



УДК 577.113.4

© 1993 Т. П. Волощук, Ю. В. Пацковский,
А. И. Потопальский

АЛКИЛИРОВАНИЕ КОМПОНЕНТОВ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ЭТИЛЕНИМИНОМ И ЕГО ПРОИЗВОДНЫМИ 3*. АЛКИЛИРОВАНИЕ НУКЛЕОТИДОВ

Институт молекулярной биологии и генетики АН Украины, Киев

Посредством методов ионообменной хроматографии на целлюлозе, обращенно-фазовой и ионообменной ВЭЖХ разделены, а методами кислотного гидролиза, УФ-спектроскопии и ТСХ идентифицированы продукты алкилирования ряда мононуклеотидов этиленимином и тиотэфом. Показано, что в нейтральных условиях реакции алкилирования протекают как по фосфатной группе, так и по остатку гетероциклического основания нуклеотида. Подкисление среды способствует увеличению выхода продуктов, модифицированных по основанию.

Принято считать, что фосфатные группы мононуклеотидов при рН 6,5—7,0 алкилируются различными агентами быстрее, чем гетероциклические ядра оснований, поскольку при этом рН фосфатная группа имеет двойной отрицательный заряд и является более сильным нуклеофилом [2, 3]. Однако в тех же условиях алкилирование АТР окисью этилена по концевой фосфатной группе протекает вдвое медленнее, чем по основанию [4].

Как показано в работах [5, 6], в мягких условиях при использовании в качестве алкилирующих агентов этиленимина и тиотэфа алкилирование нуклеозидфосфатов протекает в основном по остатку фосфорной кислоты, а из оснований в составе ДНК и ее компонентов модифицируется лишь гуанин. При более длительном алкилировании ДНК (24 ч вместо 2) дополнительно образуются продукты модификации по остаткам аденина [7]. Поскольку до сих пор все же неясно, как, в какой степени и в каких условиях алкилируются другие, кроме гуанина, основания в составе нуклеотидов, мы предприняли настоящее исследование, в котором изучили влияние варьирования условий (в основном рН) на направление реакций алкилирования мононуклеотидов.

На кривой 1 рис. 1 представлена хроматограмма продуктов алкилирования АМР тиотэфом в присутствии протонодонора HClO_4 [8]. Две фракции (А и Б) элюированы водой, остальные (В—Е), в том числе фракция немодифицированного АМР (фракция Е) — градиентом концентрации NaCl . При алкилировании без протонодонора характер хроматограммы сохраняется, но выход всех фракций, кроме фракции Е, уменьшается, а фракция Б отсутствует вовсе (рис. 1, кривая 3).

Разделение в тех же условиях контрольной смеси, содержащей аденин, аденозин и АМР, показало, что водой с колонки смываются основание и нуклеозид (на рис. 1 этому соответствует фракция А), а затем при концентрации NaCl 0,08—0,09 М элюируется АМР. Отсюда следует, что фракции А и Б отвечают

* Сообщение 2 см. [1]. Сокращения: тиотэф — триэтилтиофосфамид.

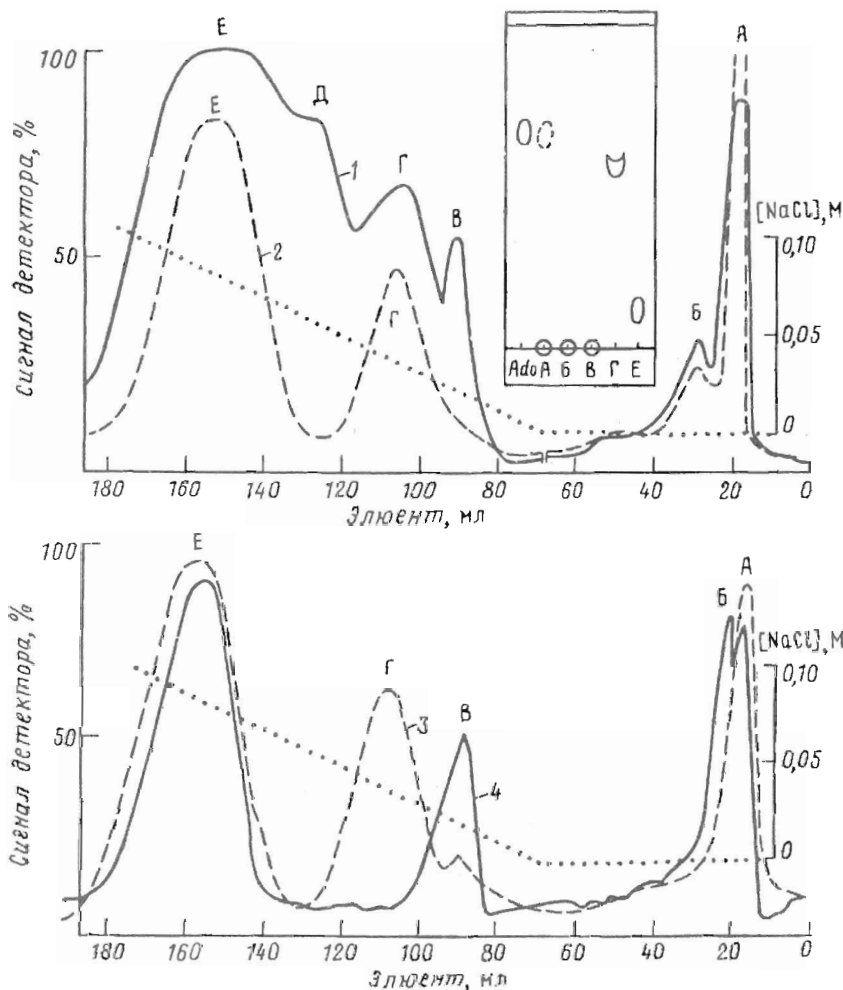
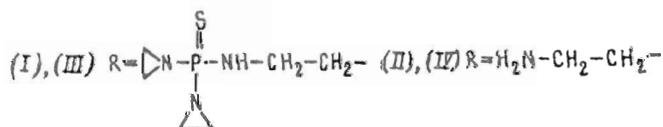
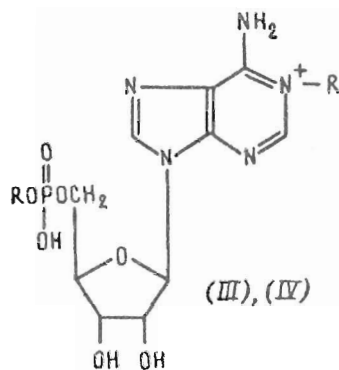
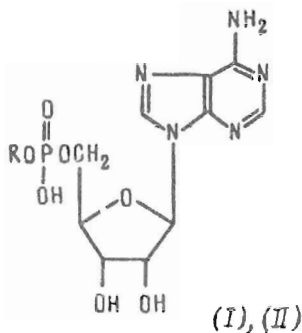


Рис. 1. Хроматография на целлюлозе DE-52 продуктов алкилирования АМР в присутствии HClO_4 и ТСХ фракций А—Е кривой 1. Условия алкилирования — соотношение АМР: тиотэф, рН, время (ч) и температура реакции ($^{\circ}\text{C}$): 1 — 1 : 2; 4,5; 24; 20; 2 — 1 : 2; 4,5; 1 год; 20; 3 — 3 : 2; 8; 5; 37; 4 — 1 : 1; 1; 24; 20. Пунктиром обозначен градиент концентраций NaCl . Значения А—Е — в тексте

продуктам гидролиза АМР; как будет показано ниже, это преимущественно алкилированные нуклеотиды. Такой вывод подтверждает УФ-спектр фракции Б, полностью идентичный спектру алкилированного по основанию аденозина — λ_{max} в щелочной среде 263, 270, 278 и 300 нм (ср. [1]).

Поскольку УФ-спектры адениловых кислот, алкилированных по разным нуклеофильным центрам, мало отличаются друг от друга и от спектров незамещенного АМР [2], для идентификации веществ во фракциях мы проводили их кислотный гидролиз (пробы для гидролиза отбирались на вершинах пиков). Образующиеся при гидролизе основания затем разделяли обращенно-фазовой ВЭЖХ. Измерение спектров выделенных оснований показало, что фракции Г рис. 1 (основной продукт гидролизата — аденин) содержат АМР, алкилированный по фосфатной группе (I, схема), а фракции В (продукт гидролиза — N1-алкиладенин) — АМР, алкилированный по основанию и остатку фосфорной кислоты (III). Последний вывод сделан исходя из того, что АМР, алкилированный только по основанию и имеющий, подобно незамещенному нуклеотиду, две свободные ОН-группы в остатке фосфорной кислоты, должен удерживаться на колонке прочнее, чем



нуклеотид, замещенный по фосфату (фракция В), и элюироваться после него (фракция Д).

Заслуживает упоминания и тот факт, что после длительного (примерно 1 год) хранения суммарной алкилированной смеси, представленной кривой 1, пики В и Д исчезают (кривая 2) и одновременно резко возрастает количество вещества фракции А за счет увеличения содержания алкилированного аденозина.

Данные спектроскопии ^{13}C -ЯМР продукта из фракции Г подтвердили, что это АМР, алкилированный по остатку фосфорной кислоты: отсутствие сдвига сигналов атомов углерода С2—С3 по сравнению со спектром исходного АМР, сдвиг сигнала С5' остатка рибозы на 1,1 м. д. в слабое поле и сдвиг сигнала С4' на 1,2 м. д. в сильное поле характерно для диэфиров [9—10]. Кроме того, отмечено выраженное изменение в спектре ^{31}P -ЯМР сигнала химического сдвига атома фосфора нуклеотида (порядка 3 м. д.), также характерное для алкилированной фосфатной группы. Аналогично данным работ [5, 6] в спектре 1H -ЯМР продукта из фракции Г обнаружены при δ 3,01 и 3,83 м. д. сигналы двух метиленовых групп, связанных между собой и фосфатом, и мультиплет сигналов протонов двух этилениминовых групп при δ 1,87 м. д., что также свидетельствует о протекании фосфаминоалкилирования.

Изучение влияния различных значений рН и соотношения реагентов на направление реакций алкилирования показало, что алкилирование по фосфатной группе нуклеотида преимущественно протекает в слабощелочной среде и при избытке АМР (рис. 1, кривая 3). Наблюдаемое при этом увеличение фракции А объясняется известной лабильностью нуклеотидных диэфиров в щелочной среде. В нейтральной, слабокислой, а в случае избытка тиотэфа и в слабощелочной средах алкилирование АМР протекает по обоим нуклеофильным центрам, и

хроматограммы таких смесей в большей или меньшей степени повторяют кривую 1. Алкилирование при pH 1 приводит к увеличению выхода фракций А и Б (т. е. продуктов гидролиза), а сохраняющийся продукт алкилирования элюируется в виде одной фракции В (кривая 4), содержащей нуклеотид, алкилированный по фосфату и основанию.

Отдельные фракции кривой 1 были также проанализированы ТСХ (см. рис. 1). Как видно из хроматограммы, продукт из фракции Г по подвижности близок аденозину, а небольшое отставание и искаженная форма пятна обусловлены присутствием в продукте NaCl, что подтверждено ТСХ в тех же условиях смесей аденозина и NaCl. Алкилированный по фосфату нуклеотид в щелочной системе растворителей (pH 11) претерпевает, очевидно, гидролиз до аденозина, о чем свидетельствует УФ-спектр элюата (0,1 н. HCl) из пятна, совпадающий со спектром незамещенного аденозина.

То же следует сказать и о фракции В. Если это продукт замещения по основанию и фосфату, то в указанной системе он должен разлагаться до алкил-аденозина еще легче, а его нулевая подвижность свидетельствует об N1-фосфаминоэтировании [1]. В пользу модификации по положению N1 говорят и результаты алкилирования при pH 1, где реакция по N⁶-положению, равно как и перегруппировка N1→N⁶, невозможны. При использовании нейтральной системы растворителей (система А, описанная в работе [1]) продукты алкилирования не отделялись от AMP.

По данным ТСХ, фракция А неоднородна и содержит как незамещенный, так и алкилированный по основанию аденозин, а фракция Б — только аденозин, модифицированный по гетероциклу. Таким образом, алкилированный по основанию нуклеозид элюируется в виде двух фракций. Действительный состав этих фракций удалось выяснить при разделении реакционных смесей методами ионообменной и обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Результаты разделения ионообменной ВЭЖХ продуктов алкилирования AMP тиотэфом в нейтральной среде (точнее, в отсутствие протонодонора) представлены на рис. 2а. Первая фракция (А), содержащая аденозин, и последняя (на рисунке они отмечены прерывистой линией) присутствуют в исходном AMP, тогда как три фракции, выходящие перед AMP (В, Г, Д), — это продукты алкилирования. Подкисление среды до pH 4,5 (алкилирование иммониевым катионом [8]) приводит, наряду с увеличением общего выхода продуктов реакции, к появлению новой фракции Б (рис. 2б). Примечательно, что общая картина разделения смеси на этом рисунке практически полностью совпадает с представленной на рис. 1 (кривая 1), за исключением фракции Д, в случае ВЭЖХ отделяющейся лучше.

При кислотном гидролизе продукта из фракции А рис. 2б (1 н. HCl, 100° С, 1 ч) и анализе продуктов гидролиза обращенно-фазовой ВЭЖХ были обнаружены свободный аденин и его замещенные аналоги, причем содержание алкиладенинов в 2—3 раза превышало содержание незамещенного основания (рис. 3). Аналогичная хроматограмма получена и для гидролизата фракции Б, отличия состоят в большем количестве N⁶-замещенного и в отсутствии незамещенного аденина. Появление продуктов N⁶-замещения в реакциях с исходным pH 4,5, по-видимому, связано с повышением в ходе реакции значения pH среды до нейтрального, когда становится возможной перегруппировка N1→N⁶.

При алкилировании AMP этиленимином (рис. 2в, кривая 1) фракция А оставалась такой же, как в исходном нуклеотиде, и, следовательно, фракция Б представляет собой не что иное, как аминоэтилированный аденозин, частично удерживаемый колонкой благодаря высокой основности первичной аминогруппы алкильного радикала.

Поэтому мы полагаем, что появление фракции Б в случае алкилирования AMP тиотэфом (рис. 2б) обусловлено присутствием в реакции хлорной кислоты, приводящей к гидролизу фосфамидных связей алкилирующего агента и к образованию аминоэтильных производных, тогда как в реакции без кислоты такая фракция не образуется (рис. 2а).

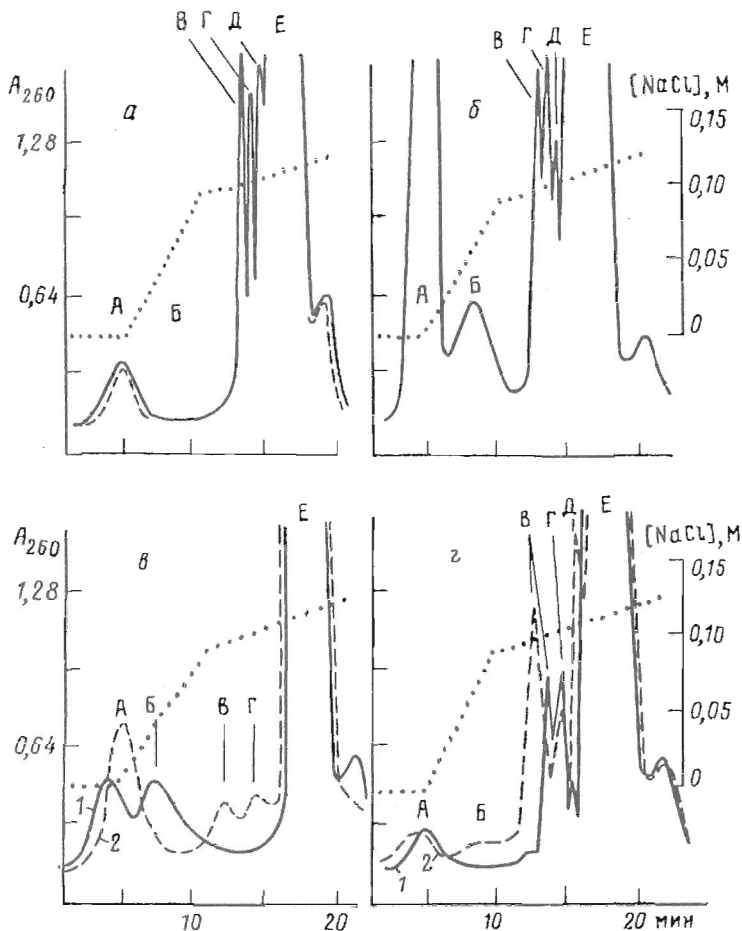


Рис. 2. Ионообменная ВЭЖХ на колонке Bio-Gel TSK DEAE-5-PW (7,5 × 75 мм) в градиенте концентраций NaCl продуктов алкилирования нуклеотидов. Приведены номер кривой, нуклеотид + агент + протонодonor (если применялся) (их соотношение), рН. а: —, AMP + тиотэф (1 : 2), 7; б: —, AMP + тиотэф + HClO₄ (1 : 1 : 1), 4,5; в: 1, AMP + этиленимин (1 : 2), 9,5—10; в: 2, dCMP + тиотэф (1 : 4), 7,0; з: 1, GMP + тиотэф (1 : 1), 7,0; з: 2, AMP + этиленимин + HClO₄ (1 : 2 : 2), 7,0

При алкилировании AMP этиленимином (рН среды 9,5—10) в отсутствие HClO₄ фракции В — Д не обнаружены (рис. 2в, кривая 1). Мы объясняем это тем, что вошедшие в молекулу AMP аминоэтильные остатки обуславливают сродство модифицированных нуклеотидов к анионообменнику, благодаря чему они элюируются с колонки вместе с немодифицированным AMP. Это подтвердилось в экспериментах по разделению таких смесей в режиме обращенно-фазовой ВЭЖХ. Фракция на рис. 2в (кривая 1), соответствующая немодифицированному нуклеотиду, неоднородна и содержит кроме AMP не менее двух продуктов алкилирования (рис. 4). Детально продукты этого хроматографирования не изучались, однако кислотный гидролиз фракций показал, что одна из них (А) в качестве основного компонента гидролизата содержала N⁶-алкиладенин, тогда как две другие (Б и В) — аденин; одна из этих фракций представляет собой, следовательно, нуклеотид, алкилированный по фосфату. AMP, алкилированный этиленимином в присутствии HClO₄ (рН 7), когда аминоэтильная группа выступает в солевой форме (—NH₃ClO₄⁻), проявляет на хроматограмме (рис. 2з, кривая 2) те же фракции, что и AMP, алкилированный тиотэфом. При этом, очевидно, во фракции Г элюируется соединение (II), а во фракции В — соединение (IV).

Аналогично алкилированию AMP протекает в нейтральных и слабокислых

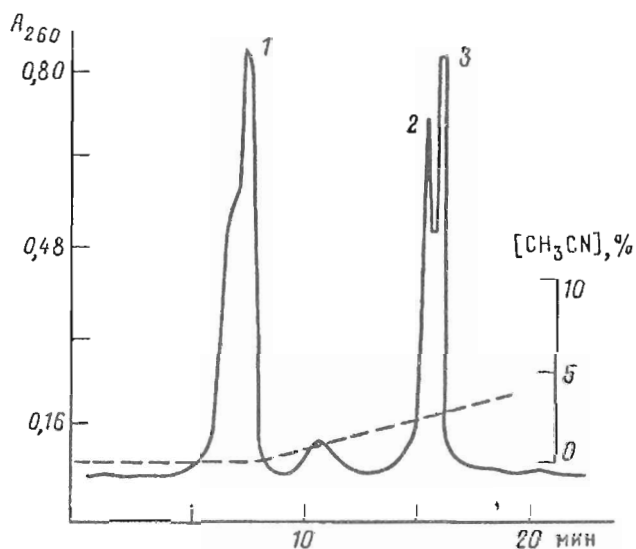


Рис. 3. ВЭЖХ гидролизата фракции А рис. 2б на колонке Bio-Sil ODS-5S в градиенте концентрации ацетонитрила в 0,05 М натрий-фосфатном буфере, рН 7,0. 1 — 1-R-Adc, 2 — N⁶-R-Adc, 3 — Adc

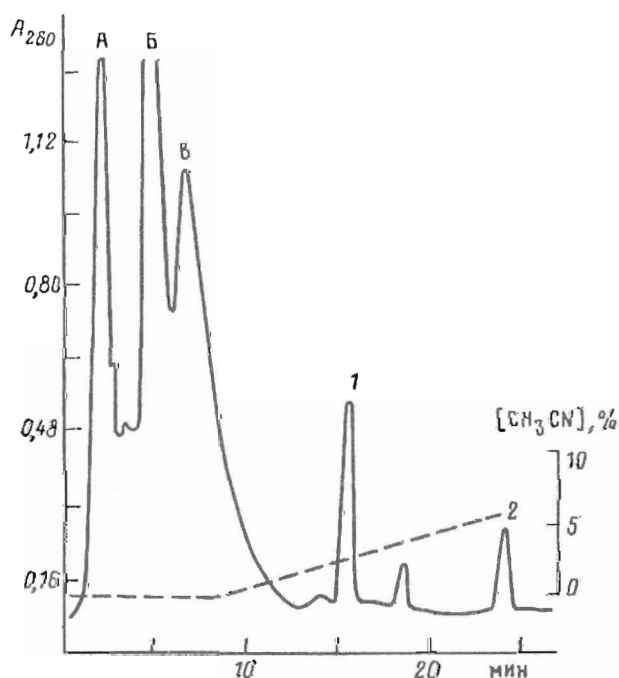


Рис. 4. ВЭЖХ продуктов алкилирования АМР этиленмином в щелочной среде без протонодонора на колонке Bio-Sil ODS-5S. 1 — R-Ado, 2 — Ado

средах алкилирование: и других изученных нами нуклеотидов — рибо- и дезоксирибонуклеозид-5'-фосфатов (GMP, CMP, TMP и UMP). Хроматограммы разделения продуктов алкилирования dCMP и GMP в нейтральной среде тиотэфом приведены на рис. 2а (кривая 2) и 2г (кривая 1). Отличие, характерное для нуклеотидов пиримидинового ряда, заключается в отсутствии фракции Д (рис. 2в, кривая 2) и объясняется, на наш взгляд, следующим.

Из сравнения фракций В и Д, алкилированных по основанию, можно видеть,

что алкилирование только по основанию протекает в меньшей степени. Более эффективным оказывается алкилирование основания в составе моноаниона, т. е. нуклеотида, уже модифицированного по фосфату и имеющего уменьшенный отрицательный заряд на фосфатной группе. Это согласуется с данными работы [11], где отмечается, что алкилирование остатка основания в составе poly(A) протекает в 2—3 раза эффективнее, чем в составе моноклеотида.

На основании изложенного можно предположить, что в самом начале реакции атака алкилирующего агента направлена на наиболее реакционноспособные центры нуклеотида — фосфатную группу в виде дианиона и N7-положение GMP. Затем, уже в составе моноаниона, идет алкилирование по остаткам оснований в соответствии с их нуклеофильностью. Именно этим объясняется отсутствие фракции Д при алкилировании dCMP, гетероциклическое основание которого менее реакционноспособно, чем пуриновые основания, и может вступать в реакцию, только находясь в составе моноаниона. Дальнейшее увеличение времени реакции приводит к разложению алкилированных нуклеотидов (в особенности по основанию), а для производных гуанина — еще и к размыканию имидазольного кольца. Это в свою очередь приводит к увеличению выхода алкилированных нуклеозидов, составляющих фракции А и Б.

Таким образом, представленные данные свидетельствуют о принципиальной возможности алкилирования этиленмином и его производными практически всех основных гетероциклов пуриновых и пиримидиновых оснований нуклеотидов, причем направленность модификации оснований полностью совпадает с направленностью реакций в соответствующих нуклеозидах [1]. Эффективность алкилирования зависит как от условий алкилирования (возрастает при подкислении среды), так и от реакционной способности остатков оснований, и для изученных нами нуклеотидов резко уменьшается в ряду гуанин — аденин — цитозин — урацил — тимин. Следует отметить, что для TMP продукты алкилирования нами не выделены. Заключение об отсутствии или крайне низкой модификации тимидин-5'-фосфата сделано на основании сравнения хроматограмм (до и после алкилирования), которые практически не различались.

Экспериментальная часть

В работе использованы нуклеотиды фирмы Reanal (Венгрия). Тиотэф получен по методике [12]. Этиленмин отечественного производства перегоняли и хранили над NaOH. Алкилированные смеси нуклеотидов разделяли на колонке (20 × 30 мм) с целлюлозой DE-52, предварительно обработанной раствором хлористого аммония (периодическое перемешивание в течение 2—3 ч в 2 М NH₄Cl и тщательная промывка водой). Элюирование с колонки проводили вначале водой (до отсутствия поглощения в УФ), затем в градиенте 0,05—0,25 М NaCl (2 × 150 мл), pH 6,0. ВЭЖХ алкилированных смесей проводили на приборе фирмы Bio-Rad (США) с проточным УФ-детектором типа UV monitor, модель 1306. Для разделения гидролизатов в режиме обращенно-фазовой ВЭЖХ использовали колонку (4 × 150 мм) Bio-Sil ODS-5S (Bio-Rad, США) при скорости элюирования 0,7 мл/мин и давлении 80 атм в градиенте ацетонитрил — 0,05 М натрий-фосфатный буфер, pH 7,0 (0—20% ацетонитрила). Ионобменную ВЭЖХ проводили на колонке (7,5 × 75 мм) Bio-Gel TSK DEAE-5-PW (Bio-Rad) при скорости элюирования 1 мл/мин и рабочем давлении 25 атм в градиенте концентрации NaCl (0,005—1,0 М), pH 6,0. Разделение методом ТСХ осуществляли на пластинках Silufol UV-254 в щелочной системе растворителей — изопропанол — аммиак (25%) — вода, 7 : 1 : 2. Вещества на пластинках обнаруживали с помощью прибора «Хроматоскоп-М» отечественного производства.

Спектры ЯМР записывали на приборе Gemini-200 фирмы Varian (США) с рабочей частотой 50,4 МГц для ядер ¹³C и 199,96 МГц для ¹H. Спектры ПМР снимали в D₂O, спектры ¹³C-ЯМР — в D₂O или DMSO, внутренний стандарт —

DMSO-*d*₆. Спектры ³¹P-ЯМР регистрировали на приборе Bruker WP 200 (ФРГ) с рабочей частотой 81,03 МГц, внутренний стандарт — 85% Н₃Р₀4.

Гидролиз проб, отобранных на вершине пиков исследуемых фракций, проводили в 1 н. НСl при 100° С в течение 1 ч.

Алкилирование нуклеотидов в отсутствие протонодонора. К 0,2 ммоль алкилирующего агента, растворенного в 1,5 мл воды, приливали раствор 0,1 ммоль нуклеотида в 0,5 мл воды. Смесь выдерживали 12—16 ч при 37° С или 1 сут при 20° С. После экстракции непрореагировавшего алкилирующего агента эфиром или хлороформом смесь наносили на колонку. Проба для ВЭЖХ — 2 мг, для ионообменной хроматографии на целлюлозе — 30 мг.

Алкилирование нуклеотидов в слабокислой или нейтральной среде. В зависимости от требований эксперимента изменяли соотношение реагентов или рН среды (см. подписи к рисункам), приливая раствор разбавленной НСlO₄. Подробнее об алкилировании в присутствии НСlO₄ (иммониевым катионом) см. [8].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Волощук Т. П., Пацковский Ю. В., Потопальский А. И. // *Биоорганическая химия*. 1993. Т. 19. № 4. С. 483—492.
2. Singer B. // *Progr. in Nucl. Acids Res. and Mol. Biol.* V. 15/Ed. W. E. Cohn. N. Y.: Acad. Press, 1975. P. 219—280.
3. Шабарова З. А., Богданов А. А. *Химия нуклеиновых кислот и их компонентов*. М.: Химия, 1978. 584 с.
4. Windmueller H. G., Kaplan N. O. // *J. Biol. Chem.* 1961. V. 263. № 10. P. 216—226.
5. Серебряный А. М., Андриевский Г. В., Беккер А. Р., Сибельдина Л. А., Поволоцкая М. И. // *Биоорганическая химия*. 1986. Т. 12. № 4. С. 499—506.
6. Серебряный А. М., Андриевский Г. В., Беккер А. Р., Сибельдина Л. А., Шарова О. Л. // *Биоорганическая химия*. 1987. Т. 13. № 6. С. 786—792.
7. Пацковский Ю. В., Волощук Т. П., Потопальский А. И. // *Биополимеры и клетка*. 1989. Т. 5. № 5. С. 64—70.
8. Волощук Т. П., Пацковский Ю. В., Потопальский А. И. // *Биоорганическая химия*. 1990. Т. 16. № 7. С. 981—990.
9. Польшаков В. И., Дворянцева Г. Г., Шейнкер Ю. Н., Чернов В. А., Сафонова Т. С. // *Хим.-фарм. журн.* 1985. № 6. С. 661—667.
10. Польшаков В. И., Дворянцева Г. Г., Шейнкер Ю. Н., Сафонова Т. С. // *Хим.-фарм. журн.* 1987. № 5. С. 528—536.
11. Price Ch. C., Gaucher M., Koneru P., Shibakawa R., Sowa J. R., Yamaguchi M. // *Biochim. et biophys. acta*. 1968. № 166. P. 327—359.
12. Лидак М. Ю., Гиллер С. А., Медне А. Я. *ТиоТЭФА*. Рига: Изд. АН ЛатвССР. 1961. С. 5—8.

Поступила в редакцию
16.I.1991

После доработки
3.VII.1992

T. P. Voloshchuk, Yu. V. Patskovsky, A. I. Potopalsky

ALKYLATION OF NUCLEIC ACID COMPONENTS BY ETHYLENIMINE DERIVATIVES. 3. ALKYLATION OF NUCLEOTIDES

Institute of Molecular Biology and Genetics, Ukrainian Academy of Sciences, Kiev

Alkylation of mononucleotides by ethylenimine and thioTEPA has been studied with the use of ion-exchange chromatography, NMR and UV spectroscopy. Under neutral conditions both phosphate group and heterocyclic base are alkylated, whereas in a slightly acidic medium it is bases that are affected predominantly.