



УДК 547.963.32.04

**КОМПЛЕМЕНТАРНО АДРЕСОВАННОЕ АЛКИЛИРОВАНИЕ
poly (A)-ФРАГМЕНТОВ мРНК В КЛЕТКАХ
АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМЫ КРЕБСА**

*Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Барнова Г. Г.,
Кюрре Д. Г., Пичко Н. П., Райт А. С.,
Стефанович Л. Е.*

*Институт органической химии Сибирского отделения
Академии наук СССР, Новосибирск*

Введением остатка ^{14}C -меченного 4-(N-метил-N-2-хлорэтиламино)бензальдегида (RCl) в 2',3'-O-положения олигонуклеотида $[\text{Tr}(\text{Et})]_9\text{rU}$ получено меченое алкилирующее производное $[\text{Tr}(\text{Et})]_9\text{rU}(>[^{14}\text{C}]\text{RCl})$ в виде смеси диастереомеров. Степень модификации poly(A) с помощью этого производного на 2–3 порядка превышает таковую при алкилировании нуклеиновых кислот ароматическими 2-хлорэтиламинами, не содержащими олигонуклеотидного адреса, что свидетельствует о модификации в комплементарном комплексе. Значительная часть алкилирующего производного свободно проникает в клетки асцитной карциномы Кребса и алкилирует в них нуклеиновые кислоты. Степень модификации poly(A)-фрагментов мРНК на 2 порядка превышает степень модификации остальных фракций нуклеиновых кислот. Состав алкилированных оснований нуклеиновых кислот клетки соответствует найденному ранее в опытах *in vitro* для модификации РНК и ДНК в составе комплементарных комплексов.

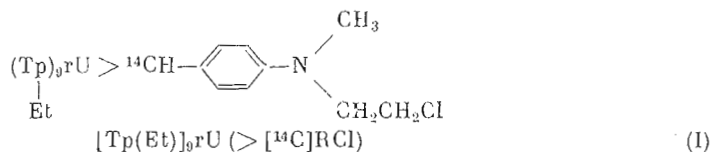
Метод комплементарно адресованного алкилирования был предложен Н. И. Гриневой и др. [1, 2] для химической модификации одноцепочечных нуклеиновых кислот по строго определенным точкам. С помощью алкилирующих производных олигонуклеотидов, содержащих реакционно-способную группу либо на 3'-, либо на 5'-конце олигонуклеотидного фрагмента, осуществлена высоконаправленная модификация ДНК, рРНК и тРНК [3–6]. Аналогичный подход позднее был описан Саммертоном [7]. Недавно Салганик и др. [8] успешно использовали модифицированный вариант этого метода для проведения *in vitro* мутагенеза определенных генов фага T7.

Для осуществления комплементарно адресованной модификации в клетке необходимо, чтобы алкилирующие производные олигонуклеотидов проходили через мембрану и были устойчивы к нуклеазам. Эта трудность может быть преодолена при использовании неионных олигонуклеотидных

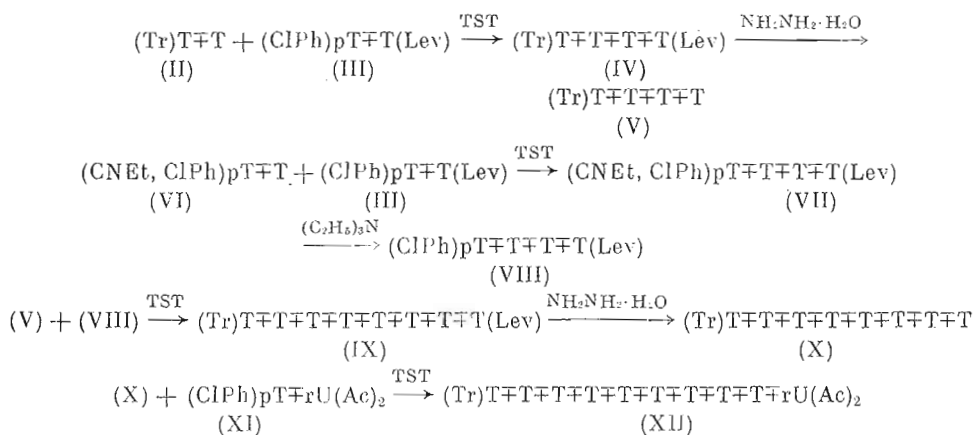
Использована система аббревиатур, рекомендованная комиссией по номенклатуре IUPAC — IUB; символ d для обозначения дезокситимидилатов опущен, символом \mp обозначена межнуклеотидная связь, защищенная *n*-хлорфениловым (ClPh) остатком; RCl — 4-(N-метил-N-2-хлорэтиламино)бензальдегид; 3RCyt — 3-[2-(N-метил-N-4-формилфениламино)этил]цитозин; RAde, RGua, RCyd P — аналогичные алкиларильные производные аденина, гуанина и дитидин-3'(2')-фосфата. (Me)prU(>RCl) — метиловый эфир 2',3'-O-[4-(N-метил-N-2-хлорэтиламино)бензилден]уридин-5'-фосфата. Кроме того, использованы следующие сокращения: TST — *n*-толуолсульфотетразолид, Tr — тритил, CNet — цианэтил, Lev — левулинил.

аналогов [9]. Недавно мы показали, что производное тетраэтилового эфира пентануклеотида, содержащее 2',3'-O-[4-(N-метил-N-2-хлорэтиламино)-бензилиденовый] фрагмент, $(C_6H_5NH)_2p[Tr(Et)]_4rU(>RCl)$, свободно проникает в клетки [10] и обладает некоторой направленностью алкилирования при 5° С [11].

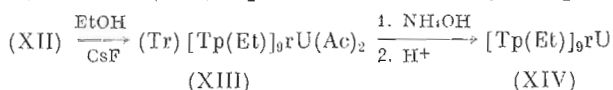
В настоящей работе мы получили 2',3'-O-[4-(N-метил-N-2-хлорэтиламино)- ^{14}C бензилиденовое] производное понатимидилилуридина, этилированное по межнуклеотидным фосфатам (I), и исследовали его взаимодействие при комнатной температуре с полиадениловой кислотой в комплексах и с нуклеиновыми кислотами в клетках асцитной карциномы Кребса.



Декануклеотид (XII) получили с помощью модифицированного триэфирного метода [12], используя *n*-толуолсульфотетразолид в качестве конденсирующего реагента и динуклеотидные блоки, полученные по аналогии с работой [13] (см. схему и табл. 1).



Замещение *n*-хлорфенильных групп межнуклеотидного фосфата на этильные в соединении (XII) проводили по методу Петренко и др. [14]:



За глубиной замещения следили по переходу сигнала ^{31}P -ЯМР из области 7 м. д., характерной для межнуклеотидных фосфатов, блокированных *n*-хлорфенильными остатками, в область 2 м. д. (рис. 1), характерную для триалкилфосфатов [14]. Уширение и расщепление сигналов ^{31}P -ЯМР связано скорее всего с наличием сложной смеси диастереомеров.

После удаления 5'-тритильной и 2',3'-ацетильных групп этилированный олигонуклеотид (XIV) превращали в искомый меченый продукт (I) обработкой ^{14}C RCl в присутствии 2,2-диметоксипропана и трифторуксусной кислоты как описано в работе [15].

Коэффициент молярного поглощения производного (I), найденный из соотношения радиоактивности и поглощения продукта, подвергнутого дополнительной хроматографической очистке, составляет $110,8 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, что удовлетворительно согласуется с суммой соответствующих величин для девяти остатков тимидина, одного остатка уридина и $>RCl$ -фрагмента

Условия межнуклеотидных конденсаций и характеристика продуктов

Продукт	ОН-компонент	МКМОЛЬ	Р-компонент	МКМОЛЬ	ТЭП, МКМОЛЬ	Р _у , мл	Р _т (Ac) система	Время, мин	Выход, %
(Tr) T≡T (Lev)	(Tr) T	900	(ClPh) pT (Lev)	900	2700	5	1,14	75	
(Tr) T≡T (II)							1,00	47*	
(CNEt, ClPh) pT≡T (Lev)	(CNEt, ClPh) pT	1400	(ClPh) pT (Lev)	1700	5100		1,02	90	78
(CNEt, ClPh) pT≡T						6	0,52	90	92
(Tr) T≡T≡T≡T (Lev) (IV)	(Tr) T≡T	340	(ClPh) pT≡T (Lev) (III)	700	1200	2	1,19	90	
(Tr) T≡T≡T≡T (V)							0,71		68*
(CNEt, ClPh) pT≡T≡T≡T (Lev) (VII)	(CNEt, ClPh) pT≡T (VI)	310	(ClPh) pT≡T (Lev) (III)	350	1050	2	1,00	90	84
(Tr) T≡T≡T≡T≡T≡T≡T (Lev)	(Tr) T≡T≡T≡T (V)	230	(ClPh) pT≡T≡T≡T (Lev) (VIII)	260	780	1,5	0,87	80	87
(Tr) T≡T≡T≡T≡T≡T≡T (X)							0,47		83
(CNEt, ClPh) pT+rU (Ac) ₂	(CNEt, ClPh) pT	400	(ClPh) prU (Ac) ₂	100	300	0,5	1,17	80	68
(Tr) T≡T≡T≡T≡T≡T+rU (Ac) ₂ (XII)	(Tr) T≡T≡T≡T≡T≡T≡T≡T≡T≡T≡T (X)	62	(ClPh) pT+rU (Ac) ₂ (XI)	68	204	0,5	0,87	100	59

* Выходы продукта определялись после снятия левулинильного остатка, относительно нулевого компонента.

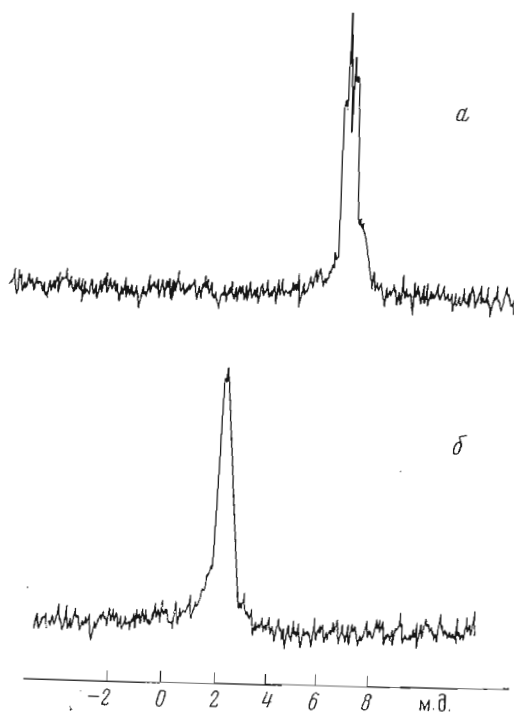


Рис. 1. Спектры ^{31}P -ЯМР в смеси хлороформ – этанол (1:1) $(\text{Tr})[\text{Tr}(\text{ClPh})]_9\text{rU}(\text{Ac})_2$ (XII) – а и $(\text{Tr})(\text{Tr} \cdot (\text{Et})_9\text{rU}(\text{Ac})_2$ (XIII) – б

($\epsilon_{260}^{\text{pH}7}$ $83,7 \cdot 10^3$; $9,9 \cdot 10^3$ и $18,5 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^1$ соответственно) [16, 17]. Используя величины коэффициентов молярного поглощения олигонуклеотида (XIV) и производного бензальдегида RCl [18], определили, что содержание искомого (I) в препарате, полученном после осаждения реакционной смеси эфиром, составляет 95,4%. В дальнейших экспериментах непосредственно использовали этот продукт. Растворимость реагента (I) в воде низкая — 4,5 мкМ. При использовании 5% диметилсульфоксида в водном буфере его растворимость можно увеличить на порядок. Соединение (I) представляет собой сложную смесь диастереомеров из-за наличия в нем 9 асимметрических атомов фосфора и асимметричного атома углерода в диоксалановом цикле $\text{rU}(>\text{RCl})$ -фрагмента.

При выдерживании реагента (I) с раствором $\text{poly}(\text{A})$ при 20°C наблюдали его ковалентное присоединение к $\text{poly}(\text{A})$. После отделения модифицированной $\text{poly}(\text{A})$ от не вступившего в реакцию реагента гель-фильтрацией при 45°C по радиоактивности фракций определяли степень модификации. Зависимость степени модификации 0,17 мМ раствора $\text{poly}(\text{A})$ от времени выдерживания реакционной смеси (рис. 2) свидетельствует, что степень алкилирования $\text{poly}(\text{A})$ возрастала до $2,5 \cdot 10^{-3}$ моль остатков реагента на 1 моль нуклеотидного остатка $\text{poly}(\text{A})$. При концентрации $\text{poly}(\text{A})$, равной 1,7 мМ, максимальная степень модификации составляла $1 \cdot 10^{-4}$ моль остатков реагента на 1 моль нуклеотида $\text{poly}(\text{A})$.

Константа скорости алкилирования $\text{poly}(\text{A})$ реагентом (I) ($k_{\text{алк}}$), вычисленная из прямолинейной полулогарифмической анаморфозы кинетической кривой (рис. 3), составила $(3,45 \pm 0,49) \cdot 10^{-6} \text{ с}^{-1}$. Эта величина хорошо согласуется с полученными ранее $k_{\text{алк}}$ рРНК в комплексе с $(\text{Ar})_5\text{A}(>\text{RCl})$ при 20°C ($6,9 \cdot 10^{-6} \text{ с}^{-1}$) и константой скорости ионизации хлора (лимитирующей стадии алкилирования) в $(\text{Me})\text{rgU}(>\text{RCl})$ (k_0 $6,3 \cdot 10^{-6} \text{ с}^{-1}$) [19]. В соответствии с работой [19] это означает, что алкилирование $\text{poly}(\text{A})$ реагентом (I) протекает по двухстадийному механизму

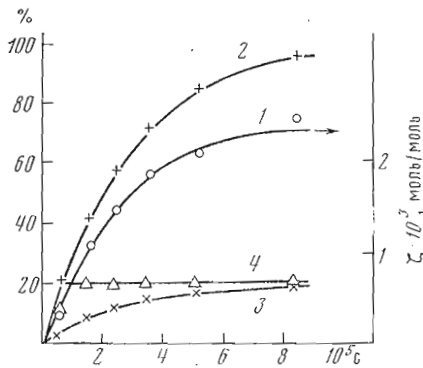


Рис. 2

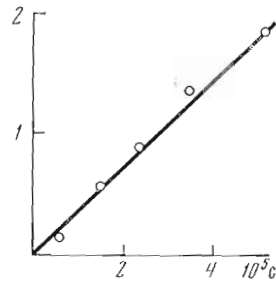


Рис. 3

Рис. 2. Кинетические кривые реакции алкилирования poly(A) реагентом (I) при 20° С и концентрации poly(A) 0,17 мМ: 1 — степень модификации (ξ) poly(A); 2 — степень превращения реагента в $[\text{Tr}(\text{Et})]_{\text{or}}\text{U}(>\text{R}^+)$; 3 — степень включения реагента в poly(A) в процентах от исходного количества реагента, взятого в реакцию; 4 — степень включения реагента в poly(A) в процентах от ионизованного по ходу реакции реагента

Рис. 3. Полулогарифмическая анаморфоза кинетической кривой алкилирования poly(A) реагентом (I) при 20° С; $[\text{poly}(\text{A})]_0$ 0,17 мМ; на оси ординат

$$\ln \frac{[\text{poly}(\text{A}) \cdot (\text{I})]_{\infty}}{[\text{poly}(\text{A}) \cdot (\text{I})]_{\infty} - [\text{poly}(\text{A}) \cdot (\text{I})]_t}$$

му с лимитирующей стадией образования активной промежуточной частицы. За время полного превращения реагента в активную промежуточную частицу, этилиниммиевый катион, с poly(A) ковалентно связывается 19–22% исходного количества реагента (кривая 3) и в среднем 20–25% активной промежуточной частицы расходуется на алкилирование poly(A) (рис. 2, 4).

Алкилирование полинуклеотидов ароматическими 2-хлорэтиламинами в растворе характеризуется величиной эффективности алкилирования (отношением доли реагента, включенного в нуклеиновую кислоту, к доле реагента, идущего на остальные его превращения), равной 8 M^{-1} [19]. Из этой величины нетрудно вычислить степень алкилирования полинуклеотидов такими реагентами вне комплекса. Для реакции алкилирования 0,17 и 1,7 мМ растворов poly(A) реагентом (I) эта величина составляет $1,3 \cdot 10^{-6}$ и $5 \cdot 10^{-7}$ моль остатков реагента на 1 моль нуклеотидного остатка poly(A) соответственно, что на 2–3 порядка ниже экспериментально найденных степеней алкилирования poly(A) данным реагентом. Таким образом, можно утверждать, что реакция алкилирования 0,17 и 1,7 мМ растворов poly(A) реагентом (I) при 20° С протекает в комплексе.

Повышение температуры алкилирования до 37° С приводит к снижению доли реагента, идущего на алкилирование poly(A), на порядок, что указывает на значительное уменьшение концентрации комплекса в этих условиях.

При инкубации реагента (I) с клетками асцитной карциномы Кребса при 20° С до 20% реагента сорбировалось клетками и за 30 ч около 80% этого количества ковалентно связывалось с кислотонерастворимым материалом клеток. Нуклеиновые кислоты, выделенные из клеток, разделяли на РНК, лишённую мРНК (фракция 1), poly(A)-фрагменты из мРНК (фракция 2), мРНК без poly(A)-фрагментов (фракция 3) и ДНК (фракция 4). Из табл. 2 видно, что степень модификации poly(A)-фрагментов в 120–200 раз выше степени модификации РНК во фракциях 1 и 3 и в 75 раз выше степени модификации ДНК. Результаты анализа распределения радиоактивной метки между основаниями во фракциях нуклеино-

Степень модификации и состав продуктов алкилирования нуклеиновых кислот реагентом $[\text{Tr}(\text{Et})_3\text{U}(>[^{14}\text{C}]\text{RCl})$ (I) в клетках асцитной опухоли Krebs-2

Номер фракции	Нуклеиновая кислота	$t, ^\circ\text{C}$	Степень модификации, моль/моль	Содержание алкилированных оснований, %		
				Gua	Cyt	Ade
1	РНК, лишённая мРНК	20	$1,8 \cdot 10^{-4}$	46	33	21
2	poly(A)-фрагменты из мРНК	20	$2,1 \cdot 10^{-2}$			100 *
3	Гидролизат мРНК, лишённой poly(A)-фрагментов	20	$1,0 \cdot 10^{-4}$	43	32	25
4	ДНК	20	$2,8 \cdot 10^{-4}$	56	14	30
	Суммарная РНК [11] **	37	$3,0 \cdot 10^{-3}$	82	18	
	ДНК [11]	37	$1,6 \cdot 10^{-4}$	90	10	

* 3RAde (67%), 7RAde (18%) и 1RAde (15%).

** Алкилирование нуклеотидом $(\text{C}_6\text{H}_5\text{NH})_2\text{p}[\text{Tr}(\text{Et})_3\text{U}(>\text{RCl})]$.

вых кислот (табл. 2) показывают, что главным продуктом алкилирования poly(A)-фрагментов является 3-алкиладенин. Наряду с ним обнаружены 7- и 1-алкиладенины. В РНК (фракция 1 и 3) модифицируется гуанин, цитозин и аденин. Следовательно, состав алкилированных оснований РНК в клетках такой же, как и при алкилировании РНК в комплексе с бензилиденовыми производными неэтерифицированных олигонуклеотидов in vitro [20]. ДНК алкилировалась главным образом по остаткам гуанина и аденина, что также типично для комплементарно адресованной модификации ДНК бензилиденовыми производными олигоаденилатов in vitro [21].

Состав алкилированных оснований РНК и ДНК клеток при проведении реакции при 20°C резко отличается от состава оснований, модифицированных в клетках бензилиденовым производным тетраэтилового эфира 5'-дианилида пентауклеотида при 37°C (табл. 2). В последнем случае комплексы не образуются, и главным продуктом модификации является 7-алкилгуанин [11].

Полученные данные позволяют заключить, что соединение (I) является достаточно гидрофобным реагентом для прохождения через клеточную мембрану и способно специфично алкилировать комплементарные poly(A)-фрагменты в мРНК и короткие oligo(A)-последовательности в РНК и ДНК.

Экспериментальная часть

В работе использовали динуклеотидные блоки $(\text{Tr})\text{T}\mp\text{T}$, $(\text{ClPh})\text{pT}\mp\mp\text{T}(\text{Lev})$, $(\text{CNEt}, \text{ClPh})\text{pT}\mp\text{T}$, $(\text{ClPh})\text{pT}\mp\text{TgU}(\text{Ac})_2$, полученные аналогично методикам работы [13], $(\text{ClPh})\text{pT}(\text{Lev})$ — производство ОЖП НИОХ СО АН СССР, *n*-толуолсульфотетразолид, полученный по работе [22], poly(A) (СКТБ БАВ, Новосибирск), poly(U)-сефарозу (Pharmacia, Швеция), РНКазу T₁ (КФ 3.1.4.8) и РНКазу А (КФ 3.1.4.22) (Sigma, США).

Радиоактивность растворов определяли в диоксановом сцинтилляторе, радиоактивность на бумаге — в толуольном сцинтилляторе, используя счетчик «Mark-II» (Nuclear Chicago, США).

Спектры ^{31}P -ЯМР записывали на спектрометре НХ-90 с фурье-преобразованием на 7ВМ ВС-12 (Bruker-Physic AS, ФРГ) на частоте 36,43 МГц. В качестве стандарта для стабилизации резонансных условий использо-

вали D_2O . Химические сдвиги записывали относительно 85% H_3PO_4 с точностью $\pm 0,1$ м. д.

Для хроматографии в тонком слое силикагеля (Merck, ФРГ) применяли системы растворителей: 1—хлороформ—метанол (9:1) и 2—хлороформ—метанол (4:1). Для хроматографии на бумаге FN-1 (Filtrak, ГДР) использовали системы растворителей: 3—этанол—1 М ацетат аммония (7:3; pH 7,5); 4—изопропанол—аммиак—вода (7:1:2); 5—бутанол—вода—этанол (80:25:10); 6—изопропанол—конц. HCl—вода (170:41:39); 7—изопропанол—вода (3:2); 8—*трет*-бутанол—метилэтилкетон—муравьиная кислота—вода (4:3:1,5:1,5); 9—*н*-пропанол—аммиак—вода (7:1:2).

Молярный коэффициент поглощения при 260 нм одного мононуклеотида в $poly(A)$ ($11,4 \cdot 10^3 M^{-1} cm^{-1}$) рассчитывали на основании поглощения растворов до и после гидролиза $poly(A)$ в 0,6 М NaOH при 37°С в течение 24 ч.

Концентрацию $poly(A)$ выражали в концентрации нуклеотидов. Удаление цианэтильной и леуцилильной групп с олигомеров проводили согласно [23, 24].

$(Tr)[T(CIPh)]_9rU(Ac)_2$ (XII). Межнуклеотидную конденсацию осуществляли в пиридиновом растворе нуклеотидного и нуклеозидного компонентов с помощью *n*-толуолсульфотетразолида (условия конденсации приведены в табл. 1). Реакционную смесь в каждом случае разлагали при 0°С двумя объемами воды и экстрагировали хлороформом (1/3 объема, 5 раз). Хлороформные слои упаривали с толуолом до масляобразного остатка. Продукт выделяли хроматографией на колонке с силикагелем в градиенте концентрации этанола в хлороформе. Выход олигомеров и подвижности синтезированных продуктов приведены в табл. 1.

$(Tr)[T(Et)]_9rU(Ac)_2$ (XIII) получали из хлорфенильного производного (XII) по методике [14]. 1000 OE_{267} декануклеотида и 152 мг CsF растворяли в 2 мл смеси хлороформ—этанол (1:1). Через 90 мин реакционную смесь упаривали, остатки растворяли в 5 мл хлороформа. Хлороформный раствор промывали 20% водным этанолом (2 мл \times 10). Продукт выделяли хроматографией на колонке с силикагелем (50 мл) в градиенте концентрации метанола в хлороформе (0–20%). Выход продукта — 600 OE_{267} $R_{T(Ac)}$ 0,46 (система 2), λ_{max} 267 нм.

$[Tp(Et)]_9rU$ (XIV). Декануклеотид (XIII) обрабатывали концентрированным аммиаком в течение 2 ч при 50°С. Реакционную смесь упаривали, декануклеотид обрабатывали 80% уксусной кислотой при 120°С в течение 10 мин. Уксусную кислоту удаляли упариванием с водой, остаток растворяли в 10 мл 40% водного спирта, промывали эфиром (3 \times 2 мл). Водно-спиртовой раствор упаривали, остаток растворяли в 0,5 мл смеси хлороформ—этанол (1:1) и высаживали в 20 мл эфира. Выход продукта (XIV) 500 OE_{260} , R_f 0,75 (система 3), λ_{max} 260 нм.

$[Tp(Et)]_9rU(>[^{14}C]RCl)$ (I) получали как описано ранее [10, 15], обрабатывая 0,8 мкмоль декануклеотида $[Tp(Et)]_9rU$ (XIV) в 0,2 мл диметилформамида при -70°С 90 мкмоль 4-(*N*-2-хлорэтил-*N*-метиламино)бензальдегидом, меченным ^{14}C по альдегидной группе ($[^{14}C]RCl$, 6 Ки/моль) в присутствии 200 мкмоль трифторуксусной кислоты и 100 мкмоль 2,2-диметоксипропана. Реакционную смесь выдерживали 45 мин при 20°С, нейтрализовали при -70°С триэтиламино и осаждали эфиром. Полученный продукт растворяли в метаноле и осаждали эфиром. Пересаживание повторяли трижды. Выход продукта 74% (6 Ки/моль). Препарат охарактеризован хроматографической подвижностью на бумаге, $R_{(XIV)}$ 1,18 и 1,25 в системах 3 и 9 соответственно. R_f нуклеотида (XIV), выдержанного в условиях реакции в отсутствие RCl, не отличался от подвижности исходного (XIV) в этих же системах растворителей.

Продукт (I) хроматографировали в системе 9 и определяли молярный коэффициент поглощения ϵ_{260}^{pH7} по соотношению поглощения и радиоак-

тивности основной УФ-поглощающей фракции, полагая, что продукт содержит один остаток $[^{14}\text{C}] \text{RCl}$. $\epsilon_{260}^{\text{pH}7}$ продукта (XIV) рассчитывали как описано в работе [15]. Соотношение (XIV) — $[^{14}\text{C}] \text{RCl}$ в производном (I) определяли спектрофотометрически после гидролиза бензилиденовой связи при pH 2 и температуре 20° С как в работах [10, 15].

Алкилирование *poly(A)* с помощью $[\text{Tr}(\text{Et})]_3\text{rU}(>[^{14}\text{C}] \text{RCl})$ (I) проводили при 20° С в 0,2 М NaCl, содержащем 0,01 М MgCl_2 , 0,01 М трис-НCl (pH 7,3). Концентрация *poly(A)* составляла 0,17 и 1,7 мМ нуклеотидов, реагента — 2,2 и 0,8 мкМ соответственно. Объем реакционной смеси 6 мл. По ходу реакции отбирали пробы по 1 мл. Алкилированную *poly(A)* выделяли гель-фильтрацией реакционной смеси на колонке с сефадексом G-75 (1,6×30 см) при 45° С в 0,01 М трис-НCl по методике [15]. В этих условиях происходит полное разрушение комплекса *poly(A)* с реагентом (I). Степень модификации *poly(A)* (ξ) определяли как указано в работе [15] и выражали в молях остатков реагента на моль нуклеотида *poly(A)*. Ошибка в определении степени модификации *poly(A)* за счет вклада реакции алкилирования вне комплекса за время гель-фильтрации реакционной смеси при 45° С, оцененная по работе [19], составляет <0,1%. Количество реагента, ионизовавшегося по ходу алкилирования, вычисляли в молях активного промежуточного катиона $[\text{Tr}(\text{Et})]_3\text{rU}(>\text{R}^+)$ по методике [25].

Константу скорости алкилирования ($k_{\text{алк}}$, с⁻¹) рассчитывали из прямолинейной полулогарифмической анаморфозы кинетической кривой.

Алкилирование нуклеиновых кислот внутри клеток асцитной опухоли Кребса-2, перевиваемой на мышцах линии СС57ВВ. Отмытые и суспендированные в среде 199 клетки смешивали с реагентом (I), растворенным в той же среде, и инкубировали 30 ч при 20° С при периодическом перемешивании. Суспензия (400 мл) содержала $1,4 \cdot 10^7$ клеток и 1,75 нмоль реагента в 1 мл среды. Далее клетки отделяли центрифугированием в течение 10 мин при 150 г и дважды промывали 0,14 М NaCl. Все операции проводили при 4,5° С.

Клетки РНК обрабатывали насыщенным водной фенолом (pH 6,0) в интервалах 4—10, 22—25, 40—50 и 65—68° С как описано в работе [26]. Интерфазу, содержащую дезоксиинуклеопротеиды, сохраняли для последующего выделения ДНК. Объединенные водные фазы депротеинизировали в присутствии 0,5% додецилсульфата натрия и равного объема фенола (pH 6,0), затем водную фазу обрабатывали хлороформом [26]. РНК из водной фазы осаждали этанолом, промывали дважды этанолом и хранили при -10° С. Полученный препарат суммарной РНК фракционировали хроматографией на *poly(U)*-сефарозе, используя условия нанесения РНК на колонку и элюции мРНК, описанные в работе [27]. Фракцию суммарной РНК, не сорбируемую *poly(U)*-сефарозой, далее называли фракцией 1. мРНК после элюции с колонки обрабатывали РНКазой Т1 и РНКазой А по методике [28].

Poly(A)-фрагменты (фракция 2) выделяли из гидролизата мРНК последующей хроматографией на *poly(U)*-сефарозе, как указано выше.

Гидролизат, лишенный *poly(A)*-фрагментов, составлял фракцию 3. ДНК (фракция 4) экстрагировали из интерфазы, полученной при выделении суммарной РНК по [29], обрабатывая ее 10 мин буфером, содержащим 0,5% додецилсульфата натрия, при 75° С. ДНК обрабатывали 30 мин РНКазой А (20 мкг/мл) при 37° С. Последнюю предварительно прогревали 10 мин при 90° С. Фермент удаляли фенольной экстракцией [30], ДНК осаждали в присутствии 1% NaCl и 2,5 объемом этанола, дважды промывали этанолом и хранили при -10° С.

Степень модификации (ξ) РНК, ДНК и *poly(A)*-фрагментов определяли по поглощению и радиоактивности каждой фракции и выражали в молях остатков реагента на моль нуклеотидного остатка полинуклеотида.

Идентификация продуктов алкилирования нуклеиновых кислот в клетках асцитной карциномы Кребса-2 реагентом $[Tr(Et)]_3rU(>[^{14}C]RCl)$ (I)

Номер фракции	Соединение	R_f в системах					Литература сравнения*
		4	5	6	7	8	
1	7RGua	(0,44)		0,40(0,42)	0,62(0,64)	0,66(0,68)	[20]
	3RCydP	(0,39)		0,54(0,52)	0,52(0,55)	0,43(0,40)	[20]
	RAde ^{2*}	(0,71)		0,73(0,70)	0,78(0,77)	0,75	[20]
				0,90(0,93)	0,93(0,96)	0,92	[20]
2	7RAde ^{3*}		0,23(0,22)	(0,68)	0,82(0,84)	0,35(0,37)	[15]
	3RAde		0,35(0,32)	(0,79)	0,80(0,80)	0,52(0,53)	[15]
	N ⁶ RAde ^{4*}		0,58(0,58)	(0,77)	0,83(0,85)	0,85(0,87)	[15]
3	7RGua	(0,44)		0,38(0,42)	0,66(0,64)		[20]
	3RCydP	(0,39)		0,53(0,52)	(0,55)	0,42(0,40)	[20]
	RAde ^{2*}	(0,71)		0,70(0,70)	(0,77)	0,74	[20]
4	7RGua	0,42(0,44)		0,40(0,42)	0,63(0,64)	(0,68)	[20]
	RAde (смесь)	0,72(0,68)			0,79(0,75)		[3]
	3RCyt	0,62(0,60)		(0,59)	0,76(0,78)	(0,76)	[20]

* Литературные данные приведены в скобках.

** Продукты превращения RAde в 1 н. HCl при 100° С.

*** Продукт гидролитического расщепления имидазольного цикла 7RAde в 0,6 н. NaOH.

**** Образуется за счет перегруппировки Димрота в основании 1RAde при обработке его 0,6 н. NaOH.

Для идентификации алкилированных оснований нуклеотидный материал фракций 1–3 гидролизвали 1 н. HCl при 100° С в течение 1 ч. Фракцию 2, содержащую poly(A)-фрагменты, предварительно обрабатывали 18 ч 0,6 н. NaOH при 37° С для превращения алкилированных аденинов в устойчивые к кислоте производные. Алкилированные лурны из ДНК (фракция 4) элиминировали при pH 6 и 60° С в течение 8 ч и далее выдерживали 1 ч при pH 4 и 40° С для полного расщепления ацетальной связи между алкилированными основаниями и олигонуклеотидными фрагментами реагента. Алкилированный цитозин идентифицировали после обработки ДНК в течение 1 ч 1 н. HCl при 100° С. Во всех случаях для идентификации алкилированных оснований и алкилированного цитидин-3'(2')-фосфата применяли хроматографию на бумаге в двух-трех системах растворителей. О строении алкилированных продуктов судили, сравнивая их подвижности с подвижностями ранее охарактеризованных соединений (табл. 3). Содержание алкилированных продуктов определяли, измеряя радиоактивность хроматограмм. Детали идентификации алкилированных оснований в РНК и ДНК описаны в работах [4, 20, 21].

ЛИТЕРАТУРА

1. Belikova A. M., Zarytova V. F., Grineva N. I. Synthesis of ribonucleosides and di-ribonucleoside phosphates containing 2-chloroethylamine and nitrogen mustard residues.— Tetrahedron Lett., 1967, № 37, p. 3557–3562.
2. Grineva N. I., Karpova G. G. Complementarily addressed modification of rRNA with *p*-(chloroethylmethylamino)benzylidene hexanucleotides.— FEBS Lett., 1973, v. 32, № 2, p. 351–355.
3. Grineva N. I., Карпова Г. Г., Мызина С. Д., Чемасова А. Н. Комплементарно-адресованное алкилирование ДНК производными гексааденилата.— Биоорганическая химия, 1975, т. 1, № 12, с. 1707–1715.
4. Гимаутдинова О. И., Карпова Г. Г., Ломакина Т. С., Шелпакова Е. Л., Чемасова А. Н., Grineva N. I. Алкилирование ДНК в комплементарных комплексах с 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)-бензил-5'-фосфамидами олигонуклеотидов.— Биоорганическая химия, 1980, т. 6, № 1, с. 70–80.

5. *Гринева Н. И., Карпова Г. Г.* Комплементарно-адресованное алкилирование рибосомной РНК алкилирующими производными олигонуклеотидов.— Молекулярн. биология, 1974, т. 8, вып. 6, с. 832—844.
6. *Grineva N. I., Karpova G. G., Kuznetsova L. M., Venkster T. V., Bayev A. A.* Complementary addressed modification of yeast tRNA^{Val} with alkylating derivative of d(pC-G)-A. The position of the alkylated nucleotides and the course of the alkylation in the complex.— Nucleic Acids Res., 1977, v. 4, № 5, p. 1609—1631.
7. *Sammerton I., Bartlett P. A.* Sequence-specific crosslinking agents for nucleic acid. Use of 6-bromo-5,5-dimethoxyhexanohydrazide for crosslinking cytidine to guanosine and crosslinking RNA to complementary sequences of DNA.— J. Mol. Biol., 1978, v. 122, p. 145—162.
8. *Салганик Р. И., Дианов Т. Л., Курбагов В. А., Шишкин Г. В., Галль А. А.* Направленное воздействие на геном бактериофага Т7 с помощью транскрипта области ранних генов, несущего множественные алкилирующие группы.— Докл. АН СССР, 1978, т. 239, № 1, с. 217—219.
9. *Miller P. S., Brateman L. T., Ts'o P. O. P.* Effect of a trinucleotide ethyl phosphotriester, G^mp(Et)C^mp(Et)U on mammalian cells in culture.— Biochemistry, 1977, v. 16, № 9, p. 1988—1996.
10. *Зарытова В. Ф., Карпова Г. Г., Кнорре Д. Г., Попова В. С., Стефанович Л. Е., Шешегова Е. А.* Алкилирующие производные этиловых эфиров олигонуклеотидов — проникающие в клетки комплементарно-адресованные реагенты.— Докл. АН СССР, 1980, т. 255, № 1, с. 110—113.
11. *Karpova G. G., Knorre D. G., Rytte A. S., Stephanovich L. E.* Selective alkylation of poly(A) tracts of RNA inside the cell with the derivative of ethyl ester of oligothymidilate bearing 2-chloroethylamino group.— FEBS Lett., 1980, v. 122, № 1, p. 21—24.
12. *Зарытова В. Ф., Ярмолинская Е. В.* Синтез октануклеотида А-А-Т-Т-С-С-А-С триэфирным методом при взаимодействии 5'-диэфирной группировки нуклеотидного компонента с 3'-оксигруппой нуклеозидного.— Изв. Сиб. отд. АН СССР, 1981, № 4, сер. хим. наук, вып. 2, с. 131—138.
13. *Дроздова А. И., Зарытова В. Ф., Халимская Л. М.* Сравнение скоростей образования межнуклеотидной связи при использовании *n*-хлорфениловых эфиров нуклеозид-3' и 5'-фосфатов в химическом синтезе динуклеозидфосфатов триэфирным методом.— Изв. Сиб. отд. АН СССР, 1980, № 2, сер. хим. наук, вып. 1, с. 125—130.
14. *Петренко В. Л., Поздняков П. И., Сиволобова Г. Ф., Шубина Т. Н.* Неионные аналоги олигонуклеотидов. Синтез алкиловых триэфиров олигонуклеотидов реакцией перезертификации.— Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 3, с. 431—435.
15. *Зарытова В. Ф., Карпова Г. Г., Пичко Н. П., Шешегова Е. А.* Получение алкилирующих производных этиловых эфиров олигонуклеотидов и их взаимодействие с poly(A).— Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 4, с. 534—541.
16. Schwarz Bioresearch Radiochemical Catalog. N. Y.: 1974, p. 51.
17. *Беликова А. М., Гринева Н. И.* Алкилирующие производные *n*-аминобензилиденуридина.— Изв. Сиб. отд. АН СССР, 1966, № 11, сер. хим. наук, вып. 3, с. 79—83.
18. *Гринева Н. И., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г.* Алкилирующие производные компонент нуклеиновых кислот. VII. Метилловый эфир 2',3'-O-[4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензилиден]уридина-5'-фосфата.— Ж. общ. химии, 1970, т. 40, с. 215—222.
19. *Бенимечкая Л. З., Гринева Н. И., Карпова Г. Г., Пичко Н. П., Чмигова Т. А.* О механизме алкилирования нуклеиновых кислот в комплементарных комплексах. Кинетика алкилирования РНК и ДНК 2',3'-O-[4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензилиден]олигонуклеотидами.— Биоорган. химия, 1977, т. 3, № 7, с. 903—913.
20. *Гринева Н. И., Карпова Г. Г.* Химическая направленность и позиционная специфичность алкилирования рибосомальной РНК 2',3'-O-[4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензилиден]олигонуклеотидами в комплементарном комплексе.— Биоорган. химия, 1975, т. 1, № 5, с. 588—597.
21. *Бенимечкая Л. З., Карпова Г. Г., Гринева Н. И.* Алкилированные основания, образующиеся при 5'-комплементарно-адресованной модификации ДНК и кинетика их элиминирования в условиях алкилирования.— Биоорган. химия, 1978, т. 4, № 10, с. 1372—1381.
22. *Stawinski J., Hozumi T., Narang S. A., Bahl C. P., Wu R.* Arylsulfonyltetrazoles, new coupling reagents and further improvements in the triester method for the synthesis of deoxyribooligonucleotides.— Nucleic Acids Res., 1977, v. 4, № 2, p. 353—371.
23. *Adamiak R. W., Banciszewska M. Z., Biala E., Crzeskowiak K., Kierzek R., Kroszowski A., Morkiewicz W. T., Wiewiorowski M.* An improved preparation of nucleoside 3'-phosphotriester their ¹H-NMR characterization and new conditions for removal of Z'-cyanethyl group.— Nucleic Acids Res., 1976, v. 3, № 12, p. 3397—3408.
24. *van Boom I. H., Burgers P. M. I.* Use of levulinic acid in the protection of oligonucleotides via the modified phosphotriester method: synthesis of decanucleotide U-A-U-A-U-A-U-A-U-A.— Tetrahedron Lett., 1976, № 52, p. 4875—4878.
25. *Власов В. В., Гринева Н. И., Кнорре Д. Г.* Алкилирующие производные компонент нуклеиновых кислот. IV. Ионизация 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензальдегида и его ацеталей.— Изв. Сиб. отд. АН СССР, 1969, № 2, сер. хим. наук, вып. 1, с. 104—109.

26. *Георгиев Г. П.* Методы определения, выделения и фракционирования нуклеиновых кислот.— В кн.: Химия и биохимия нуклеиновых кислот. Л.: Медицина, 1968, с. 96–98.
27. *Philipson L., Wall R., Glickman G., Darnell E.* Addition of polyadenylate sequences to virus-specific RNA during adenovirus replication.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1971, v. 68, № 11, p. 2806–2809.
28. *Edmonds M., Caramela M. G.* The isolation and characterization of adenosine monophosphaterich polynucleotides synthesized by Ehrlich ascites cells.— *J. Biol. Chem.*, 1969, v. 244, № 5, p. 1314–1324.
29. *Миллер Дж.* Эксперименты в молекулярной генетике. М.: Мир, 1976, с. 309–310.
30. *Dreus I., Brawerman G.* Alterations in the nature of ribonucleic acid synthesized in rat liver during regeneration and after cortisol administration.— *J. Biol. Chem.*, 1967, v. 242, № 5, p. 801–808.

Поступила в редакцию
15.IV.1981

COMPLEMENTARY ADDRESSED ALKYLATION OF POLY(A)-FRAGMENTS OF mRNA IN KREBS ASCITES TUMOR CELLS

ZARYTOVA V. F., IVANOVA E. M., KARPOVA G. G., KNORRE D. G.,
PICHKO N. P., RYTE A. S., STEPHANOVICH L. E.

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

Alkylating derivative $[^{14}\text{C}]\text{-}[\text{Tp}(\text{Et})_9\text{UCHrCl}]$ was synthesized as a mixture of diastereomers by introducing the 2',3'-O-[4-(N-2-chloroethyl-N-methylamino)]-benzylidene fragment into $[\text{Tp}(\text{Et})_9\text{U}]$. The extent of poly(A) modification with $[^{14}\text{C}]\text{-}[\text{Tp}(\text{Et})_9\text{UCHrCl}]$ within the complementary complex of poly(A) with this reagent is 2-3 order of magnitude greater than that for the alkylation in solution without intermediate complex formation. The reagent efficiently penetrates into Krebs ascites tumor cells and specifically alkylates the complementary poly(A) sequences of nucleic acids. The extent of modification of mRNA poly(A) fragments is 2-fold higher than that of the rest RNA and DNA. The composition of alkylated nucleic acid bases in the cell is similar to that found earlier for the complementary addressed in vitro alkylation with the nonesterified oligonucleotide derivatives.