



УДК 577.113.4

АЛКИЛИРОВАНИЕ КОМПОНЕНТОВ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ЭТИЛЕНИМИНОМ И ЕГО ПРОИЗВОДНЫМИ.

IV*. АЛКИЛИРОВАНИЕ ГОМОПОЛИНУКЛЕОТИДОВ И ДНК

© 1999 г. Т. П. Волощук[#], Ю. В. Пацковский, А. И. Потопальский*Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины,
252143, Киев, ул. Заболотного, 150*

Поступила в редакцию 24.02.98 г. Принята к печати 22.01.99 г.

Изучены реакции алкилирования гомополинуклеотидов и ДНК тиотэфом и моноазиридиндиэтилфосфатом. Установлено, что модификация протекает по остаткам нуклеиновых оснований и концевым фосфатным группам. Межнуклеотидные фосфатные группы участия в реакциях алкилирования не принимают. Показано, что в poly(A) главным центром модификации основания выступает азот в положении 1. В меньших количествах образуются продукты алкилирования по N⁶ и N³ аденина. В poly(G) алкилирование протекает преимущественно по N⁷ и в незначительной степени по N¹ гуанина; в poly(C) слабо, а в poly(U) еще труднее алкилируется N³ пиримидинового основания. Главные сайты алкилирования ДНК – N⁷ гуанина и N³ аденина. Алкилирование по этим сайтам приводит к денатурации ДНК и появлению продуктов модификации по N¹ и N⁶ аденина, N¹ гуанина и N³ цитозина. Повышение рН среды и ионной силы раствора, а также денатурация ДНК замедляет скорость реакций, тогда как фрагментирование ультразвуком увеличивает ее. Алкилирование приводит к снижению температуры плавления, изменению КД- и УФ-спектров и появлению люминесценции ДНК. Для разделения реакционных смесей и идентификации продуктов алкилирования ДНК и полинуклеотидов применены методы химического гидролиза, ионообменной и обращенно-фазовой ВЭЖХ, УФ-спектроскопии.

Ключевые слова: алкилирование; ДНК, нуклеиновые основания; тиотэф; нуклеотиды.

Настоящая работа – завершающий этап в исследовании реакций алкилирования компонентов НК этиленимином и его производными – тиотэфом и МЕР, и посвящена вопросу алкилирования гомополинуклеотидов и ДНК. В предыдущих сообщениях представлены результаты исследований соответствующих реакций свободных нуклеиновых оснований [1], нуклеозидов [2] и нуклеотидов [3].

Алкилирование НК и их компонентов с выделением продуктов модификации наиболее активно начали проводить 30–40 лет назад. Это были прежде всего работы Лавлея, Брукса и Прайса с сотр. [4, 5]. В них авторы наряду с такими известными алкилирующими агентами, как диазометан, диалкилсульфаты, алкилметансульфонаты и др., применяли иприт и его азотсодержащие аналоги – N-2-хлорэтилморфолин и N,N-диэтил-2-хлорэтиламин (так называемый азотистый иприт – (C₂H₅)₂NCH₂CH₂Cl). Два последние относятся к типу соединений, которые, подобно этиленимину и

его производным, в реакциях алкилирования образуют активные промежуточные частицы – иммониевые катионы [5].

Первыми продуктами, выделенными в значительных количествах после алкилирования НК и гидролиза, были метилированные основания – 7-MeGua и 3-MeAde (алкилирующий агент – метилметансульфонат). В меньших количествах получены 1-MeAde и 3-MeCyt. В случае использования аналогичных этилирующих агентов идентифицированы лишь 7-EtGua и 3-EtAde [4]. Кроме того, для азотистого иприта была установлена специфическая направленность действия. Наибольшая частота модификации обнаружена для последовательностей ДНК, где гуаниновые основания стоят рядом. Для изолированных оснований она значительно ниже [6].

Алкилирование нативной ДНК диэтилэтилениммониевым ионом [5] в течение первых 2 ч при 40°C и рН 7.0 приводит к образованию одного продукта модификации – 7-алкилгуанина. Через 48 ч появляется в значительном количестве N⁶-замещенный аденин. Алкилирование в течение 2 ч денатурированной ДНК в тех же условиях дает оба продукта примерно в равных количествах. Авторами также установлено, что модификация гуа-

* Сообщения I – III см. [1–3].

Сокращения: МЕР – моноазиридиндиэтилфосфат; тиотэф – триэтилендиофосфамид; НК – нуклеиновые кислоты.

Автор для переписки (факс: (044) 266-07-59; тел.: (044) 266-11-39).

нина в нативной ДНК протекает почти в 50 раз, а в денатурированной в 7 раз быстрее, чем в гуанозине или GMP. Адениновый остаток в нативной ДНК, напротив, малоактивен.

Первые работы по алкилированию ДНК тиотэфом были посвящены в основном изучению мутагенного и токсического эффектов самого алкилирующего агента в сравнении с такими же эффектами интактных и модифицированных тиотэфом нуклеиновых кислот [7]. Было установлено, что эмбриональная и алкилированная тиотэфом ДНК человека являются слабыми мутагенами примерно одинаковой активности. Они лишь в три раза повышали частоту спонтанных мутаций, тогда как мутагенное воздействие тиотэфа было почти в 20 раз сильнее. Показано также, что алкилированные тиотэфом ДНК и РНК ингибировали рост опухоли томатов на 41 и 62% соответственно, тогда как исходные немодифицированные кислоты никак не влияли на развитие опухоли. О взаимодействии тиотэфа с нуклеиновыми кислотами авторы судили по присутствию в алкилированных НК серы и этилениминовых групп.

Для других авторов свидетельством в пользу протекания реакции модификации нуклеиновых кислот тиотэфом служило изменение параметров кривых плавления этих кислот [8] либо появление в алкилированных ДНК люминесценции, свидетельствующей о модификации кислоты по положению 7 гуанина [9]. Продукты алкилирования при этом авторами не выделялись.

В настоящее время установлено, что алкилирование тиотэфом протекает через образование иммониевых катионов (Im^+), образующихся в результате протонирования иминогрупп и последующего размыкания азиридиновых циклов тиотэфа по N-C-связи [1, 10]. Нами впервые [1] были выделены и идентифицированы продукты алкилирования тиотэфом основных гетероциклических оснований, которые послужили в дальнейшем маркерами при установлении строения алкилированных нуклеозидов и нуклеотидов, а в настоящей работе и для алкилированных ДНК и полинуклеотидов.

Что касается алкилирования этиленимином и тиотэфом фосфатных групп полинуклеотидов и ДНК, то хотя в 1952 г. и было впервые сообщено о способности производных этиленимина алкилировать межнуклеотидные фосфатные группы в ДНК [11], это не нашло подтверждения ни у других авторов [12], ни в наших исследованиях, как это будет показано ниже.

Ранее [3] нами показано, что в мононуклеотидах в нейтральных и слабощелочных средах алкилирование первоначально протекает по одной из OH-групп фосфата (в этих условиях фосфатная группа несет два отрицательных заряда [13]), после чего уже в составе моноаниона алкилирует

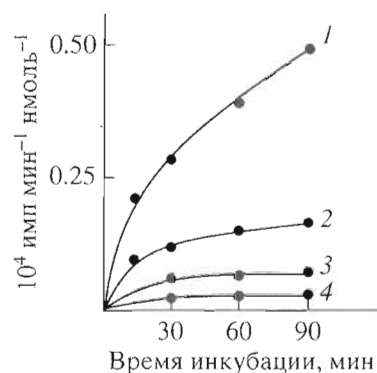


Рис. 1. Алкилирование гомополинуклеотидов ^{35}S -тиотэфом: 1 — poly(G), 2 — poly(A), 3 — poly(C), 4 — poly(U). Условия опытов приведены в "Эксперимент. части".

ется гетероциклическое основание. Алкилирование нуклеотидов по второй OH-группе фосфата не наблюдалось. Межнуклеотидная фосфатная группа полинуклеотида имеет одну OH-группу, подобную второй гидроксильной группе алкилированного мононуклеотида, не вступающей в реакции алкилирования. Поэтому в полинуклеотидах алкилироваться могут только концевые фосфаты, имеющие структуру дианиона, и нуклеиновые основания. А поскольку оснований в полинуклеотиде больше, чем концевых фосфатных групп, то алкилирование практически сразу идет по основаниям, чем и объясняется отмеченный Прайсом [5] факт, что алкилирование оснований в составе poly(A), протекает в 2–3 раза эффективнее, чем в составе аденозинмонофосфорной кислоты (AMP). Действительно, если бы в реакцию вступали и межнуклеотидные фосфатные группы, разница в степени алкилирования различных гомополинуклеотидов была бы незначительной. Приведенные на рис. 1 данные показывают, что скорость алкилирования определяется природой нуклеинового основания полинуклеотида, и poly(G) алкилируется намного эффективнее других гомополинуклеотидов. Скорость алкилирования резко падает в ряду: poly(G) \gg poly(A) \gg poly(C) > poly(U).

Поскольку для образования иона Im^+ необходимы протоны, реакции алкилирования проводят в протонных растворителях (вода, спирты). Но pH таких растворов часто бывает очень высокий (для ЭИ он равен 11), а скорости реакций низкие. Для повышения эффективности реакций мы доводили pH до 4.5–7.0, прибавляя в качестве протонодонора хлорную кислоту.

Главным продуктом алкилирования тиотэфом в присутствии HClO_4 , poly(A) является N1-замещенный аденин (рис. 2). В значительно меньших количествах присутствуют продукты модификации по N⁶ и N³ аденина. N1- и N³-замещенные аденины по УФ-спектрам и времени удерживания на

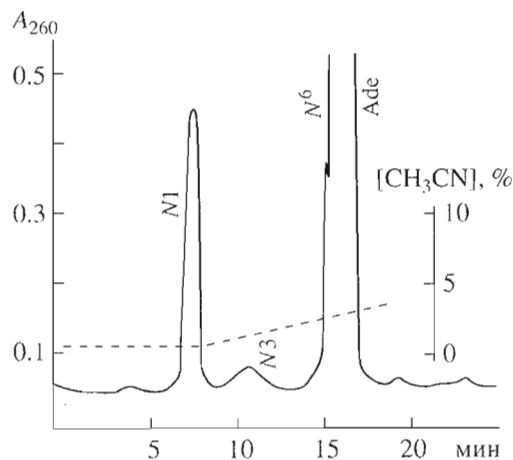


Рис. 2. офВЭЖХ гидролизата (1 М HCl, 100°C, 1 ч) poly(A), алкилированного тиотэфом (pH 4.5, 12 ч, 37°C) на колонке Bio-Sil ODS-5S (4 × 150 мм). Проба 1.2 мг. N1, N3 и N6 — места присоединения алкилирующего агента к адениновому остатку в продукте соответствующего пика.

колонке были полностью идентичны соответствующим соединениям на хроматограммах продуктов алкилирования тиотэфом свободного основания аденина [1]. N⁶-Алкаладенин был отделен от аденина на сефадексе G-10 и также идентифицирован по УФ-спектрам. Его образование связано с повышением pH среды в результате алкилирования основания по N1-положению [13, 14]. Напротив, образование N1- и N3-замещенных продуктов протекает эффективнее при низких значениях pH [1].

Аналогично были разделены и идентифицированы продукты алкилирования и других полинуклеотидов. Было установлено, что в poly(G) основным сайтом модификации выступает N7 гуанина. Продукт замещения по N1 также присутствует, но его содержание очень мало. В poly(C) слабо алкилируется положение N3. В poly(U) алкилирование по N3 протекает еще труднее, как мы полагаем, из-за инактивирующего влияния двух атомов кислорода в α-положениях к этому азоту.

Низкая эффективность реакций алкилирования пиримидиновых полинуклеотидов подтверждает наш вывод об отсутствии алкилирования межнуклеотидных фосфатных групп, количество которых в poly(G) и poly(U) вполне сопоставимо, тогда как эффективность алкилирования этих полинуклеотидов резко отличается и коррелирует с таковой свободных нуклеиновых оснований [1].

Поскольку алкилирование производными этиленмина протекает через образование Im⁺, т.е. протонированной формы алкилирующего агента, представлялось целесообразным изучить влияние pH среды на скорость алкилирования. Действительно, из рис. 3а видно, что даже незначитель-

ное изменение кислотности среды (в пределах 1.5 единицы) существенно влияет на скорость реакции, уменьшающуюся по мере увеличения значений pH.

Аналогично повышению pH среды действует и увеличение ионной силы раствора. Внесение в среду NaCl уменьшает скорость алкилирования из-за конкурирующего влияния анионов среды (рис. 3б). В 1 М растворе NaCl алкилирование ДНК практически не происходит.

В работе [5] показано, что денатурирование ДНК также приводит к замедлению скорости реакции. Представленные ниже данные подтверждают это и для реакций алкилирования тиотэфом (кривые 1, 2 на рис. 3в). Совсем иное влияние оказывает фрагментация молекул ДНК. Различия в скоростях алкилирования нативной и денатурированной тепловой обработкой ДНК становятся незначительными при их фрагментировании ультразвуком (кривые 3, 4 на рис. 3в). Более того, скорость алкилирования денатурированной ДНК, фрагментированной ультразвуком, даже несколько выше, чем нативной (кривые 1, 4 на рис. 3в), и намного выше, чем денатурированной, но не обработанной ультразвуком, т.е. нефрагментированной ДНК (кривые 2, 4 на рис. 3в).

Мы полагаем, что фрагментация нативной высокомолекулярной ДНК ультразвуком повышает скорость реакций алкилирования в основном из-за увеличения числа концевых фосфатных групп. Основания при такой обработке остаются практически незатронутыми. Напротив, фрагментирование ДНК, денатурированной тепловой обработкой, оказывает более существенное влияние. Тепловая денатурация ДНК вызывает изменение ее вторичной структуры, свертывание спирали в “клубок” с нарушением поперечных (комплементарных) и продольных (“стэкинг”-) взаимодействий [15]. Понятно, что функциональные группы в “клубке” менее доступны для реакций, и поэтому скорость алкилирования денатурированной ДНК уменьшается. Разрушение “клубка” при обработке ультразвуком приводит не только к увеличению числа концевых фосфатных групп, но и к “высвобождению” некоторых атомов азота, до денатурации ДНК участвовавших в образовании водородных связей.

Суммарный эффект от протекания реакций по “открывшимся” азотам оснований и концевым фосфатным группам объясняет повышение скорости алкилирования денатурированной ДНК, фрагментированной ультразвуком (кривая 4 на рис. 3в).

В дуплексной нативной ДНК наиболее реакционноспособные атомы азота гетероциклов, а именно N1 пуринов и N3 пиримидинов, участвуют в образовании водородных связей двойной спиралю и алкилирование протекает преимущественно

по оставшимся активным атомам азота пуриновых оснований – *N7* гуанина и *N3* аденина. Спонтанная апуринизация, сопровождающая алкилирование по этим сайтам, является основной причиной денатурации и фрагментации молекул модифицированной ДНК, поскольку фосфодиэфирные связи в апуриновых участках нестойки и быстро гидролизуются. Денатурация молекул ДНК в процессе алкилирования в отличие от денатурации тепловой обработкой открывает некоторые атомы азота, которые в нативной ДНК участвуют в образовании водородных связей, благодаря чему появляются продукты модификации по *N1* пуриновых и *N3* пиримидиновых оснований.

Реакции алкилирования ДНК различными алкилирующими агентами подробно изучены [4–6, 10, 16], и мы можем только констатировать, что модификация нуклеиновых оснований в составе ДНК производными этиленimina протекает аналогично, за исключением того, что тиотэф как трифункциональный агент может вызывать сшивки молекул ДНК, о чем будет сказано позже.

Для выделения продуктов спонтанной апуринизации ДНК, алкилированной тиотэфом, мы воспользовались методом, примененным ранее [3] для разделения продуктов алкилирования АМР. Смесь модифицированных оснований, образовавшихся в результате спонтанной апуринизации алкилированной ДНК, вышла в составе одной фракции (I на рис. 4а). Посредством оф-ВЭЖХ они идентифицированы (по УФ-спектрам и времени удерживания на колонке [1]) как 7-алкилгуанин и 3-алкиладенин (рис. 4б).

Те же алкилированные основания оказались главными составляющими кислотного гидролизата ДНК, алкилированной МЕР (рис. 5). Наряду с ними дополнительно обнаружен продукт замещения аденина по положению *N1* основания. В незначительном количестве в гидролизате присутствовал также 1-алкилгуанин. Наличие в смеси на рис. 5 продуктов с различными алкильными радикалами (*R* и *R'*) свидетельствует о гидролизе фосфамидной связи алкилирующего агента.

В работе [1] подробно обсужден вопрос о расщеплении амидных связей тиотэфа при проведении реакции в присутствии HClO_4 . Очевидно, в условиях мягкого кислотного гидролиза алкилированных ДНК вместе с гидролизом гликозидных связей модифицированных оснований протекает также гидролиз *P*–*N*-связей алкилирующего агента, благодаря чему в гидролизате наряду с продуктами фосфаминоэтилирования присутствуют продукты аминоэтилирования (радикалы *R'* и *R* соответственно). В какой-то степени процесс гидролиза амидных связей алкилирующего агента очевидно протекает уже во время реакции алкилирования, о чем свидетельствует небольшой пик

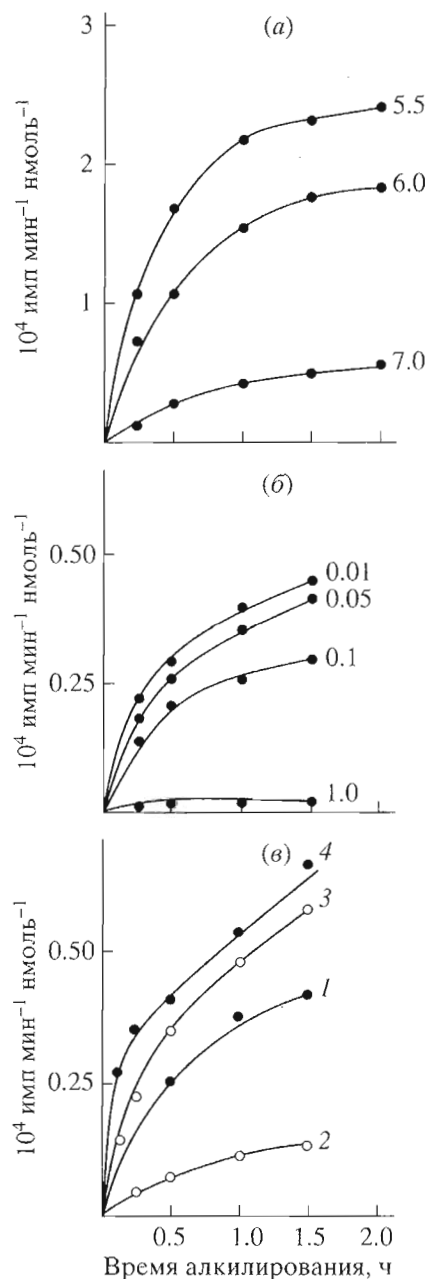


Рис. 3. Изменение скорости реакции алкилирования ДНК [^{35}S]тиотэфом в зависимости от pH среды (а), ионной силы раствора (NaCl , М) (б), тепловой денатурации и фрагментации ультразвуком различных ДНК (в) (1 – нативная высокомолекулярная ДНК; 2 – ДНК, денатурированная тепловой обработкой; 3 – нативная ДНК, фрагментированная ультразвуком; 4 – ДНК, денатурированная тепловой обработкой и фрагментированная ультразвуком). Условия денатурации и фрагментации в “Эксперимент. части”.

на 8-й минуте элюирования (рис. 4б), соответствующий пику 7-*R*-Gua на рис. 5.

Фракция М, представленная на рис. 5 широким пиком со временем удерживания 16–17 мин, кроме немодифицированного аденина содержит аде-

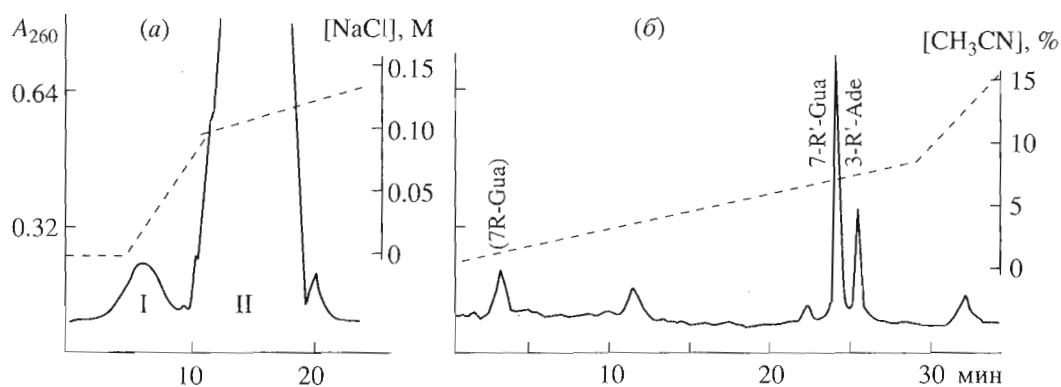


Рис. 4. Разделение продуктов алкилирования ДНК тиотэфом (рН 7, 37°C, 24 ч) на ионообменной колонке Bio-Gel TSK DEAE-5-PW (7.5 × 75 мм). I – продукты спонтанной апуринизации алкилированной ДНК. II – фракция ДНК после апуринизации. (а) и фракция I в режиме офВЭЖХ на колонке Bio-Sil ODS-5S (4 × 150 мм) (б). Структуры R и R' приведены на рис. 5.

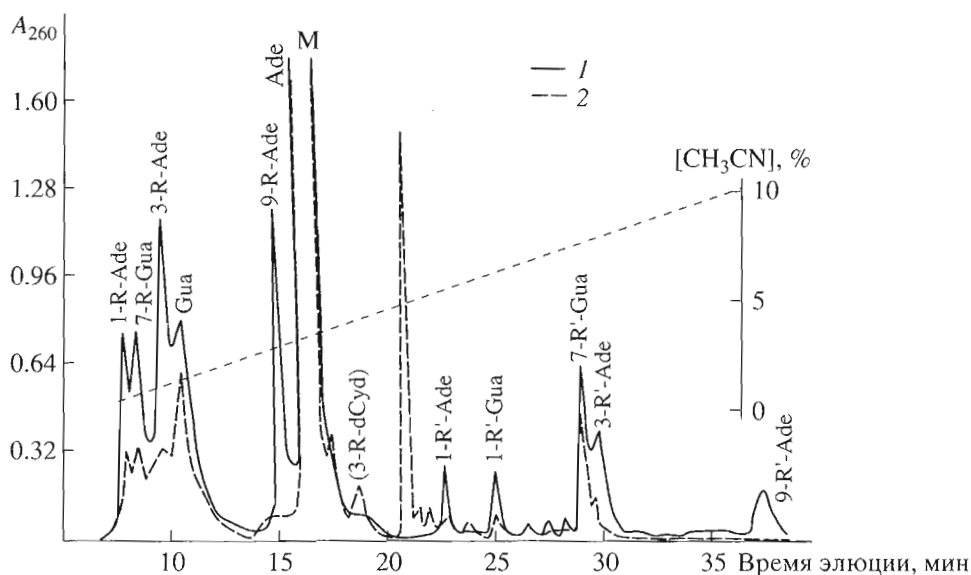
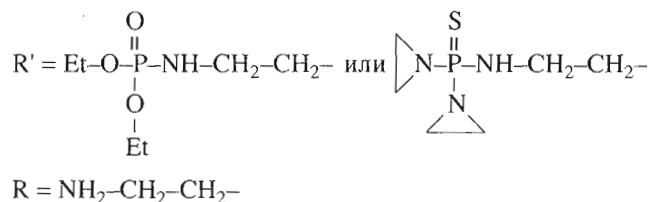


Рис. 5. Разделение методом офВЭЖХ на колонке (4 × 150 мм) Bio-Sil ODS-5S смеси (Gua/Ade 1 : 3) алкилированных (тиотэф, рН 4.5, 37°C, 24 ч) пуриновых оснований (1) и кислотного гидролизата (0.1 М HCl, 37°C, 24 ч) ДНК, алкилированной (рН 7, 37°C, 12 ч) МЕР (2). М – фосфатсодержащая фракция гидролизата ДНК, включающая немодифицированный аденин и N⁶-R-Ade.

нин, алкилированный по экзоциклической аминогруппе. Появление N⁶-замещенного продукта становится возможным, как указывалось выше, благодаря подщелачиванию среды, вызываемому алкилированием [1]. Примечательно, что авторы [5] вообще не обнаружили среди продуктов модификации ДНК продукта замещения по N1

аденина, а только по положению N⁶, и считают, что последний образуется в нейтральных и слабощелочных средах из N1-производного в результате перегруппировки Димрота. рK_a N⁶-алкиладенина (3.7–4.2 в зависимости от природы алкилирующего агента [16]) близок к рK_a аденина (4.15). Поэтому при разделении алкилированных

смесей оба соединения элюируются вместе, но их можно разделить хроматографией на сефадексе G-10 [1].

По поводу алкилирования пиримидиновых оснований ДНК следует отметить, что однозначно идентифицировать соответствующие соединения нам не позволило отсутствие маркера. В то же время при хроматографировании алкилированного тиотэфом соответствующего рибонуклеозида – цитидина [2] (в условиях разделения, аналогичных таковым для гидролизата ДНК), нами было определено время выхода с колонки двух его N3-замещенных (18.5 и 28.5 мин для 3-R-Cyd и 3-R'-Cyd соответственно). На рис. 5 продукт, для которого время удерживания также составляет 18.5 мин, имел спектры поглощения (λ_{\max} 280 нм, λ_{\min} 247 нм), идентичные спектрам 3-этилдезоксцитидина.

Используя коэффициенты удельного поглощения метилированных оснований, мы установили приблизительное содержание остатков алкилированных и неалкилированных оснований в ДНК (методика определения приведена в “Экспериментальной части”). Оказалось, что в первые 2–6 ч реакции основным сайтом модификации выступает N7 гуанина (95% всей суммы алкилированных оснований при общей степени алкилирования 8–12%). Через 24 ч его количество составляет 30–35%, а через 48 ч – порядка 50% общего содержания гуанина в ДНК. Остатки аденина алкилируются гораздо медленнее (в 5–10 раз). Через 24 ч модифицируется 4–6%, а через 48 ч – 10–25% адениновых оснований в составе ДНК. При этом около 60% алкилированных аденинов представлены его N3-производным, остальные аддукты являются N1- и N⁶-алкилзамещенными. Остатки пиримидиновых оснований через 48 ч оказываются алкилированными не более чем на 2%, в основном за счет модификации остатков цитозина по положению N3.

Таким образом, алкилирование оснований в составе ДНК протекает по тем же сайтам, что и в составе соответствующих мононуклеозидфосфатов [3] и соответствует реакциям алкилирования ДНК азотистыми аналогами иприта [5], за исключением того, что мы не нашли подтверждения протеканию реакций по межнуклеотидным фосфатным группам, найденному для аналогов иприта. Вместе с тем наше утверждение, что алкилироваться могут только концевые фосфатные группы, правомочно лишь для начальных стадий реакции, пока концевые фосфаты полностью не модифицируются и не начнется алкилирование оснований. Денатурация молекул модифицированной ДНК и сопровождающий ее процесс фрагментации вызывает, как указывалось выше, появление концевых фосфатных групп, способных алкилироваться. Их количество определяется

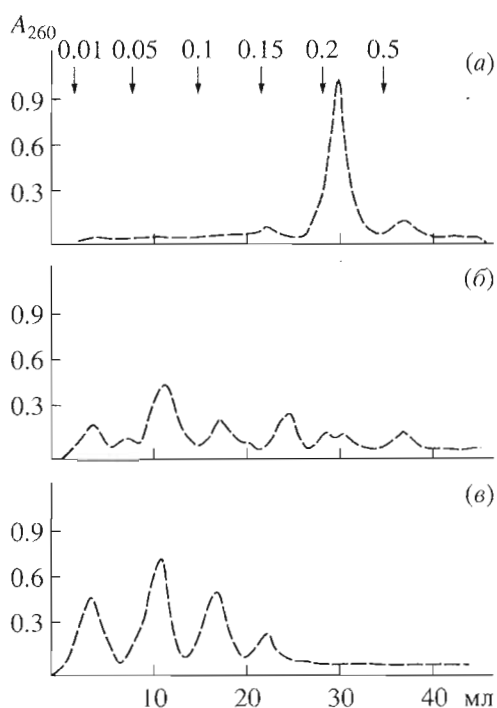


Рис. 6. Ступенчатое элюирование препаратов нативной ДНК (а) и алкилированной (48 ч) тиотэфом (б) и МЕР (в) на колонке (7 × 35 мм) с гидроксиапатитом. Цифрами сверху обозначена молярность элюирующего Na-фосфатного буфера, рН 6.8. Условия опыта – в “Эксперимент. части”.

эффективностью алкилирования оснований и увеличивается по мере протекания реакции. Нами установлено [17], что через 24 ч реакции средний размер фрагментов составляет, в зависимости от условий и алкилирующего агента, 200–400 нуклеотидов, через 48 ч – 50–200. При этом период “полувыпадения” 7-алкилгуанина из состава ДНК составляет примерно 110 ч. Выщелчение 3-алкиладенина в тех же условиях (рН 7, 37°C) происходит значительно быстрее, и период его “полувыпадения” составляет около 20 ч. Таким образом, межнуклеотидная фосфатная группа, не вступая непосредственно в реакции алкилирования, является источником концевых фосфатных групп, подверженных алкилированию.

Для алкилированной ДНК характерно уменьшение плотности отрицательного заряда молекул, особенно заметное после 24 ч алкилирования. Методом ионообменной хроматографии на гидроксиапатите препарат алкилированной тиотэфом и МЕР ДНК разделен на фракции, отличающиеся по степени их удерживания на колонке в соответствии с зарядом входящих в них фрагментов (рис. 6).

При этом отмечается высокая гетерогенность первых фракций алкилированной ДНК, обусловленная различием в размерах молекул и в степени

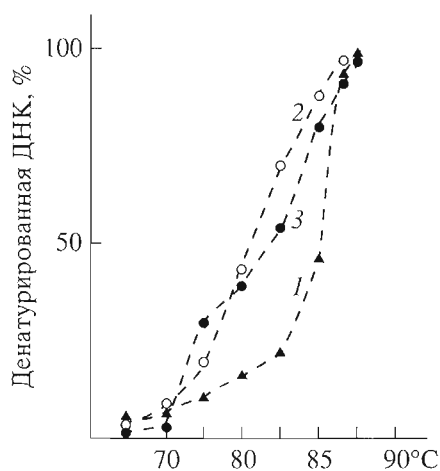


Рис. 7. Кривые плавления нативной ДНК (1), алкилированной МЕР (2) и тиотэфом (3). Условия алкилирования и методика проведения опыта в "Эксперимент. части".

их модификации. Так, во фракции, элюированной 0.01 и 0.05 М буфером, содержатся короткие (от 1 до 25 нт) фрагменты, содержащие до 30–35% алкилированных нуклеотидов пуринового ряда. Последующие фракции меньше отличаются по размеру фрагментов (100–200 нт), но имеют различный нуклеотидный состав: с увеличением ионной силы буфера уменьшается относительное содержание модифицированных пуринов (до 3–4% во фракции, элюированной 0.2 М буфером) и возрастает содержание модифицированных пиримидинов (до 40–45 и 80–85% общей суммы алкилированных оснований во фракциях, элюированных 0.1 и 0.2 М буфером соответственно). Различие хроматографических профилей ДНК, алкилированных тиотэфом и МЕР, объясняется большей эффективностью МЕР как алкилирующего агента [1], в результате чего фрагментация ДНК происходит быстрее.

Модификация ДНК алкилирующими агентами сопровождается изменением ее физико-химических свойств.

Уменьшение плотности отрицательного заряда ДНК при алкилировании обусловлено (помимо алкилирования концевых фосфатных групп, количество которых увеличивается в ходе реакции) образованием продуктов аминоэтилирования оснований. Модифицированные остатки оснований ДНК несут на себе частичный положительный заряд благодаря способности аминов (R и R') протонироваться в нейтральных средах. Это обуславливает возможность образования пространственно сближенными фосфатными группами ДНК и ее алкилированными основаниями внутренних четвертичных солей [13, 14].

Одно из следствий алкилирования ДНК — изменение ее температуры плавления. Предпо-

лагается, что это обусловлено изменением заряда и конфигурации алкилированных ДНК, приводящим к нарушению стэкинга модифицированных оснований и изменению энергии водородных связей [15].

Даже кратковременное (2–4 ч) алкилирование ДНК уменьшает термостабильность за счет частичной денатурации, что выражается в понижении температуры плавления. Через 6 ч алкилирования ДНК МЕР температура плавления уменьшается примерно на 5°C по сравнению с нативной и составляет 81.5°C . Близкую температуру (82.5°C) имеет ДНК, алкилированная в тех же условиях тиотэфом в течение примерно 8.5 ч. Поскольку температура плавления алкилированных ДНК зависит от природы алкилирующего агента, условий и времени проведения реакций, т.е. в конечном счете от степени денатурации ДНК, этот последний показатель и был использован для построения температурного графика. Как видно из рис. 7, при одной и той же степени денатурации кривые плавления алкилированных ДНК смещены в сторону более низких температур по сравнению с кривой плавления нативной ДНК. Кроме того для ДНК, алкилированной тиотэфом, наблюдаются изгибы кривой плавления в области 72 и 83.5°C , что свидетельствует о наличии фракций, различающихся по термостабильности.

Денатурация ДНК при алкилировании приводит к изменению ее спектров: ультрафиолетовых, кругового дихроизма и флуоресценции (рис. 8).

Изменения в строении молекул ДНК под влиянием алкилирования приводят к нарушению стэкинга оснований, а значит и к нарушению спиральности ДНК, что отражается на КД-спектрах. Как видно из рис. 8а, изменения наблюдаются уже для ДНК, денатурированной нагреванием (кривая 2), а для ДНК, алкилированной тиотэфом, этот эффект еще более значителен (кривая 3).

То же можно сказать и об УФ-спектрах. Алкилирование компонентов НК приводит обычно к небольшому батохромному сдвигу спектров (кроме модифицированных по положению 9 пуриновых оснований [1]), а фрагментация молекул как нативных денатурированных, так и алкилированных ДНК — еще и к гиперхромному сдвигу (3, 4 в сравнении с 2 на рис. 8б). Причем величина смещения максимумов поглощения в ультрафиолетовой области зависит от природы алкилирующего агента, тогда как минимум остается постоянным для всех производных этиленмина. Так, при $\text{pH } 7$ λ_{max} и λ_{min} для нативной денатурированной ультразвуком ДНК, с одной стороны, и алкилированной этиленмином, МЕР и тиотэфом — с другой, составляют 259 и 230, 266 и 234, 264.5 и 234, 262.5 и 234 нм, соответственно. Вместе с тем изменения как УФ-спектров, так и спектров КД незначительны.

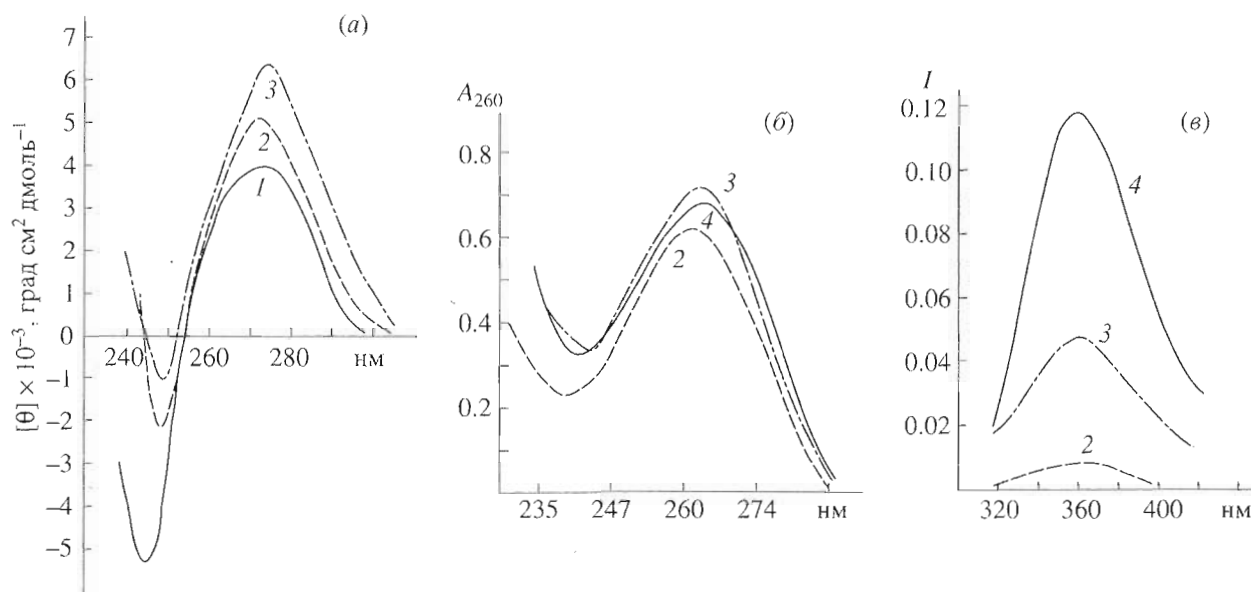


Рис. 8. Спектры КД (а), УФ (б) и флуоресценции (в) нативной ДНК (1), денатурированной (2 ч, 80°C) нагреванием (2) и алкилированием (37°C, 24 ч) тиотэфом (3) и МЕР (4).

В противоположность этому, интенсивность флуоресценции алкилированных ДНК намного превосходит таковую для нативных денатурированных ДНК и в еще большей степени определяется природой алкилирующего агента (рис. 8в).

Для тиотэфа в отличие от этиленimina, МЕР и других монофункциональных алкилирующих агентов характерно образование сшивок молекул ДНК [8]. По вопросу о химической природе сшивок, образуемых тиотэфом, в литературе данных нет. Вероятнее всего, сшивки возникают в основном за счет алкилирования одной молекулой тиотэфа двух остатков гетероциклических оснований разных молекул ДНК. Такие сшивки не разрушаются в щелочной среде при нагревании, что характерно для раскрытых имидазольных циклов 7-замещенных гуаниновых остатков, когда апуринизации модифицированных оснований не происходит [18]. И наоборот, сшивки в алкилированной ДНК разрушаются при нагревании в нейтральной среде одновременно с увеличением количества алкилированного по N7 гуанина. Это согласуется с данными работы [6] и указывает на то, что сшивки образуются по гуаниновым остаткам ДНК. И наконец, известно, что большинство других алкилирующих агентов образуют сшивки именно таким путем [19, 20].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы гомополинуклеотиды (калиевые соли) фирмы "Serva" (Германия) и ДНК тимуса теленка (НПО "Биолар", Олайне). ДНК предварительно очищали от примесей белка и

РНК обработкой проназой В (Calbiochem, Швейцария) и РНКазой А (Serva, Германия) с последующей фенольно-хлороформной экстракцией и осаждением спиртом до содержания основного вещества не менее 98%. Молекулярная масса ДНК по данным электрофореза в агарозном геле – около 1×10^5 (по методике, описанной в работе [17]).

Спектры КД записывали на спектрометре "Spectropol-1", УФ на приборе Specord UV-VIS (Karl Zeiss, Германия), флуоресценции на спектрофлуориметре "Hitachi" при 400 нм и длине волны возбуждения 300 нм. Измерения проводили в буфере, содержащем 10 мМ Трис-НСI, рН 7.5, 0.14 М NaCl и 2 мМ EDTA при концентрации препаратов 0.07 мМ (в пересчете на нуклеотиды) или 0.3–0.7 мг/мл.

Алкилирование гомополинуклеотидов и ДНК. В водный раствор (1 мг/мл) полинуклеотида вносили алкилирующий агент из расчета конечной концентрации 0.02 М. рН среды доводили до 4.5 или 7.0 разбавленным раствором хлорной кислоты. Смесь инкубировали при температуре 37°C и периодическом перемешивании в течение определенного времени (от 30 мин до 48 ч). Непрореагировавшие алкилирующие агенты удаляли экстракцией хлороформом. Раствор упаривали, определяя концентрацию спектрофотометрически в молях нуклеотида. Проба для ВЭЖХ – 1–2 мг.

В реакциях с применением меченого алкилирующего агента в водные растворы (2 мг/мл) полинуклеотидов вносили равный объем [³⁵S]тиотэфа (ПО Изотоп, С.-Петербург) в количестве 0.4 МБк (удельная активность препарата 190 ГБк/моль). Общий объем реакционной смеси в опыте состав-

лял 80 мкл. Смесь инкубировали при 37°C и через определенные промежутки времени аликвоты по 15 мкл наносили на колонку (6 × 75 мм) с сефадексом G-75 (Pharmacia, Швеция). Элюирование проводили водным раствором (0.1 М, pH 8) аммоний бикарбоната со скоростью 2 мл/мин. Детектирование фракций осуществляли спектрофотометрически при длине волны 260 нм. Для определения включения алкилирующего агента пробы наносили на фильтры GF/C (Whatman, Англия), подсушивали на воздухе и измеряли радиоактивность в толуольном сцинтилляторе ЖС-109 (Харьковский завод химреактивов) по каналу ¹⁴C на счетчике радиоактивности Intertechnique (Франция).

Гидролиз алкилированных полинуклеотидов и ДНК проводили в 0.1 М HCl при 37°C в течение 12–24 ч или в 1 М HCl при 100°C в течение 1 ч.

Обращенно-фазовую ВЭЖХ гидролизатов алкилированных полинуклеотидов и ДНК с одновременной регистрацией максимумов поглощения разделяемых продуктов в области 220–350 нм проводили на колонке (4 × 150 мм) Bio-Sil ODS-5S (Bio Rad, США) при скорости элюирования 0.7 мл/мин и рабочем давлении 80 атм на приборе фирмы Bio Rad с проточным УФ-детектором UV monitor model 1306. Градиент элюирования создавали раствором ацетонитрила (0–20%) на 0.05 М Na-фосфатном буфере, pH 7. Продукты алкилирования идентифицировали сравнением их УФ-спектров с УФ-спектрами определенных ранее нуклеиновых оснований [1].

Ионообменную хроматографию алкилированных ДНК 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 М, pH 6.0) на приборе фирмы Bio Rad с проточным УФ-детектором UV monitor model 1306.

Фрагментацию ДНК ультразвуком проводили на дезинтеграторе MSE (Англия) в течение 10 мин при 0°C и частоте 22 кГц. Фрагменты, полученные при такой обработке, содержали в среднем 400–500 п.о.

Тепловую денатурацию ДНК осуществляли выдерживанием препаратов в 0.05 М Na-фосфатном буфере, pH 7, 10 мин при температуре 100°C с последующим охлаждением до 2°C.

Ступенчатое элюирование препаратов нативной и алкилированной ДНК проводили на колонке (7 × 35 мм) с гидроксипатитом фирмы Bio Rad путем создания градиента концентрации (от 0.01 до 0.5 М) элюирующего Na-фосфатного буфера (pH 6.8) при величине пробы до 0.5 мг. Степень сорбции нативной ДНК – 100, алкилированной – около 98%. Степень десорбции – 95%. Фракции по 1.1 мл отбирали и детектировали спектрофотометрически при длине волны 260 нм.

Термоденатурацию нативных и алкилированных в течение 6 ч ДНК проводили на колонке (20 × 50 мм) с гидроксипатитом (Bio Rad), ступенчато через каждые 5°C повышая температуру колонки с нанесенными препаратами (по 1 мг) от 60 до 95°C и элюируя денатурированную ДНК 0.12 М Na-фосфатным буфером, pH 6.8. Полноту элюирования и концентрации растворов определяли спектрофотометрически. По полученным данным строили кривые плавления ДНК.

Содержание алкилированных и неалкилированных оснований в составе модифицированной ДНК устанавливали с помощью молярных коэффициентов поглощения метилированных оснований. Учитывая тот факт, что природа алкилирующего агента мало влияет на величину поглощения в ультрафиолетовой области, тогда как определяющее значение имеет сайт, по которому прошло алкилирование [1, 16], для расчета относительного содержания в гидролизате ДНК алкилированных и неалкилированных оснований мы применили метод определения небольших количеств веществ с использованием молярных коэффициентов поглощения соответствующих метилированных оснований. После жесткого кислотного гидролиза модифицированной ДНК (1 М HCl, 100°C, 1 ч), в результате которого фосфаминэтильные радикалы расщеплялись до аминокэтильных (R' → R), и разделения гидролизата в режиме офВЭЖХ, получали фракции алкилированных и неалкилированных оснований. Зная содержание пуриновых и пиримидиновых оснований в ДНК и величину их поглощения, определенную с помощью коэффициентов поглощения соответствующих нуклеиновых оснований, и величину поглощения немодифицированных оснований гидролизата ДНК, по разнице в поглощении определяли процент алкилированных оснований (степень алкилирования), а по величине поглощения каждого из алкилированных оснований и молярному коэффициенту поглощения соответствующего метилированного основания определяли их содержание в алкилированной ДНК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Волощук Т.П., Пацковский Ю.В., Потопальский А.И. // Биоорганич. химия. 1990. Т. 16. С. 981–990.
2. Волощук Т.П., Пацковский Ю.В., Потопальский А.И. // Биоорганич. химия. 1993. Т. 19. С. 484–493.
3. Волощук Т.П., Пацковский Ю.В., Потопальский А.И. // Биоорганич. химия. 1993. Т. 19. С. 562–569.
4. Lawley P.D., Brookes P. // Biochem. J. 1963. V. 89. P. 127–135.
5. Price Ch.C., Gaucher G.M., Koneru P. // Biochim. Biophys. Acta. 1968. V. 166. P. 327–359.

6. Mattes W.B., Hartley Y.A., Kohn K.W. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. P. 2971–2987.
7. Швед А.Д., Соломко А.П., Потопальский А.И. и др. // Молекул. биология. Киев: Наук. думка. 1980. Вып. 26. С. 64–78.
8. Пятигорская Т.Л., Жилкова О.Ю., Муравьева Л.М., Суходуб Л.Ф. // Молекул. биология. 1986. Т. 20. С. 423–429.
9. Серебряный А.М., Андриевский Г.В., Беккер А.Р., Сибельдина Л.А., Шарова О.Л. // Биооргани. химия. 1987. Т. 13. С. 786–792.
10. Musser S.H., Pan S.S., Egorin M.J., Kyle D.J., Callery P.S. // Chem. Res. Toxicol. 1992. V. 5. P. 95–99.
11. Alexander P. // Nature. 1952. V. 169. P. 226–227.
12. Bannon P., Verly P. // Eur. J. Biochem. 1972. V. 31. P. 103–111.
13. Органическая химия нуклеиновых кислот / Ред. Кочетков Н.К., Будовский Э.И. М.: Химия, 1970. 720 с.
14. Росс У. Биологические алкилирующие вещества. М.: Медицина, 1964. 260 с.
15. Шабарова Э.А., Богданов А.А. Химия нуклеиновых кислот и их компонентов. М.: Химия, 1978. 584 с.
16. Singer B. // Progr. Nucl. Acids Res. Mol. Biol. 1975. V. 15. P. 219–280.
17. Пацковский Ю.В., Волощук Т.П., Потопальский А.И. // Макромолекулы клеток и вирусов. Сб. науч. трудов / Ред. Кок И.П., Дяченко Н.С. Киев: Наук. думка, 1986. С. 64–70.
18. Kohn K.W., Spears C.L. // Biochim. Biophys. Acta. 1967. V. 145. P. 734–741.
19. Columbano A., Ledda G.M., Rao P.M., Rajalakshmi S., Sarma D.S.R. // Cancer Lett. 1980. V. 10. P. 333–338.
20. Richardson K.K., Richardson F.C., Crosby R.M., Swenberg J.A., Skopek T.R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. P. 344–348.

Alkylation of Nucleic Acid Components with Ethylenimine and Its Derivatives. IV. Alkylation of Homopolynucleotides and DNA

T. P. Voloshchuk[#], Yu. B. Patskovskii, and A. I. Potopalskii

*Institute of Molecular Biology and Genetics, Ukrainian Academy of Sciences,
ul. Zabolotnogo 150, Kiev, 252143 Ukraine*

Alkylation of homopolynucleotides and DNA by thioTEPA and monoaziridine diethyl phosphate was studied. The modification affected nucleic bases and terminal phosphate groups but not internucleotide phosphate groups. It was shown that the main center of modification in poly(A) was the N1 atom, whereas the products of N⁶- and N3-alkylations were formed in smaller amounts. In poly(G), the alkylation proceeded predominantly at the N7 and, insignificantly, at the N1 atom of guanine; the pyrimidine N3 atom is alkylated poorly in poly(C) and even worse in poly(U). In the case of DNA, the major alkylated sites are the guanine N7 and the adenine N3; this results in DNA denaturation and the subsequent formation of products modified at N1 and N⁶ of adenine, N1 of guanine, and N3 of cytosine. An increase in the pH and ionic strength of the solution as well as the DNA denaturation decrease the reaction rate, whereas ultrasonic fragmentation enhances it. Upon alkylation, melting temperatures decrease, CD and UV spectra change, and DNA luminescence appears. To separate the reaction mixtures and identify the DNA alkylation products, chemical hydrolysis, ion-exchange and reverse-phase HPLC, and UV spectroscopy were used.

Key words: alkylation, DNA, nucleic acids, nucleotides, thioTEPA

[#] To whom correspondence should be addressed; fax: +7 (044) 266-0759; phone: +7 (044) 266-1139.