



УДК 577.113.6.088.53:543.422.25

© 1992 г. Е. В. Биченкова, Т. В. Мальцева,
Т. В. Абрамова, А. В. Лебедев

**ВНУТРИКОМПЛЕКСНОЕ АЛКИЛИРОВАНИЕ ОКТАНУКЛЕОТИДА
pd[TGTTTGGC] 5'-[4-N-МЕТИЛ-N-(2-ХЛОРЕТИЛ)-
АМИНО]БЕНЗИЛФOSФАМИДНЫМ ПРОИЗВОДНЫМ
ГЕПТАНУКЛЕОТИДА pd[ССАААСА]. ПОЛУЧЕНИЕ
КОВАЛЕНТНОГО АДДУКТА И ИССЛЕДОВАНИЕ ЕГО
ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ В ВОДНОМ РАСТВОРЕ
МЕТОДОМ ДВУМЕРНОЙ ¹H-ЯМР-СПЕКТРОСКОПИИ**

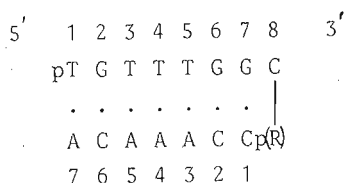
Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН

Осуществлен синтез ковалентного аддукта рTGTTTGGC-(R)рССАААСА - продукта внутрикомплексного алкилирования по N3-положению нуклеозидного звена С-8 октануклеотида-мишени рTGTTTGGC с помощью 5'-[4-N-метил-N-(2-хлорэтил)амино]бензилфосфамидного производного гептануклеотида (RCl)рССАААСА. Ковалентный аддукт имеет температуру плавления 70°С, которая не зависит от его концентрации в растворе и на 40°С выше, чем температура плавления немодифицированного дуплекса рTGTTTGGC-рССАААСА при концентрации 0,5·10⁻⁴ М. Методом 2М-¹H-ЯМР-спектроскопии проведено исследование пространственной структуры ковалентного аддукта в водном растворе. С использованием экспериментов COSY, COSY-DQF и NOESY идентифицированы сигналы протонов олигонуклеотидов и модифицирующей группировки. Конформационный анализ углеводных циклов, проведенный на основании констант спин-спинового взаимодействия для протонов H1', H2'a, H2'b и H3', показал, что фрагменты дезоксирибозы находится в 2'-*эндо*-конформации. Анализ наблюдаемых ЯЭО-взаимодействий между протонами алкилирующей группировки и протонами олигонуклеотидов позволил заключить, что остаток 5'-[4-N-метил-N-(2-хлорэтил)амино]бензиламида локализован в дуплексе в области недостающего звена гептануклеотидной цепи на расстоянии около 5 Å от нуклеозидного остатка С-1 и алкилированного цитозина С-8 противоположной цепи.

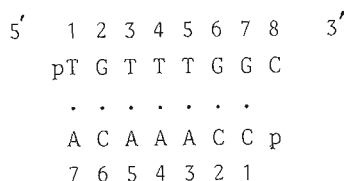
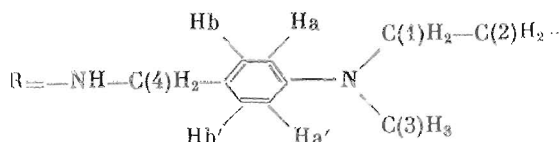
Перспективным подходом направленного воздействия на генетический аппарат клетки является комплементарно-адресованная модификация нуклеиновых кислот с помощью реакционноспособных аналогов олигонуклеотидов [1, 2]. Для модификации одноцепочечных фрагментов нуклеиновых кислот в настоящее время широко используют олигонуклеотидные реагенты — адреса, несущие в своей структуре [4-N-метил-N-(2-хлорэтил)амино]бензилфосфамидную группировку на 5'- или 3'-конце цепи [2—4]. Процесс алкилирования ароматическими 2-хлорэтиламинами протекает по двустадийному механизму, лимитирующей стадией которого является превращение N-2-хлорэтиламиногруппы в промежуточный этилениммониевый катион [2, 5, 6], который далее алкилирует нуклеиновую кислоту-мишень преимущественно по гетероциклическим основаниям. Можно полагать, что существенную роль в эффективности и позиционной направленности реакции алкилирования играет пространственная организация комплементарного комплекса адрес—мишень в растворе.

Список сокращений: 1М-ЯМР и 2М-ЯМР — одно- и двумерный ЯМР; КА — ковалентный аддукт. В обозначениях 2'-дезоксинуклеозидов префикс «d» всюду опущен.

В настоящей работе методом двумерной ^1H -ЯМР-спектроскопии проведено исследование пространственной структуры ковалентного аддукта (КА) — продукта внутрикомплексного алкилирования по N3-положению гетероциклического основания C-8 октануклеотида-мишени pTGTTTGGC (I) с помощью 5'-[4-N-метил-N-(2-хлорэтил)амино]бензилфосфамидного производного гептануклеотида (RCl)pCCAAACA (II):



КА (III)



(IV)

С использованием COSY- и NOESY-спектров проведено отнесение сигналов протонов олигонуклеотидов и бензиламидной группировки «R». Определена конформация углеводных циклов нуклеотидных звеньев. На основании ЯЭО между обближенными в пространстве протонами алкилирующей группировки и протонами олигонуклеотидов сделаны предварительные выводы о пространственной организации КА (III) в растворе.

Доказательство химической структуры ковалентного аддукта

5'- ^{32}P -Меченый октануклеотид (I) выдерживали в условиях образования комплементарного комплекса в присутствии алкилирующего производного (II). По данным электрофореза реакционной смеси видно (рис. 1, дорожка 1), что в процессе алкилирования помимо основного продукта модификации КА (III) образуются минорные продукты (аддукты X и X'), имеющие электрофоретическую подвижность меньшую, чем подвижность исходного октануклеотида (I). Количественный анализ радиоактивности соответствующих полос геля показал, что на основной продукт реакции КА (III) приходится 84% общей радиоактивности, а на минорные X и X' — по 7 и 9% соответственно.

Электрофоретический анализ продуктов химического расщепления (рис. 2) позволил определить точки модификации в основном и минорных продуктах реакции. При обработке минорных продуктов алкилирования X и X' пиперидином в условиях расщепления по алкилированным пуринам в каждом случае образуется по одному продукту расщепления (рис. 2, дорожки 6 и 8 соответственно), электрофоретическая подвижность которых указывает на то, что в реакции внутрикомплексного алкилирования частично модифицируются основания G-7 (7%) и G-6 (9%).

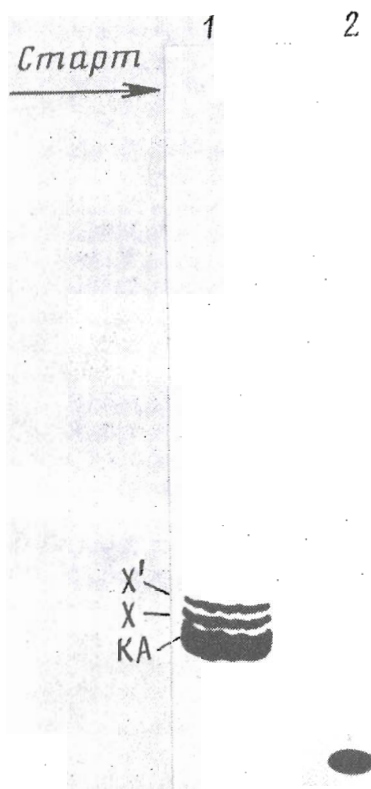


Рис. 1. Электрофорез в денатурирующих условиях в 20% полиакриламидном геле: 1 — продукты алкилирования октауклеотида (I) реагентом (II). 2 — исходный октауклеотид (I)

Основной продукт модификации КА (III) остается устойчивым при обработке пиперидином (дорожка 10). Его расщепление наблюдается лишь в условиях лабильности N3-алкилированных 2'-дезокситидинов после предварительной обработки гидразином с последующей обработкой пиперидином. В этом случае также образуется единственный продукт расщепления (рис. 2, дорожка 2), электрофоретическая подвижность которого свидетельствует о том, что модификации подвергается 3'-концевой 2'-дезокситидин C-8, не участвующий в комплементарном связывании.

Эти результаты практически совпадают с данными работы [7], полученными при модификации реагентом (II) додекауклеотида pAACCTGTTTGCC.

Отнесение сигналов протонов олигонуклеотидов

Область резонанса обменивающихся иминопротонов. На рис. 3а приведены фрагменты полученных при различных температурах ¹H-ЯМР-спектров КА (III), которые содержат область резонанса обменивающихся иминопротонов водородных связей. Ниже (рис. 3б) представлена эта же область спектра немодифицированного дуплекса (IV). Идентификация сигналов иминопротонов дуплекса (IV) была проведена ранее [8].

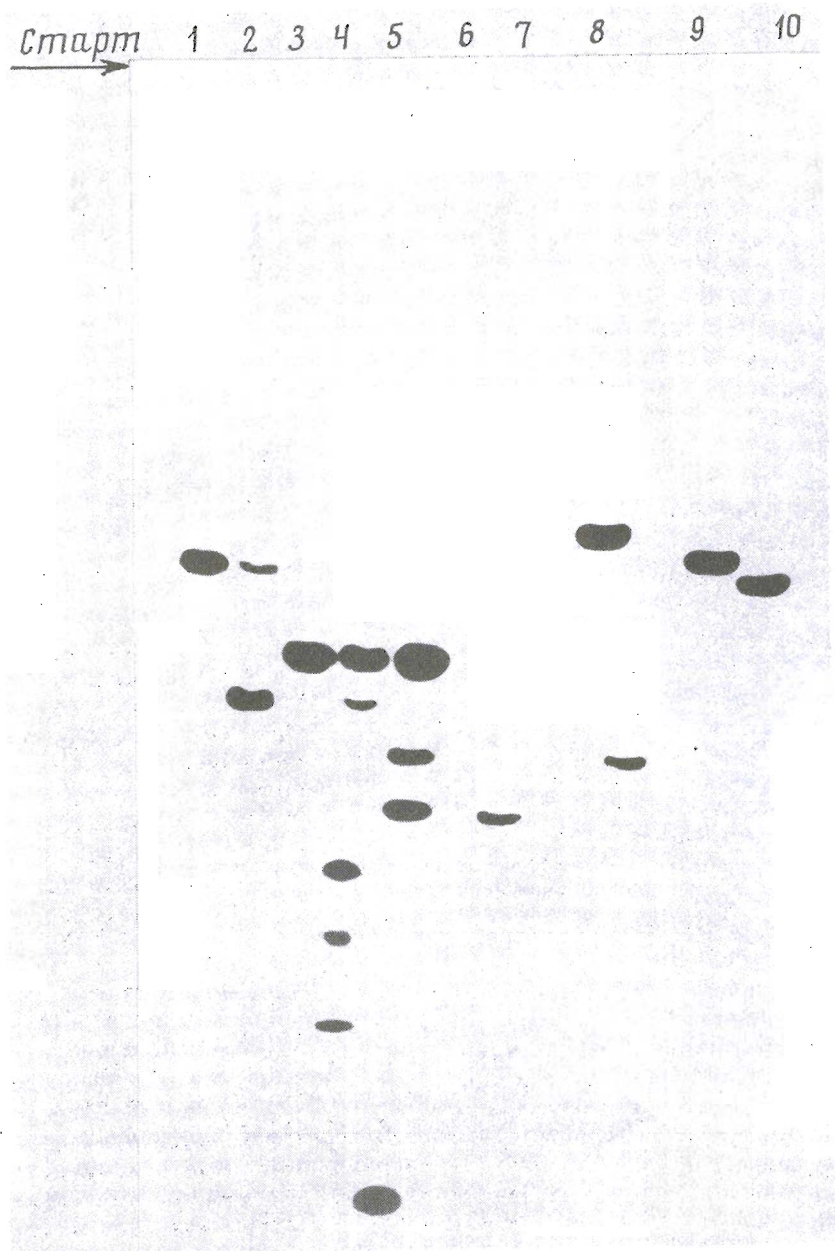


Рис. 2. Электрофорез в денатурирующих условиях в 20% полиакриламидном геле: КА (III) до (1) и после расщепления по алкилированным пиримидинам (2) и по алкилированным пуринам (10); октануклеотид (I) до (3) и после статического расщепления по остаткам пиримидинов (4) и пуринов (5); аддукты X и X' до (7 и 9 соответственно) и после (6 и 8) расщепления по алкилированным пуринам

Практически полное совпадение спектров дуплексов (III) и (IV) при 5°C позволило принять для сигналов КА (III) то же самое отнесение, что и для сигналов немодифицированного дуплекса (IV) (результаты отнесения указаны на рис. 3). Из рис. 3а видно, что при понижении температуры от 5 до -2°C в области резонанса иминопротонов G-C-пар КА (III) появляется дополнительный сигнал при 13,25 м.д. Очевидно,

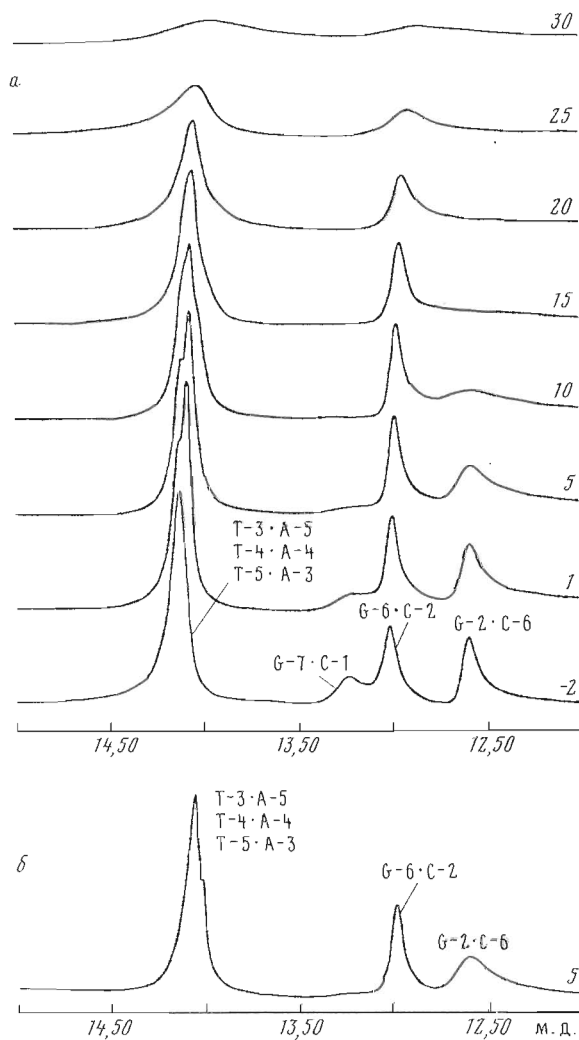


Рис. 3. Фрагменты ^1H -ЯМР-спектров КА (III) (а) и дуплекса (IV) (б), содержащие область резонанса обменивающихся аминопротонов водородных связей, записанные при различных температурах в смеси 10% D_2O и 90% H_2O . Обозначены сигналы аминопротонов пар Т-3·А-5, Т-4·А-4, Т-5·А-3, G-2·C-6, G-6·C-2, G-7·C-1

что он относится к иминопротону концевой пары оснований КА (III) G-7·C-1. В то же время сигнал иминопротона другой кольцевой пары, Т-1·А-7, в спектрах обоих дуплексов (III) и (IV) отсутствует (или сильно уширен) из-за его интенсивного обмена с протонами растворителя. Порядок уширения сигналов иминопротонов при повышении температуры (рис. 3а) подтверждает правильность их отнесения: первыми уширяются (вплоть до полного исчезновения) сигналы пар оснований, ближайших к концам спирали. Почти полное исчезновение всех сигналов иминопротонов КА (III) наблюдается уже при 30°С аналогично тому, как это происходит в случае немодифицированного дуплекса (IV) (данные не приведены), т. е. наличие ковалентной связи на конце КА (III) не препятствует интенсивному обмену протонов водородных связей дуч-

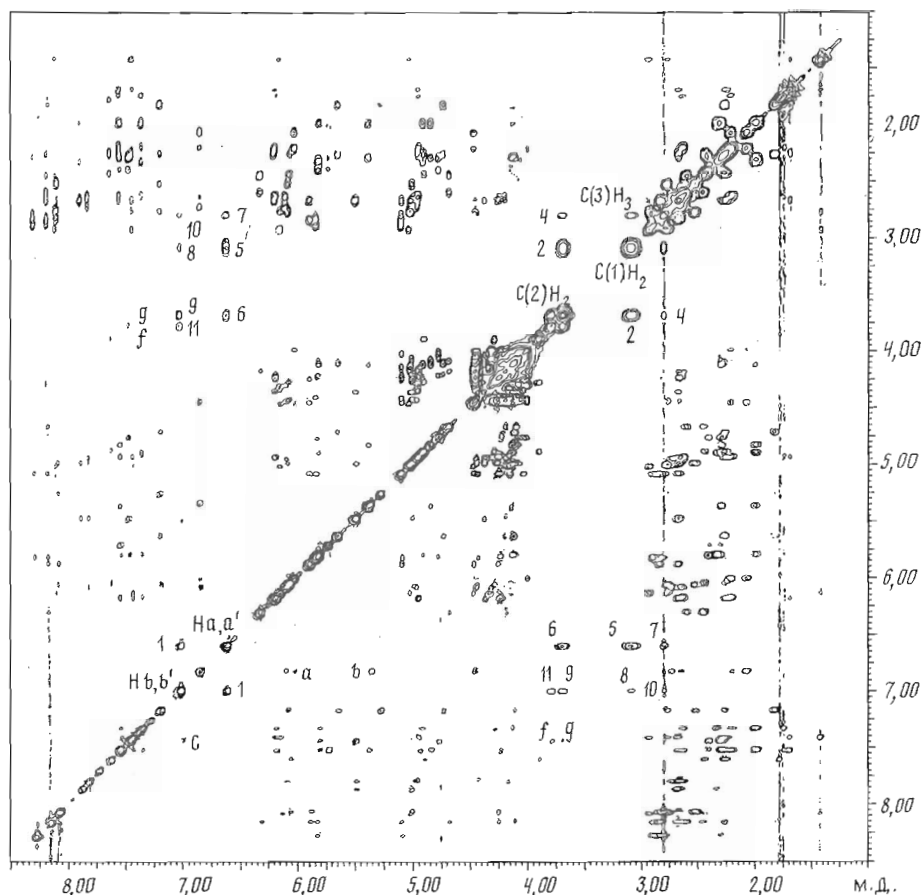


Рис. 4. ^1H -NOESY-спектр КА (111). Указаны положения диагональных сигналов протонов бензиламидного фрагмента. Кросс-пики между взаимодействующими протонами внутри бензиламидного фрагмента обозначены 1–11; кросс-пики между взаимодействующими протонами бензиламидного фрагмента и протонами нуклеозидных остатков обозначены а–г;

- 1 – $\text{Ha}/\text{Ha}' - \text{Hb}/\text{Hb}'$; 2 – $\text{C}(1)\text{H}_2 - \text{C}(2)\text{H}_2$; 3 – $\text{C}(1)\text{H}_2 - \text{C}(3)\text{H}_3$;
 4 – $\text{C}(2)\text{H}_2 - \text{C}(3)\text{H}_3$; 5 – $\text{Ha}/\text{Ha}' - \text{C}(1)\text{H}_2$; 6 – $\text{Ha}/\text{Ha}' - \text{C}(2)\text{H}_2$;
 7 – $\text{Ha}/\text{Ha}' - \text{C}(3)\text{H}_3$; 8 – $\text{Hb}/\text{Hb}' - \text{C}(1)\text{H}_2$; 9 – $\text{Hb}/\text{Hb}' - \text{C}(2)\text{H}_2$;
 10 – $\text{Hb}/\text{Hb}' - \text{C}(3)\text{H}_3$; 11 – $\text{Hb}/\text{Hb}' - \text{C}(4)\text{H}_2$; а – $\text{C}-1(\text{H}1') - \text{Hb}/\text{Hb}'$;
 б – $\text{C}-1(\text{H}5) - \text{Hb}/\text{Hb}'$; в – $\text{C}-1(\text{H}6) - \text{Hb}/\text{Hb}'$; д – $\text{C}-8(\text{H}6) - \text{Hb}/\text{Hb}'$;
 е – $\text{C}-8(\text{H}6) - \text{Ha}/\text{Ha}'$; ф – $\text{C}-1(\text{H}6) - \text{C}(2)\text{H}_2$; г – $\text{C}-1(\text{H}6) - \text{C}(4)\text{H}_2$.

лекса с растворителем в противоположность тому, что наблюдается в случае дуклекса с фенолиновым производным олигонуклеотида [8].

Отнесение сигналов необменивающихся протонов олигонуклеотидов

Отнесение проводили, используя 2М- ^1H -ЯМР-спектры. Протоны, связанные спин-спиновым взаимодействием ($\text{H}5$ и $\text{H}6$ 2'-дезокситидинов, $\text{H}6$ и CH_3 2'-дезокситимидинов, а также $\text{H}1'$, $\text{H}2'\text{a}$, $\text{H}2'\text{b}$, $\text{H}3'$ и $\text{H}4'$ углеводных циклов), объединяли в спиновые системы, используя J -корреляционный (COSY) спектр (данные не приведены). Связь между пространственно сближенными протонами устанавливали на основании анализа NOESY-спектра (рис. 4). Увеличенные фрагменты этого спектра

Значения химических сдвигов сигналов (м. д.) необменивающихся протонов ковалентного аддукта (III)

Нуклеотидный остаток	H6/H8	H5/CH ₃	H1'	H2'a	H2'b	H3'	H4'
T-1	7,60	1,80	6,12	2,28	2,46	5,03	4,15
G-2	8,09		6,16	2,80	2,95	4,80	4,13
T-3	7,43	1,42	6,19	2,27	2,70	5,05	4,40
T-4	7,54	1,70	6,19	2,30	2,65	4,90	4,14
T-5	7,34	1,77	5,80	2,02	2,34	4,90	4,15
G-6	7,87		5,51	2,69	2,69	—*	—
G-7	7,81		6,09	2,65	2,74	4,97	4,27
C-8	6,81	5,36	6,01	2,10	2,23	—	4,47
C-1	7,46	5,47	5,82	2,30	2,43	4,92	4,13
C-2	7,53	5,74	5,37	2,01	2,34	4,85	4,15
A-3	8,28		5,84	2,83	2,92	5,10	4,45
A-4	8,16		5,89	2,70	2,90	5,03	4,25
A-5	8,07		6,07	2,55	2,80	5,00	4,25
C-6	7,17	5,26	5,65	1,85	2,30	4,78	—
A-7	8,14		6,29	2,60	2,48	4,68	4,20
Бензиламидный фрагмент	Ha/Ha'	Hb/Hb'	C(1)H ₂	C(2)H ₂	C(3)H ₃	C(4)H ₂	
	6,58	6,99	3,68	3,14	2,80	3,78	

* Значение химического сдвига не определено из-за перекрывания сигналов.

приведены на рис. 5а–в. Сравнение NOESY-спектров немодифицированного дуплекса (IV) [9] и КА (III) показало, что наличие в последнем остатка бензиламида, ковалентно связанного с нуклеозидными звеньями C-1 и C-8, практически не отражается на положении и интенсивности кросс-пиков ЯЭО. Поэтому идентификацию сигналов протонов КА (III) проводили по аналогии с работой [9], используя принципы последовательного отнесения сигналов для правозакрученной ДНК [10–14]. Результаты идентификации указаны на рис. 5б, в и представлены в табл. 1.

Детальное сравнение этих данных с результатами отнесения, полученными для немодифицированного дуплекса (IV) [9], показывает, что только сигналы протонов H5 и H6 алкилированного 3'-концевого нуклеозида C-8 КА (III) существенно смещены в область сильного поля (на 0,51 и 0,90 м.д.) по сравнению с соответствующими сигналами дуплекса (IV). Вероятно, это связано с тем, что нуклеозидное звено C-8, не участвующее в комплементарном связывании в составе дуплекса (IV), при алкилировании в составе КА (III) терит свою конформационную подвижность и включается в стэкинг-взаимодействие с предыдущей парой оснований.

Отнесение сигналов бензиламидного фрагмента

Анализ COSY-спектра КА (III) (данные не приведены) позволял идентифицировать протоны спиновых систем Ha/Ha' ↔ Hb/Hb'* и C(1)H₂ ↔ C(2)H₂ через кросс-пики 1 и 2 соответственно (указаны в NOESY-спектре, рис. 4 и 5е). Далее, с использованием NOESY-спект-

* Сигналы протонов Ha и Ha', так же как и протонов Hb и Hb', совпадают по своему химическому сдвигу, что свидетельствует об их эквивалентности.

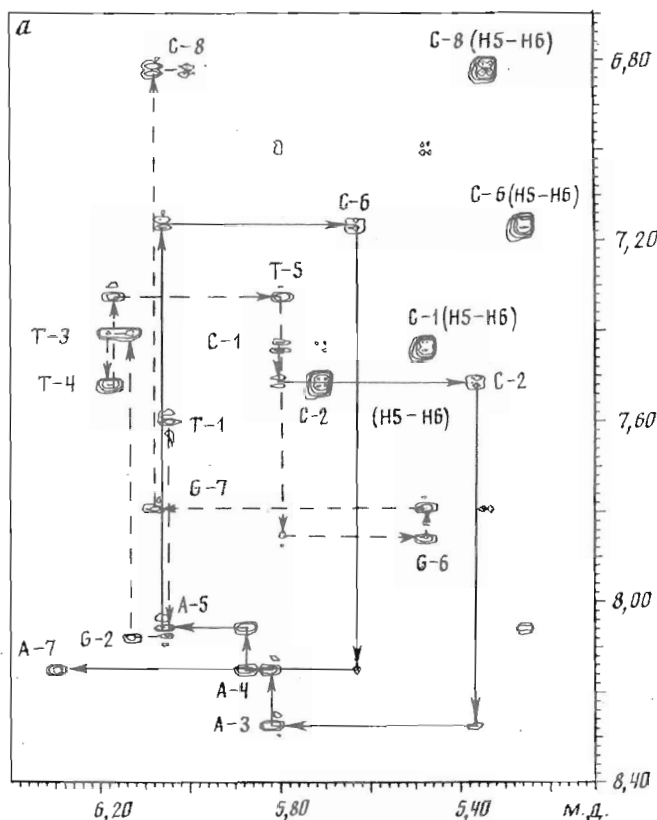
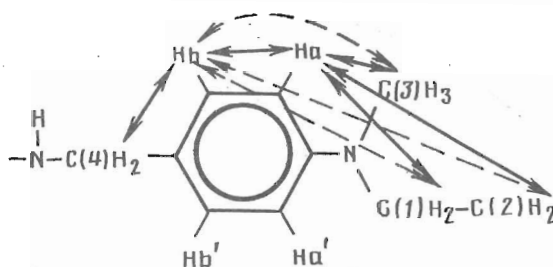


Рис. 5, а

ра, было проведено отнесение остальных сигналов протонов бензиламидного фрагмента (табл. 1) в соответствии со схемой 1.



В NOESY-спектре протоны $C(1)H_2$ и $C(2)H_2$, связанные кросс-пи-ком 2, образуют кросс-пики с протонами метильной группы $C(3)H_3$ (рис. 4, кросс-пики 3 и 4). Метиленовые протоны $C(1)H_2$ и $C(2)H_2$ различали на основании их взаимодействия с ароматическими протонами. Поскольку группы $C(1)H_2$ и $C(3)H_3$ равноудалены от ароматического кольца бензиламидного фрагмента, следует ожидать, что их взаимодей-ствие с ароматическими протонами Ha/Na' и Hb/Hb' будет примерно одинаковым. В NOESY-спектре протоны Hb/Hb' образуют кросс-пики 8—10 с протонами $C(1)H_2$, $C(2)H_2$ и $C(3)H_3$ (рис. 5а). При этом кросс-пики 8 и 10 сравнимы по интенсивности, но гораздо менее интенсивны по сравнению с кросс-пи-ком 9. Поскольку кросс-пик 10 отражает ЯЭО между $C(3)H_3$ и Hb/Hb' , можно полагать, что кросс-пик 8 соответствует взаимодействию $C(1)H_2-Hb/Hb'$. Следовательно, кросс-пик 9 относится

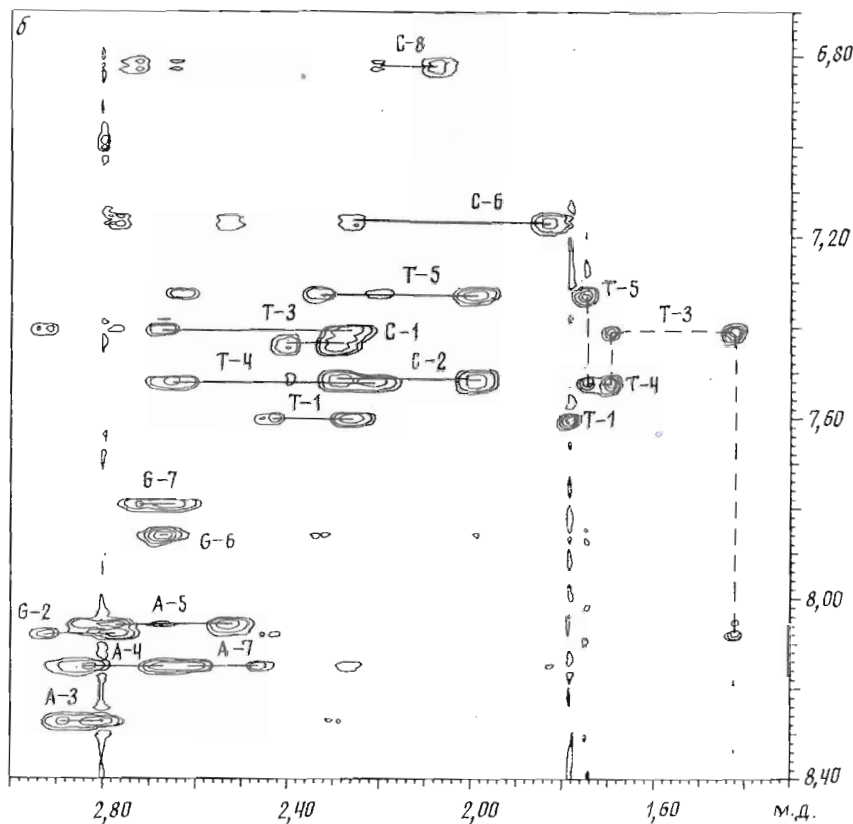


Рис. 5, б

к взаимодействию $C(2)H_2-Nb/Nb'$. Ароматические протоны Ha/Na' пространственно обличены с протонами $C(1)H_2$, $C(2)H_2$ и $C(3)H_2$, и дают в NOESY-спектре сравнимые по интенсивности (вероятно, вследствие спиновой диффузии) кросс-пики 5, 6 и 7 соответственно. Метиленовые протоны группы $C(4)H_2$ имеют ЯЭО с Nb/Nb' (кросс-пик 11).

Взаимодействие бензиламидного фрагмента с протонами дуплекса

В NOESY-спектре КА (III) (рис. 4 и 5а) обнаружены взаимодействия ароматических протонов Nb и Nb' бензиламидного фрагмента с протонами $H1'$, $H5$ и $H6$ 5'-концевого звена гептануклеотидной цепи С-1 (кросс-пики а, б и с соответственно). Метиленовые протоны групп $C(2)H_2$ и $C(4)H_2$ пространственно сближены с $H6$ этого же основания, о чем свидетельствуют кросс-пики г и д. Наблюдаются также слабые взаимодействия между бензиламидным кольцом и основанием алкилированного дезоксицитидина С-8: протон $H6(C-8)$ образует кросс-пики е и д слабой интенсивности с протонами Ha/Na' и Nb/Nb' соответственно.

Анализ конформации углеводных циклов ковалентного аддукта (III)

Для определения конформации углеводных циклов КА (III) был проведен анализ констант спин-спинового взаимодействия для протонов $H1'$, $H2'a$, $H2'b$ и $H3'$ дезоксирибозы (табл. 2). Сравнение J -констант, полученных для КА (III), с соответствующими J -константами немоди-

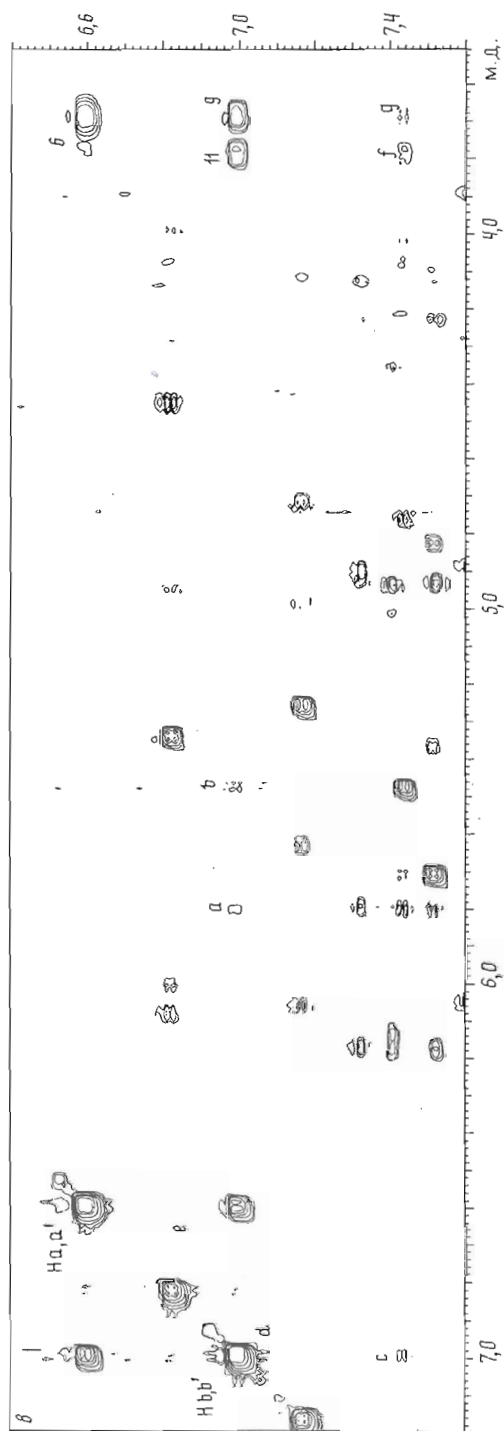


Рис. 5. Фрагменты ^1H -NOESY-спектра: а — область резонанса $\text{H6}/\text{H8}-\text{H1}'/\text{H5}$; схема последовательного отнесения сигналов протонов гептануклеотидной цепи показана сплошной линией, октануклеотидной — пунктирной; б — область резонанса $\text{H6}/\text{H8}-\text{H2}'\text{a}/\text{H2}'\text{b}/\text{CH}_3$; схема последовательного отнесения сигналов метильных протонов 2'-дезокситимидинов показана штриховой линией. в — область резонанса взаимодействующих ароматических и алифатических протонов бензильного фрагмента и $\text{H6}/\text{H8}$ -протонов олигонуклеотидных цепей. Обозначены кросс-пики, соответствующие внутреннуклеотидным взаимодействиям; остальные обозначения см. в подписи к рис. 4

Значения констант спин-спинового взаимодействия (Гц) для некоторых протонов углеводных циклов ковалентного аддукта (III)

Нуклеотидный остаток	$J_{1'2'a}$	$J_{1'2'b}$	$J_{3'2'a}$	$J_{3'2'b}$	$J_{2'a2'b}$	Σ_1	$\Sigma_{2'a}$	$\Sigma_{2'b}$
T-1	8,9	5,8	6,7	0,0	13,7	14,7	29,3	19,5
G-2	9,2	4,6	3,6	1,8	13,6	13,8	26,4	19,5
T-3	9,1	5,6	6,5	1,3	15,6	14,7	31,2	19,5
T-4	9,1	5,6	6,5	1,3	15,6	14,7	31,2	19,5
T-5	8,3	5,4	5,4	1,5	13,6	13,8	27,3	20,5
G-6	8,8	4,9	—*	—	—	14,7	—	—
G-7	8,7	5,1	7,3	4,1	13,3	13,8	29,3	22,5
C-8	8,5	5,7	4,9	5,4	14,2	13,9	27,6	25,3
C-1	8,3	4,3	6,6	2,5	12,7	12,6	27,6	19,5
C-2	9,2	4,6	5,1	1,6	13,3	13,8	27,6	19,5
A-3	9,3	5,3	6,9	0,5	13,7	14,6	29,8	19,5
A-4	9,8	4,9	1,7	0,8	13,8	14,7	25,3	19,5
A-5	9,1	4,9	6,5	0,9	13,7	13,8	23,3	19,5
C-6	8,5	5,3	6,4	1,6	13,8	13,8	28,7	20,7
A-7	10,4	4,5	3,4	4,7	13,3	14,9	27,1	22,5

* Значение констант не определено из-за перекрывания кросс-пинов.

фицированного дуплекса (IV) (см. табл. 3 в [9]) показывает, что разница в значениях J -констант для дуплексов (III) и (IV) в основном не превышает пределов экспериментальной ошибки. Следовательно, наличие ковалентного мостика между нуклеозидными звеньями C-1 и C-8 практически не влияет на конформационное состояние их углеводных циклов, которое также описывается S' -типом конформации дезоксирибозы.

Исследование термической денатурации ковалентного аддукта (III)

Исследование термической денатурации КА (III), проведенное спектрофотометрически (по зависимости оптической плотности при 260 нм от температуры) и методом ЯМР (по зависимости химических сдвигов сигналов протонов от температуры), показало высокую стабильность КА (III) и отсутствие зависимости т. пл. ($\sim 70^\circ\text{C}$) от концентрации КА (III) в широком диапазоне концентраций (от $5 \cdot 10^{-6}$ до $12000 \cdot 10^{-6}$ М) (данные не приведены; для сравнения была определена т. пл. дуплекса (IV), которая составляет 30°C при концентрации $50 \cdot 10^{-6}$ М). Следовательно, процесс термической денатурации КА (III) протекает по механизму внутримолекулярной реакции, что однозначно доказывает наличие ковалентного мостика между двумя цепями олигонуклеотидов.

Анализ данных по ЯЭО между сближенными в пространстве протонами бензиламидного фрагмента и протонами нуклеозидных остатков позволил сделать предварительные выводы о структуре КА (III). Поскольку наличие бензиламидного фрагмента в составе КА (III) не нарушает характерных для правозакрученной ДНК внутринуклеотидных взаимодействий

$$\sim \langle \text{H6/H8} \rangle_i \leftrightarrow \langle \text{H1'/H2'a/H2'b} \rangle_i \leftrightarrow \langle \text{H6/H8} \rangle_{i+1} \sim,$$

исключается возможность интеркаляции остатка реагента «R» в двойную спираль КА (III). Таким образом, остаток алкилирующей группировки локализован в области недостающего звена гептануклеотидной цепи, вблизи от нуклеозидного звена C-1 и алкилированного основания нуклеозидного звена C-8 из противоположной цепи. Схематическая модель расположения бензиламидного фрагмента в структуре КА (III),

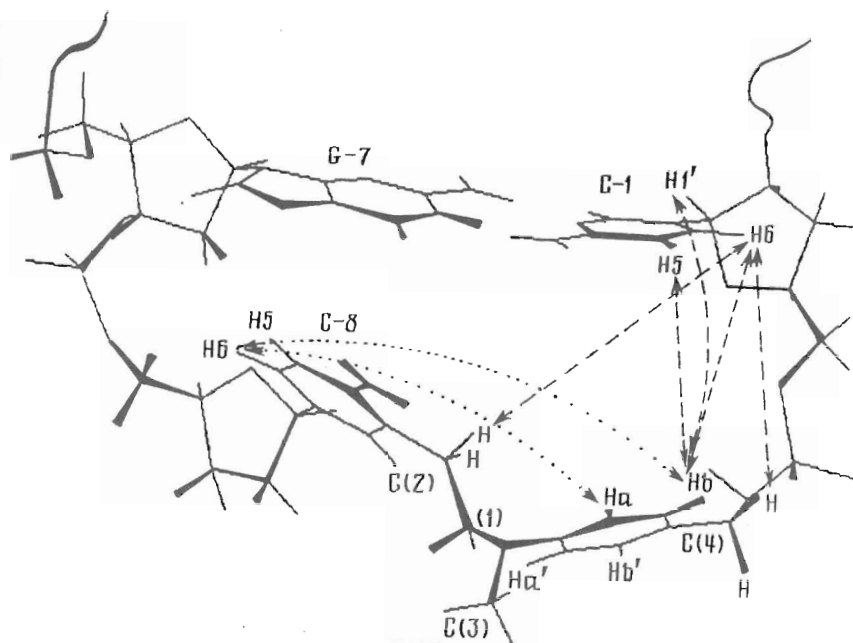


Рис. 6. Схематическая модель расположения бензиламидного фрагмента в структуре КА (III)

построенная на основании расстояний, оцененных из ЯЭО, между протонами этого фрагмента и протонами нуклеозидных остатков C-1 и C-8, приведена на рис. 6. Все существенные изменения структуры двойной спирали происходят на границе контакта бензиламидного фрагмента с нуклеозидными звеньями C-7, C-1 и C-8 при минимальном искажении структуры основной части дуплекса. Это приводит к выводу о расположении в составе дуплекса остатка C-8, удобном для нуклеофильной атаки промежуточными этилениммониевым катионом: октануклеотид (I) — гептануклеотидный реагент (II). С другой стороны, наиболее нуклеофильные остатки G-7 и G-6 реагируют с очень низкой эффективностью, вероятно, вследствие стерических затруднений. Изучение пространственной структуры и свойств продуктов алкилирования по остаткам G-6 и G-7 позволит получить более полную информацию о причинах наблюдаемой позиционной направленности внутрикомплексной реакции алкилирования.

Экспериментальная часть

В работе использованы N-ацил-3'-O-левулинил-5'-*n*-хлорфениловые эфиры моно- и динуклеотидов, 2,4,6-триизопропилбензолсульфонилхлорид, дихлоргидрат 4-N-метил-N-(2-хлорэтиламино)бензиламина (производство НИВХ СО РАН); N-метилимидазол (Ega Chemie, ФРГ); 2,2'-дипиридилдисульфид и трифенилфосфин (Fluka AG, Швейцария).

Олигонуклеотиды (I) и (II) синтезировали по модифицированной триэфирной схеме, описанной в работе [15]. Деблокирование целевых олигонуклеотидов проводили 0,3 М раствором тетрабутиламмонийфторида в 50% водном пиридине (рН 6,5) в течение 12 ч при 20°C [16] с последующей обработкой 25% водным амиаком (5 ч при 50°C). После деблокирования олигонуклеотиды выделяли высокоэффективной ионообменной и обращенно-фазовой хроматографией на хроматографе Waters (США) аналогично [9].

³²P-Меченый октануклеотид (I) получали по методике [17], используя [γ -³²P]АТР (уд. акт. до 3000 Ки/ммоль; НПО «Радиопрепарат», Ташкент), Т4-полинуклеотидкиназу (КФ 2.7.1.78) и ADP (Sigma, США). Радиоактивность водных растворов ³²P-меченых олигонуклеотидов определяли, используя счетчик радиоактивности Mark III (Nuclear Chicago, США).

Алкилирующий реагент (RCl)pССАААСА (II) получали введением в олигонуклеотид pССАААСА остатка 4-[N-метил-N-(2-хлорэтил)амино]-бензиламина по методике, описанной в работе [18]. По окончании реакции смесь по каплям добавляли в 2% раствор LiClO₄ в ацетоне, как описано в работе [19], осадок отделяли центрифугированием. После трехкратного переосаждения при 0°С осадок промывали ацетоном и сушили в вакууме. Анализ продукта реакции с помощью обращенно-фазовой хроматографии показал, что содержание (RCl)pССАААСА составляет не менее 95%.

Реакцию алкилирования октануклеотида (I) с использованием реагента (II) проводили в 0,2 М NaCl, pH 7,4 (0,01 М трис-HCl), при 25°С. Концентрация олигонуклеотидов (I) и (II) в реакционной смеси составляла 0,8·10⁻² и 1,0·10⁻³ М соответственно. Объем реакционной смеси равнялся 2 мл. Через определенные промежутки времени из смеси отбирали пробы по 2 мкл, разбавляли водой до 10 мкл и анализировали методом ионообменной хроматографии в микромасштабе на хроматографе «Милихром» (НПО «Научприбор», г. Орел) в градиенте концентрации КН₂РO₄ (0,03–0,30 М, pH 7,8) в 8 М мочеvine при 20°С на колонке (2×60 мм) с сорбентом ПЭИ С-80 (10 мкм; НПО «Вектор», Новосибирская обл., р.п. Кольцово) при скорости элюции 100 мкл/мин. При окончании реакции (18 ч) продукты выделяли методом ионообменной хроматографии на хроматографе Waters в денатурирующих условиях (8 М мочеvine) в линейном градиенте КН₂РO₄ от 0,01 до 0,30 М (pH 7,8) на колонке (10×250 мм) с сорбентом Lichrosorb-NH₂ (10 мкм; Merck, ФРГ) при скорости элюции 15 мл/мин. КА (III) отделяли от минорных продуктов (X и X') методом обращенно-фазовой хроматографии на хроматографе Waters в градиенте концентрации ацетонитрила в воде от 0 до 45% на колонке (20×300 мм) с сорбентом Nucleosil-C18 (10 мкм; Merck, ФРГ) при скорости элюции 15 мл/мин. Получено 620 ОЕ (260 нм) КА (III).

Для определения позиционной направленности модификации аналитическую реакцию алкилирования проводили с использованием ³²P-меченого октануклеотида (I). В этом случае концентрации олигонуклеотидов (I) и (II) в реакционной смеси составляли 0,8·10⁻³ и 1,0·10⁻³ М. По окончании реакции смесь анализировали электрофорезом в 20% полиакриламидном геле (8 М мочеvine, 0,05 М трис-борат, pH 8,5, 1 мМ EDTA). После радиоавтографии геля на пленку РМ-1 участки геля, содержащие радиоактивный материал, вырезали и измеряли их радиоактивность.

Расщепление радиоактивного октануклеотида по остаткам алкилированных пуринов проводили обработкой 10% водным раствором пиперидина в течение 30 мин при 95–100°С [20], а по остатку N3-алкилцитозина — обработкой смесью гидразингидрат — диоксан — вода (2:1:1 по объему) в течение 1,5–2 ч при 0°С с последующей обработкой 10% водным пиперидином, как описано в работе [21]. Частичную деструкцию октануклеотида (I) по остаткам пуринов или пиримидинов проводили по аналогии с работами [20, 22]. По завершении реакций олигонуклеотидный материал осаждали, добавляя 10–15-кратный избыток (по объему) 2% раствора LiClO₄ в ацетоне, отделяли осадок центрифугированием, сушили в вакууме и анализировали гель-электрофорезом.

Приготовление образцов для записи ^1H -ЯМР-спектров. Для удаления парамагнитных ионов раствор, содержащий $5 \cdot 10^{-6}$ моль Ca (III), пропускали через колонку (10×50 мм) с сорбентом Chelex-100 (Bio-Rad, США). Раствор упаривали, остаток растворяли в D_2O (99,98%, Aldrich, США) и лиофилизировали. Процедуру лиофилизации повторяли два раза и растворяли образец в буфере, содержащем 0,1 М NaCl , 0,01 М натрий-фосфатный буфер (рН 7,0) и 0,01 мМ EDTA в D_2O (99,98%) или в смеси 10% $\text{D}_2\text{O}/90\%$ H_2O . Концентрация Ca (III) во всех случаях составляла 12 мМ.

Запись ^1H -ЯМР-спектров проводили на приборе AM-400 (Bruker, ФРГ) по методикам, описанным в работах [8, 9]. Величины констант спин-спинового взаимодействия определяли по аналогии с работой [9], используя фазочувствительные COSY-DQF-спектры. Для получения тонкой структуры кросс-пиков повышали цифровое разрешение вдоль направления ω_2 (разрешение по ω_2 составляло 0,9 Гц, по ω_1 — 7,0 Гц). Анализ структуры кросс-пиков проводили вдоль ω_2 , как было описано ранее [9]. Точность определения J -констант составляла ± 1 Гц.

Электронные спектры поглощения олигонуклеотидов регистрировали на спектрофотометре Specord M-40 (Carl Zeiss, Jena, ГДР).

Термическую стабильность дуплексов (III) и (IV) определяли с помощью оптических кривых плавления, полученных на установке, собранной в ИВХ СО РАН на базе хроматографа «Милихром» (описана в работе [23]).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Belikova A. M., Zarytova V. F., Grineva N. I. // Tetrahedr. Lett. 1967. № 37. P. 3557–3562.
2. Knorre D. G., Vlassov V. V. // Affinity Modification of Biopolymers, Boca Raton, Florida. CRC Press, Inc. 1988. 269 P.
3. Гринева Н. И., Ломакина Т. С. // Журн. общ. химии. 1972. Т. 42. № 5. С. 1630–1634.
4. Vlassov V. V., Zarytova V. F., Kutavov I. V., Mamayev S. V., Podyminogin M. A. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 10. P. 4065–4076.
5. Ross W. C. J. // J. Chem. Soc. 1949. № 1. P. 183–191.
6. Everett I. L., Ross W. C. J. // J. Chem. Soc. 1949. № 11. P. 1972–1983.
7. Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Кутявин И. В., Сергеев Д. С., Сальников В. Н., Шишкин Г. В. // Изв. СО АН СССР. Сер. хим. наук. 1989. Вып. 6. С. 3–9.
8. Биченкова Е. В., Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Лебедев А. В., Мальцева Т. В., Сальников Г. Е. // Биоорган. химия. 1992. Т. 18. № 3. С. 398–412.
9. Биченкова Е. В., Воробьев Ю. Н., Кутявин И. В., Лебедев А. В., Мальцева Т. В., Тэйнз Е. Ю. // Биоорган. химия. 1990. Т. 16. № 10. С. 1236–1258.
10. Hare D. R., Wemer D. E., Chou S.-H., Drobny G., Reid B. R. // J. Mol. Biol. 1983. V. 171. № 2. P. 319–336.
11. Faigon J., Leupin W., Denny W. A., Kearns D. R. // Biochemistry. 1983. V. 22. № 25. P. 5943–5951.
12. Scheek R. M., Russo N., Boelens R., Kaptein R., Van Boom J. H. // J. Amer. Chem. Soc. 1983. V. 105. № 10. P. 2914–2916.
13. Weiss M. A., Patel D. J., Sauer R. T., Karplus M. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. № 1. P. 130–134.
14. Wemer D. E., Chou S.-H., Reid B. R. // J. Mol. Biol. 1984. V. 180. № 1. P. 41–60.
15. Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Романенко В. П. // Биоорган. химия. 1983. Т. 9. № 4. С. 615–621.
16. Гауск Е. В., Горн В. В., Лебедев А. В. // Биоорган. химия. 1985. Т. 12. № 6. С. 815–820.
17. Berkner K. L., Folk W. R. // J. Biol. Chem. 1977. V. 252. № 10. P. 3176–3184.
18. Мишенина Г. Ф., Самуков В. В., Шубина Т. П. // Биоорган. химия. 1979. Т. 5. № 6. С. 886–894.
19. Барам Г. И., Грачев С. А. // Биоорган. химия. 1985. Т. 11. № 10. С. 1420–1422.
20. Maxam A. M., Gilbert W. // Meth. Enzymol. 1980. V. 65. № 3. P. 499–560.
21. Kirkegaard K., Buc H., Spassky A., Wang J. C. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1983. V. 80. № 9. P. 2544–2548.

22. Коробко Д. Г., Грачев С. А. // Биоорг. химия. 1977, Т. 3, № 10, С. 1423-1426.
23. Grachev M. A., Pereltoizen M. P. // Nucl. Acids Res. 1978, V. 5, № 7, P. 2557-2564.

Поступила в редакцию
20.XII.1991

После доработки
7.IV.1992

E. V. BICHENKOVA, T. V. MALTSEVA, T. V. ABRAMOVA, A. V. LEBEDEV

**INTRACOMPLEX ALKYLATION OF OCTANUCLEOTIDE $pd[TGTTTGGC]$
BY MEANS OF 4-[N-METHYL-N-(2-CHLOROETHYL)AMINO]BENZYL-5'-
PHOSPHAMIDO DERIVATIVE OF HEPTANUCLEOTIDE $pd[TGTTTGGC]$**

*Voposibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division of the Russian Academy
of Sciences*

Covalent adduct — the product of intracomplex alkylation at N-3-position of dC-8 nucleoside residue of target octanucleotide $pd[TGTTTGGC]$ was completely synthesized by means of 4-[N-methyl-N-(2-chloroethyl)amino]benzyl-5' phosphamido derivative of heptanucleotide $pd[CCAAACA]$. Its melting temperature was shown to be 70°C. T_m did not depend on covalent adduct concentration and was by 40°C higher than that for unmodified duplex $pd[TGTTTGGC] \cdot pd[CCAAACA]$ at concentration of $0.5 \cdot 10^{-4}$ M. The spatial structure of the covalent adduct in aqueous solution was investigated by two dimensional 1H -NMR spectroscopy. The assignment of oligonucleotide protons as well as protons of a modifying group was carried out using COSY, COSY-DQF and NOESY experiments. Conformational analysis of proton proton coupling constants for H1', H2'a, H2'b and H3' protons showed the sugar residues to be in 2'-endo conformation. Analysis of NOE connectivities observed between the protons of the alkylating group and oligonucleotide protons yielded conclusion, regarding the 4-[N-methyl-N-(2-chloroethyl)amino]benzylamido 5'-residue being localized in the region of the lacked nucleoside residue of the heptanucleotide chain about 5 Å apart from the dC-1 residue and from cytosine base of the alkylated dC-8 residue.