₂ CH ₂ NHCOCF ₃ **			10,29	8,26	6,59	4,80	4,25	3,99	2,45	4,25с	3,60с	
^a CH ₂ ^e NHCOCCH ₂ ^c CH ₂ ^d NH* COCF ₃	13,16	9,24	10,59	8,45	6,86	4,89	4,39	4,08	2,53	4,30д (5)	2,77т (7)	3,81м
CH ₂ NHCOCCH ₂ CH ₂ NH** COCF ₃		9,07	10,38	8,22	6,64	4,82	4,32	4,02	2,47	4,21с	2,76т (7)	3,75т (7)
CH ₂ NHCOCCH ₂ CH ₂ NH ₂ **		9,00		8,36	6,80	4,82	4,30	4,00	2,53	4,30с	2,53т (7)	3,06т (7)

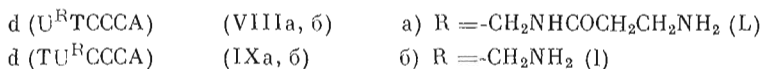
* Спектр записан в пиридине-d₅.** Спектр записан в смеси пиридина-d₅ и D₂O.

Молярные соотношения нуклеотидов по данным ОФХ гидролизатов олигонуклеотидов (ФДЭ и 5'-нуклеотидаза из яда кобры)

Дезоксиолиго- нуклеотид	Номер соединения	dUR	d(TUR)	dT	dC	dA	dUR + dC
U ^L TCCCA	VIIIb	0,8	—	1	2,6	1	—
TU ^L CCCA	IXb	—	0,9	—	3,0	1	—
U ^L TCCCA	VIIIa	—	—	1	—	0,9	3,8
TU ^L CCCA	IXa	—	1,1	—	2,4	1	—
U ^{LPhn} TCCCA	Xb	1	—	1,1	2,9	1,2	—
U ^{LPhn} TCCCA	Xa	1	—	1,3	2,8	1,2	—
TU ^{LPhn} CCCA	XIa	—	1,1	0,3	2,7	1,5	—

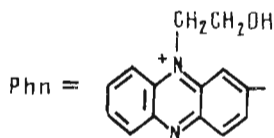
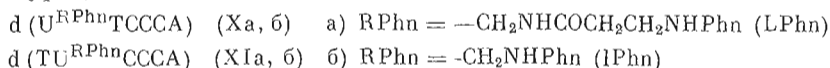
Примечания: условия гидролиза и хроматографии описаны в работе [8]; R = L, I, LPhn, IPhn (см. текст).

Н-фосфонатными мономерами на синтезаторе «Виктория-6М» [8] были синтезированы гексануклеотиды, содержащие модифицированный дезокси-уридин:



Строение продуктов было подтверждено ферментативным гидролизом с помощью фосфодиэстеразы (ФДЭ) и 5'-нуклеотидазы из яда кобры [8]. Показано, что гексануклеотиды (VIIIa, б) гидролизуются до мономеров, а в случае гексануклеотидов (IXa, б) образуется димер d(TU^R) наряду с нуклеозидами dC и dA. Количественные данные результатов гидролиза приведены в табл. 2.

Наличие аминогруппы в олигонуклеотидах позволяет присоединять к ним самые разнообразные группировки. Ранее было показано, что остаток N-(2-гидроксиэтил)феназиния, присоединенный к концевому фосфату олигонуклеотида, стабилизирует соответствующие комплементарные дуплексы [9]. В настоящей работе были получены Phn-содержащие гексануклеотиды с коротким (I) и длинным (L) спейсером между 5-м положением дезоксиуридина и остатком Phn:



В электронных спектрах полученных соединений (Xa, б) и (XIa, б) наблюдается поглощение при 237, 268, 290 (плечо), 400 и 530 нм в соответствии с литературными данными [9].

Были исследованы комплексообразующие свойства соединений (Xa, б) и (XIa, б). Полученные результаты представлены в табл. 3.

Таблица 3

Температура плавления комплексов d(TGAATGGGAACA)·Z

Z	Т. пл., °C	Z	Т. пл., °C
d(TTCCCA)	16	(PhnNHCH ₂ CH ₂ NH)-pd(TTCCCA)	34
d(U ^{LPhn} TCCCA) (Xb)	18	d(U ^{LPhn} TCCCA) (Xa)	25
d(TU ^{LPhn} CCCA) (XIb)	<3	d(TU ^{LPhn} CCCA) (XIa)	22

Примечание. Концентрация олигонуклеотидов 2·10⁻⁶ М в буфере 0,16 М NaCl, 0,02 М Na₂HPO₄, 0,1 мМ EDTA, рН 7,4.

Из сравнения данных табл. 3 видно, что влияние остатка феназиния на температуру плавления исследуемого дуплекса в значительной степени зависит от его положения в составе олигонуклеотида. Максимальное влияние остаток Phn оказывает при присоединении к концевому фосфату (Δ т. пл. = 18°C). В случае, когда остаток Phn находится в гетероциклическом основании первого с 5'-конца нуклеозида, температура плавления увеличивается на 9°C при длинном спейсере и лишь на 2°C при коротком; если же остаток присоединен ко второму с 5'-конца нуклеозиду, то в случае длинного спейсера Δ т. пл. = 6°C , а в случае короткого — образование дуплекса вообще не зарегистрировано.

Можно предположить, что остаток Phn, присоединенный к гетероциклическому основанию нуклеозида, выводит его из стэкинга, причем зона деформации дуплекса расширяется, если модифицирован внутренний (второй с 5'-конца) нуклеозид; особенно эта деформация заметна при коротком спейсере, т. е. при более жесткой связи между феназием и С-5 дезоксиуридина. С другой стороны, остаток Phn за счет сильных взаимодействий с соседними комплементарными парами или за счет электростатических взаимодействий остатка Phn (несущего положительный заряд) с фосфатными группами может компенсировать потерю прочности дуплекса; компенсация происходит в большей степени в случае более длинного, т. е. более гибкого, спейсера.

Таким образом, из полученных данных следует, что длина спейсера существенно влияет на стабильность дуплексов, образованных Phn-содержащими олигонуклеотидами. В случае длинного спейсера комплексобразующие свойства олигонуклеотида усиливаются.

В дальнейшем предполагается использование предложенного в данной работе метода получения производных олигонуклеотидов с аминогруппой в 5-м положении dU с целью введения различных меток и реакционноспособных групп. Из полученных результатов следует, что целесообразно использование достаточно гибких спейсеров с числом атомов в цепи не менее 5—6.

Экспериментальная часть

В работе использовали защищенные дезоксинуклеозиды (DMT) T, (DMT)bzA, (DMT)bzC, (DMT)ibG и DMT-Cl (Олайн, Рига); N-трифторацетил- β -аланин и гидрохлорид N-(2-гидроксиэтил)феназиния, синтезированные соответственно Т. М. Ивановой и В. Н. Сильниковым (НИБХ СО АН СССР); этиловый эфир трифторуксусной кислоты [10]; салицилхлорфосфит [7]; N-оксисукцинимидный эфир N-трифторацетил- β -аланина, полученный по методу [11]; N-трифторацетиламиноэтанол получали перегонкой продукта реакции аминоэтанола с $\text{C}_2\text{H}_5\text{OCOCF}_3$ ($127\text{—}130^\circ\text{C}$ /10 мм рт.ст.).

Спектры ПМР записывали на спектрометрах НХ-90 и АМ-200 (Bruker, ФРГ). Электронные спектры поглощения получены на спектрофотометре Specord M-40 (Carl Zeiss, Яена, ГДР). Кривые плавления комплементарных олигонуклеотидных дуплексов записывали на установке для исследования термической денатурации в ультрамикромасштабе на базе спектрофотометра «Обь-4» (НИБХ СО АН СССР) [12].

Для ТСХ использовали пластинки Kieselgel 60 (Merck, ФРГ), для гелевой фильтрации — сефадекс LH-20 (Pharmacia, Швеция).

Синтез 3'-Н-фосфонатов защищенных нуклеозидов и их производных проводили как описано в работе [7]. Диметокситритильные производные получали по реакции соединений (IVa—в) с DMT-Cl (1,5 экв. в абс. пиридине, 1 ч, 25°C). Синтез олигонуклеотидов проводили на синтезаторе «Виктория-6М» Н-фосфонатным методом [8].

Для получения гексануклеотидов (VIIIb) и (IXb) олигонуклеотиды, содержащие 5-азидометилдезоксирин, растворяли в смеси пиридин — вода (1 : 1) и пропускали через раствор H_2S (1 ч, 25°C); раствор упаривали и продукты (VIIIb) и (IXb) выделяли обращенно-фазовой хроматографией (смола Nucleosil 10C 18, градиент концентрации ацетонитрила (0—20%) в 0,05 М LiClO_4 , хроматограф Altex, США).

Phn-содержащие олигонуклеотиды получали как описано в работе [9].

Ферментативный гидролиз модифицированных олигонуклеотидов проводили с помощью ФДЭ и 5'-нуклеотидазы из яда кобры и гидролизат анализировали как описано в работе [8]. При гидролизе гексануклеотидов $d(U^R\text{CCCCA})$ (VIIIa, б) и (Xa, б) образуется смесь нуклеотидов dC, dT, dA и dU^R . В случае, когда $R = \text{CH}_2\text{NH}_2$ или $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$, подвижность dU^R при обращенно-фазовой хроматографии (ОФХ) больше по сравнению с dT и совпадает с подвижностью контрольных образцов. При $R = \text{CH}_2\text{Phn}$ или $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2\text{NHPhn}$ dU^R элюируются после нуклеозидов за счет повышенной гидрофобности Phn. Гидролиз олигонуклеотидов $d(\text{TU}^R\text{CCCCA})$ (IXa, б) и (XIa) дает наряду с мономерами dC и dA димеры $d(\text{TU}^R)$, имеющие меньшую подвижность, чем нуклеозиды. Спектральные данные dU^R и $d(\text{TU}^R)$ совпадают с характеристиками для dT в случае, когда R — линкер с аминокгруппой, и соответствуют суперпозиции спектров dT и Phn, когда в составе R имеется остаток Phn.

5-(3-(Трифторацетиламино)пропиониламинометил)дезоксисуридин (IVa). 5',3'-О-Диацетил-5-бромметилдезоксисуридин (I), полученный из 4 ммоль (Ac)dT(Ac) [6], упаривали до масла и растворяли в 20 мл конц. водного аммиака. После окончания реакции (30 мин, 25° С, контроль — ТСХ в системе хлороформ — этанол, 8 : 2) реакционную смесь наносили на колонку с дауэксом 50×2 (H^+ -форма), промывали водой, 30% водным этанолом и элюировали продукт — 5-аминометилдезоксисуридин (II) — 2% аммиаком в 30% этаноле. Раствор упаривали три раза с этанолом; выход 20 700 ОЕ₂₆₇ (2,16 ммоль, 54%). Соединение (II) (890 мкмоль) растворяли в 2 мл абс. DMF и добавляли $\text{CF}_3\text{CO}-\beta\text{Ala-ONSu}$ (282 мг, 1 ммоль). После окончания реакции (2 ч, 25° С, контроль — ТСХ в системе хлороформ — этанол, 8 : 2) продукт (IVa) выделяли хроматографией на силикагеле в градиенте концентрации этанола в хлороформе (0—20%). Выход соединения (IVa) 565 мкмоль (64%). ПМР-спектр (IVa) приведен в табл. 1.

5-Азидометилдезоксисуридин (IVб). К раствору бромпроизводного (I), полученного из 3 ммоль (Ac)dT(Ac), в 5 мл абс. DMF добавляли 200 мг азидата этила; после окончания реакции (16 ч, 25° С, контроль — ТСХ в системе этилацетат — гексан, 8 : 2) реакционную смесь разбавляли хлороформом (30 мл), промывали водой (2×10 мл); органический слой упаривали, добавляли конц. аммиак (10 мл) и этанол (2 мл) и оставляли на 3 ч при 25° С *, затем реакционную смесь упаривали и 5-азидометилдезоксисуридин выделяли хроматографией на силикагеле в градиенте концентраций этанола в хлороформе (0—20%). После упаривания фракции, содержащей продукт (IVб), его кристаллизовали из этанола. Выход соединения (IVб) 0,68 г (2,4 ммоль), 80% по отношению к (Ac)dT(Ac). Спектр ПМР приведен в табл. 1.

5-(3-(Трифторацетиламино)этилоксиметил)дезоксисуридин (IVв). К раствору 5',3'-О-диацетил-5-бромметилдезоксисуридина (I), полученного из 1 ммоль (Ac)dT(Ac) [6], в 5 мл DMF добавляли 0,9 мл (5,4 ммоль) N-трифторацетиламиноэтанола. После окончания реакции (18 ч, 25° С, контроль — ТСХ в системе хлороформ — этанол, 95 : 5) реакционную смесь упаривали и обрабатывали конц. водным аммиаком для удаления ацетильных защитных групп (16 ч, 25° С). Полученное соединение (III) выделяли с помощью ОФХ на хроматографе Waters (США) на колонке (30×350 мм) с Silasorb C-8 (Chemapol, ЧСФР) в градиенте концентраций этанола (0—50%) в воде. Скорость элюции 10 мл/мин. Выход производного (III) 3740 ОЕ₂₆₀ (0,4 ммоль, 40%). Соединение (III) (390 мкмоль) растворяли в 7 мл метанола и добавляли 0,6 мл (5 ммоль) этилтрифторацетата. После окончания реакции (18 ч, 25° С, контроль — ТСХ в системе хлороформ — этанол, 1 : 1) продукт выделяли хроматографией на силикагеле в градиенте концентрации этанола в хлороформе (0—30%). Выход соединения (IVв) 273 мкмоль (70%). Спектр ПМР (IVв) приведен в табл. 1.

5'-О-Диметокситритил-5-(3-(трифторацетиламино)пропиониламино-

* При длительной обработке аммиаком или при нагревании (50° С, 16 ч) происходит замещение азидо- на аминокгруппу.

метил)дезоксисуридин (VIa). 582 мг (1 ммоль) 5'-О-диметокситритил-5-азидометилдезоксисуридина, полученного из производного (IVb) с выходом 70%, растворяли в 2 мл смеси пиридин—вода—триэтиламин (15 : 5 : 1) и в реакционную смесь пропускали в течение 1 ч сероводород, полученный взаимодействием Al_2S_3 с водой. За образованием продукта следили по ТСХ в системе хлороформ—этанол, 9 : 1. Наличие аминогруппы в продукте (V) подтверждается реакцией с нингидрином. Полученное соединение (V) выделяли хроматографией на силикагеле в градиенте концентраций этанола в хлороформе от 0 до 30%. Выход соединения (V) 0,8 ммоль (80%).

К 0,72 ммоль соединения (V) в 5 мл абс. DMF добавляли 300 мг (1 ммоль) $CF_3CO-\beta-Ala-ONs$. После окончания реакции (3 ч, 25° С, контроль — ТСХ в системе хлороформ—этанол, 9 : 1) реакционную смесь хроматографировали на колонке с LH-20 (колонка 50 мл, элюент—хлороформ—этанол, 1 : 1). Выделено 0,4 ммоль (56%) соединения (VIa). Строение полученного продукта доказывали после удаления защитных групп. Диметокситритильную группу удаляли 1% CF_3COOH в абс. хлористом метиле (1 мин, 25° С) и продукт выделяли геле-фильтрацией на LH-20. После удаления трифторацетильной группы (конц. аммиак в смеси вода—этанол, 1 : 3; 1 ч, 50° С) продукт — 5-(3-аминопрописил)аминометилдезоксисуридин — выделяли хроматографией на дауэксе 50×2 в H^+ -форме и записывали ПМР-спектр (табл. 1).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Haralambidis J., Chai H., Tregear G. W. // Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. № 12. P. 4857—4876.
2. Beyer R. B., Jr., Tabone J. C., Hurst G. D., Smith T. M., Gamper H. // J. Amer. Chem. Soc. 1989. V. 111. № 22. P. 8517—8519.
3. Telser J., Cruickshank K. A., Morrison L. E., Netzel T. L. // J. Amer. Chem. Soc. 1989. V. 111. № 18. P. 6966—6976.
4. Telser J., Cruickshank K. A., Shanze K. S., Netzel T. L. // J. Amer. Chem. Soc. 1989. V. 111. № 18. P. 7221—7226.
5. Cruickshank K. A., Stockwell D. L. // Tetrahedron Lett. 1988. V. 29. № 41. P. 5221—5224.
6. Barwolff D., Langer P. // Nucleic Acid Chemistry. Part 1 / Eds Townsend L. B., Tipson R. S. New York, Chichester, Brisbane, Toronto: J. Wiley and Sons, 1978. P. 359—366.
7. Веньяминова А. Г., Комарова Н. И., Левина А. С., Репкова М. Н. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 4. С. 484—489.
8. Веньяминова А. Г., Горн В. В., Зенкова М. А., Комарова Н. И., Репкова М. Н. // Биоорган. химия. 1990. Т. 16. № 16. С. 941—950.
9. Зарытова В. Ф., Кутявин И. В., Сильников В. Н., Шишкин Г. В. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 7. С. 911—920.
10. Гудлицкий В. А. // Химия органических соединений фтора. М., 1961. Вып. 6. С. 133.
11. Anderson G. W., Zimmerman J. E., Callahan F. M. // J. Amer. Chem. Soc. 1964. V. 86. № 9. P. 1839—1842.
12. Grachev M. A., Perelroyzen M. P. // Nucl. Acids Res. 1978. V. 5. № 7. P. 2557—2564.

Поступила в редакцию
16.1.1991

V. F. ZARYTOVA, N. I. KOMAROVA, A. S. LEVINA, S. G. LOKHOV,
D. R. TABATADZE, L. M. KHALINSKAYA*, L. A. ALEXANDROVA**

THE SYNTHESIS OF OLIGONUCLEOTIDES CARRYING DEOXYURIDINE C-5-MODIFIED WITH AN ALIPHATIC AMINO GROUP

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

*Novosibirsk State University, Novosibirsk;

**Institute of Molecular Biology, Academy of the Sciences of the USSR, Moscow

A method for the synthesis of oligonucleotide derivatives carrying an aliphatic amino group at the C-5-position of deoxyuridine is described. Hexanucleotides $dU^R TCCCA$ and $TdU^R CCA$, where $R = CH_2NH_2$ or $CH_2NHC(=O)CH_2CH_2NH_2$ were prepared. The residue of N-(2-hydroxyethyl)phenazinium (Phn) was connected to the amino group of the oligonucleotides. The ability of the obtained hexanucleotides to complementary interaction was tested. It was shown that the stability of the formed duplexes depended on the spacer length.