



УДК 547.963.32

О МЕХАНИЗМЕ АЛКИЛИРОВАНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ
В КОМПЛЕМЕНТАРНЫХ КОМПЛЕКСАХ.
КИНЕТИКА АЛКИЛИРОВАНИЯ РНК и ДНК 2',3'-
О-[4-(N-2-ХЛОРЭТИЛ-N-МЕТИЛАМИНО)БЕНЗИЛИДЕН]-
ОЛИГОНУКЛЕОТИДАМИ

Бенилюцкая Л. З., Гринева Н. И., Карпова Г. Г.,
Пичко П. П., Чимитова Т. А.

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

Новосибирский государственный университет

Алкилирование РНК и ДНК в комплементарных комплексах с $(Np)_{n-1}NRCl$ протекает преимущественно по двухстадийному механизму с образованием в лимитирующей стадии активной промежуточной частицы с константой скорости k_0' , близкой константе полизации C—Cl-связи $(Np)_{n-1}NRCl$ в растворе. Как и k_0 , константа скорости суммарного процесса алкилирования в комплексе не зависит от длины и характера олигонуклеотидной части реагента и меняется с температурой аналогично k_0 и в растворе. На второй стадии, в комплексе РНК и ДНК с $(Np)_{n-1}NR^+$, наблюдается значительное ускорение алкилирования по сравнению с реакцией в растворе. Наблюдаемая эффективность алкилирования РНК и ДНК с помощью $(Np)_{n-1}NRCl$, образующих с ними комплементарные комплексы, зависит от параметров комплексообразования и условий, их определяющих: температуры, соотношения участков связывания и концентраций реагентов, их длины и характера. Скорость алкилирования в комплексах при любой их концентрации эквивалентна скорости алкилирования как минимум 12 М растворов реагентов вне комплексов, что по крайней мере в несколько раз выше реально достижимой концентрации реагирующих группировок. Отсюда ускорение алкилирования в комплексе связано не только с увеличением локальной концентрации, но и с особой взаимной ориентацией реагирующих группировок в комплексах РНК и ДНК с $(Np)_{n-1}NR^+$.

Алкилирующие производные 2',3'-бензилиденолигонуклеотидов образуют с тРНК, рРНК и ДНК комплементарные комплексы и эффективно алкилируют в них третий нуклеотид от 5'-конца участка нуклеиновой кислоты, связывающего реагент [1—4]. Алкилирование ДНК в комплексах с такими реагентами служит основой комплементарно адресованной фрагментации ДНК [4, 5].

Реакции в комплексах широко распространены в природе и часто применяются в химии: они протекают с высокой скоростью и специфичностью.

Сокращения: $(Ap)_{n-1}ARCl$, $(pC)_n RCl$ и $(Np)_{n-1}NRCl$ — 2',3'-О-[4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензилиден]олигоаденилаты, олигоцитидилаты и олигонуклеотиды смешанного состава и статистической последовательности нуклеотидов, комплементарные рРНК *E. coli*; $d(pCG)ARCl$, $d(TT)URCl$, $(Me)pURCl$ — аналогичные производные дезоксирибо-рибоолигонуклеотидов и 5'-метилфосфата уридина соответственно; НК — нуклеиновая кислота.

Таблица 1

Эффективности алкилирования РНК в растворе (p/s)
вне комплексов в 0,02 М Трис-НСl-буфере, рН 7,3

Реагент	Нуклеиновая кислота	Температура, °С	p/s , M^{-1}
(Ap) ₅ ARCl	pPHK	50	8
(Ap) ₃ ARCl	pPHK	50	8
pNRCI (N=U, A, G, C) [15]	tPHK	40	12—14
d(TT)URCl [12]	tPHK	40	10
(Me)pURCl [17]	tPHK ₁ ^{Val}	40	16

Ускорение реакций в комплексах может достигать 2—11 порядков [6—10]. Алкилирование РНК и ДНК в комплексе с $(Np)_{n-1}NRCI$ также протекает с повышенной специфичностью и эффективностью по сравнению с реакцией в растворе [1,3].

Производные N-(2-хлорэтил)-N-алкил-N-ариламинов в зависимости от нуклеофильности субстрата способны реагировать либо по $S_N 2$ -механизму, либо через образование активной частицы — катиона этилениммония [11]. В последнем случае лимитирующей скоростью является стадия ионизации хлора. Далее этилениммоний-катион реагирует с нуклеофилами среды пропорционально их нуклеофильности и концентрации. Именно по этому двухстадийному механизму протекает алкилирование нуклеиновых кислот 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензилиденолиго- и нуклеотидами вне комплекса [12—18]. Кинетика этой реакции определяется k_0 — константой скорости лимитирующей стадии ионизации хлора [13, 18], p/s — эффективностью алкилирования * и суммарным зарядом промежуточной частицы [12, 14, 15, 17]. Наблюдаемое значительное ускорение алкилирования РНК и ДНК в комплексах может означать изменение механизма реакции от двухстадийного в растворе к $S_N 2$ в комплексе.

В данной работе для выяснения механизма алкилирования нуклеиновых кислот в комплементарных комплексах мы исследовали кинетику реакции РНК и ДНК с $(Np)_{n-1}NRCI$ в условиях комплексообразования. С этой целью мы определили величину p/s и суммарные константы скорости алкилирования нуклеиновых кислот, $k_{алк}$, в зависимости от температуры, характера и длины олигонуклеотидной части реагента в сравнении с этими же характеристиками реакции вне комплексов.

Для алкилирования РНК с помощью (Ap)₅ARCl и (Ap)₃ARCl при 50°, когда комплексов не образуется, p/s составило 8 M^{-1} . Эта величина практически совпадает с p/s для реакций в растворе tPHK с pNRCI и d(TT)URCl (10—14 M^{-1} [12, 15], табл. 1). Для производных нуклеотидов и олигонуклеотидов, образующих активную частицу с отрицательным суммарным зарядом, p/s является небольшой величиной, практически не зависящей от температуры [16, 19], вида нуклеотида как в pNRCI [15], так и в производных олигонуклеотидов, длины и состава последних [12] (табл. 1).

Для алкилирования рибосомных РНК (16S- +23 S-), 23 S-РНК, ДНК и tPHK₁^{Val} реагентами, образующими с этими нуклеиновыми кислотами комплементарные комплексы [1—4, 20]: (Ap)_{n-1}ARCl с $n = 3—8$, (pC)_nRCI с $n = 3$ и 6, d(pCG)ARCl, (Np)₅NRCI и (pN)₅RCI (где n — любой нуклеозид в любой последовательности), наблюдаемые p/s на 2—6 порядков выше p/s для алкилирования в растворе (табл. 2). На основании данных табл. 2 для достаточно большого набора реагентов и участков РНК и ДНК, связывающих их в комплексы, можно заключить, что в любых комплементарных комплексах алкилирование протекает с повышенной

* В соответствии с работами [14, 17] под p/s понимается отношение константы скорости включения реагента в нуклеиновую кислоту к удельной скорости остальных превращений реагента.

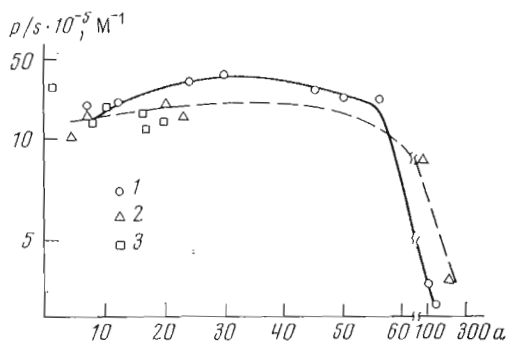


Рис. 1. Зависимость p/s от избыточной концентрации реагента a ($a = [\text{реагент}]_0 / [\text{PHK}]_0$) для алкилирования рРНК (16S-+23S-) (1, 2) и 23S-РНК (3) *E. coli* с помощью $(\text{Ap})_6\text{ARCl}$ (1) и $(\text{Ap})_3\text{ARCl}$ (2, 3) при 5°

эффективностью. Следовательно, p/s может служить индикатором на образование комплексов.

Как видно из табл. 2 и рис. 1, при 5° для $(\text{Ap})_{3-5}\text{ARCl}$ p/s мало меняются с изменением длины реагентов. Но при 20° с уменьшением длины реагентов на единицу p/s падает примерно на порядок. При этом на p/s влияет характер участков связывания: их число и длина комплементарной реагенту последовательности. По ходу алкилирования во времени p/s , однако, остается постоянным; например, при алкилировании 51 рМ 23S-РНК при 20° с помощью 3,62 мкМ $(\text{pC})_6\text{RCl}$ в буфере А p/s равно $(1,15 \pm 0,15) \cdot 10^{-6} \text{ M}^{-1}$. С возрастанием избытка реагента (a) p/s падает неравномерно (табл. 2). Оно мало меняется с ростом a вплоть до небольших избытков реагентов над насыщающими, затем резко (на порядок) падает после реакции всех участков связывания реагента, выявляемых в данных условиях (рис. 1—3). Для алкилирования рРНК с помощью $(\text{Ap})_{n-1}\text{ARCl}$ при $5-20^\circ$ p/s остается равным 10^6 M^{-1} для значений n от 4 до 6, вплоть до алкилирования всех участков связывания (рис. 1 и 4а). При повышении температуры до 30° p/s для $(\text{Ap})_5\text{ARCl}$ падает на 2 порядка, при $30-40^\circ$ меняется мало, а при $50-60^\circ$ уменьшается на 3 порядка, достигая значений p/s для алкилирования в растворе и тем самым подтверждая, что при 50° и выше $(\text{Ap})_5\text{ARCl}$ с рРНК комплексов не образует (рис. 4а). Аналогично p/s меняется при алкилировании ДНК *E. coli* и ДНК селезенки с помощью $(\text{Ap})_5\text{ARCl}$ и $(\text{Ap})_7\text{ARCl}$ соответственно.

Таблица 2

Зависимость наблюдаемой эффективности алкилирования от длины цепи реагента для алкилирования РНК в условиях комплексообразования: буфер А, $[\text{НК}]_0 = (0,01-0,1) \cdot 10^{-6} \text{ M}$

Реагент	Нуклеиновая кислота	$a = \frac{[\text{реагент}]_0}{[\text{РНК}]_0}$	Температура, $^\circ\text{C}$	$p/s, \text{M}^{-1}$
$(\text{Ap})_5\text{ARCl}$	рРНК	5—50	5	$3,8 \cdot 10^6$
$(\text{Ap})_4\text{ARCl}$	рРНК	8—70	5	$1,8 \cdot 10^6$
$(\text{Ap})_3\text{ARCl}$	рРНК	4—23	5	$1,9 \cdot 10^6$
$(\text{Ap})_3\text{ARCl}$	23S-РНК	1—20	5	$2,2 \cdot 10^6$
$(\text{Ap})_5\text{ARCl}$	рРНК	5—30	20	$2,7 \cdot 10^6$
$(\text{Ap})_5\text{ARCl}$	23S-РНК	3—10	20	$3,0 \cdot 10^6$
$(\text{Ap})_3\text{ARCl}$	23S-РНК	5—21	20	$1,5 \cdot 10^6$
$(\text{Ap})_2\text{ARCl}$	23S-РНК	10—48	20	$4,4 \cdot 10^1$
$(\text{pC})_6\text{RCl}$	23S-РНК	21—69	20	$1,2 \cdot 10^6$
$(\text{pC})_3\text{RCl}$	23S-РНК	450	20	$2,0 \cdot 10^6$
d(pCG)ARCl	тРНК	19	20	$1,4 \cdot 10^3$
$(\text{Ap})_5\text{VRCl}$	рРНК	186—400	25	$(1,0 \pm 0,09) \cdot 10^4$
$(\text{pN})_5\text{RCl}$	рРНК	58	25	$2,0 \cdot 10^3$

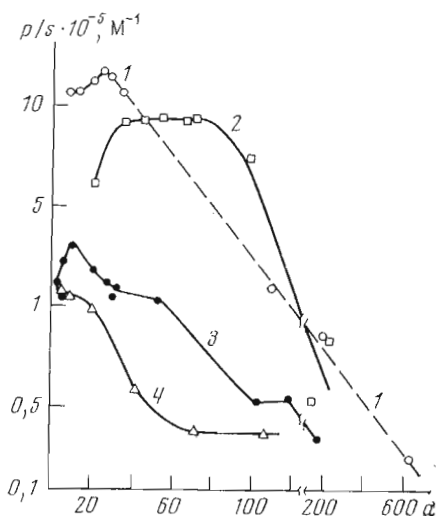


Рис. 2

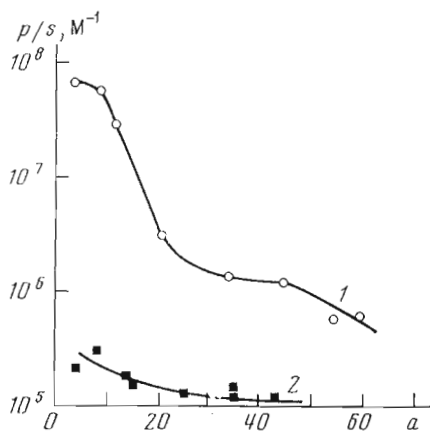


Рис. 3

Рис. 2. Зависимость p/s от избыточной концентрации реагента a ($a = [\text{реагент}]_0 / [\text{РНК}]_0$) для алкилирования рРНК (1) и 23S-РНК (2–4) с помощью $(\text{Ar})_5\text{ARCl}$ (1, 3), $(\text{C}_6\text{R})\text{Cl}$ (2) и $(\text{Ar})_3\text{ARCl}$ (4) при 20°

Рис. 3. Зависимость p/s от избыточной концентрации для алкилирования ДНК *E. coli* реагентом $(\text{Ar})_5\text{ARCl}$ при 20° (1) и 30° (2). $[\text{ДНК}]_0 = 2 \text{ ОЕ}_{26r} / \text{мл}$ (буфера А)

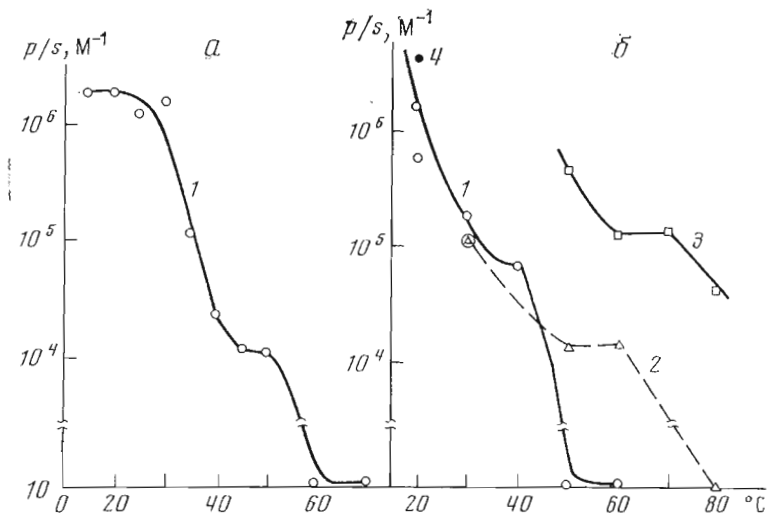
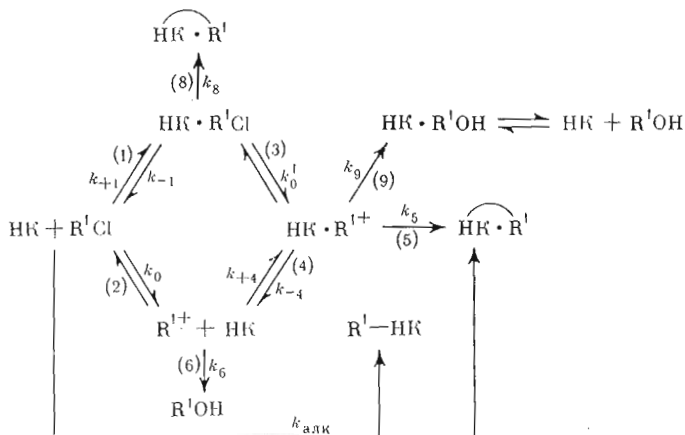


Рис. 4. Зависимость p/s от температуры для алкилирования рРНК *E. coli* (а) и ДНК *E. coli* (б, 1) и селезенки (б, 2, 3 и 4) с помощью $(\text{Ar})_5\text{ARCl}$ (1, 4), $(\text{Ar})_7\text{ARCl}$ (2, 3), $a = 35-55$, $[\text{ДНК}]_0 = 2 \text{ ОЕ}_{260} / \text{мл}$

Таким образом, в отличие от алкилирования в растворе в комплексах p/s , наблюдаемые для $(\text{Nr})_{n-1}\text{NRCl}$, меняются с изменением температуры, избытка реагента, вида реагента, его длины и характера участков связывания аналогично изменениям концентраций комплексов в этих условиях: зависимость p/s от a напоминает по характеру зависимость констант ассоциации $(\text{Ar})_{n-1}\text{ARCl}$ от глубины насыщения [20]. Наблюдаемые p/s отражают суммарные процессы в комплексе и в растворе, поскольку вычислены без учета концентрации реагентов, свободных и связанных в комплексе. В растворах нуклеиновой кислоты и $(\text{Nr})_{n-1}\text{NRCl}$, способных образовывать комплексы, могут протекать процессы, представленные на схеме



$R' = (Np)_{n-1}NR$; k_0 и k_0' — константы скорости ионизации хлора в реагенте с образованием активной промежуточной частицы $R'^+ = (Np)_{n-1}NR^+$ в растворе и в комплексе соответственно; k_{+1} и k_{+4} — константы скорости рекомбинации; k_{-1} , k_{-4} — константы скорости диссоциации комплексов; k_5 , k_7 , k_8 — константы скорости алкилирования нуклеиновых кислот; k_6 — константа скорости гидролиза $R'Cl$; $k_{алк}$ — суммарная константа скорости алкилирования НК.

Вследствие равновесного образования комплексов РНК и ДНК с $(Np)_{n-1}NRCl$ нуклеофильные центры РНК или ДНК в комплексе будут алкилироваться параллельно по пути (1) \rightarrow (3) \rightarrow (5) или (1) \rightarrow (8) и в растворе по пути (2) \rightarrow (7). Соотношение этих процессов определяет скорость, специфичность модификации и наблюдаемое p/s .

Наблюдаемые p/s получены из данных по накоплению продуктов алкилирования в комплексе $\overline{HK \cdot R'}$ по пути (3) \rightarrow (5) и $R-HK$ в растворе по пути (2) \rightarrow (7) (вклад очень мал) и по расходу реагента при его гидролизе. Вклад последнего процесса очень мал при реакции в комплексе (3) \rightarrow (9) и велик при реакции в растворе (2) \rightarrow (6). Фактически наблюдаемые p/s отражают соотношение скоростей расхода реагента на алкилирование в комплексе и расхода реагента на побочные превращения вне комплекса. Естественно, чем ниже степень ассоциации реагентов α , тем ниже наблюдаемое p/s . Действительно, при высокой концентрации комплексов ($\alpha = 0,7-0,9$ [20]) p/s составляет $10^6-10^7 M^{-1}$, при низкой α (повышенная температура, слабое связывание коротких реагентов или участков связывания, высокое a) p/s равно $10^3-10^5 M^{-1}$. В общем виде выявленные зависимости p/s от условий подтверждают сделанное ранее заключение о подчинении алкилирования в комплексах тем же закономерностям, что и комплексообразование [1, 3, 20]. Диапазон изменений наблюдаемых p/s показывает, что с их помощью можно регистрировать алкилирование в комплексах, в которые включена небольшая доля реагента; так, при 0,1% реагента в комплексах наблюдаемое p/s остается больше или равным $10^3 M^{-1}$.

Эффективность алкилирования собственно в комплексе (p/s истинное), равная отношению константы скорости реакции по пути (3) \rightarrow (5) к удельной скорости реакции по пути (3) \rightarrow (9) ($p/s = k_5/k_9 [H_2O]$), должна быть величиной, независимой от длины, избыточной концентрации реагентов и, вероятно, от температуры. Получить экспериментальные данные, позволяющие вычислить непосредственно истинное p/s , не представляется возможным. Но эту величину можно оценить, зная, что на алкилирование в комплексе реагент расходуется практически количественно*, а в рас-

* В одинаковых условиях степень связывания реагентов в комплексы (α) не отличима от r — степени расхода реагента на алкилирование в комплексах; насыщающее связывание и предельная степень алкилирования в комплексах совпадают [1, 3, 20].

творе при той же мольной доле реакционных центров ($3 \cdot 10^{-6}$ M) относительно воды (55 M), как следует из эксперимента, алкилирование обнаружить не удастся. Расход реагента на алкилирование в растворе в этих условиях, вычисленный из величины p/s , равной 8 M^{-1} , составляет $3 \cdot 10^{-3}\%$, а на гидролиз $\sim 100\%$. Соотношение скоростей алкилирования и гидролиза в растворе при данной мольной доле составит $3 \cdot 10^{-5}$. В тех же условиях в комплексе в пределах ошибки определения гидролиз реагента составит не более 1%. Отсюда скорость включения реагента в РНК или ДНК в комплексе относительно скорости гидролиза в комплексе должна быть не менее 100, а скорость алкилирования в 10^{-4} — 10^{-6} M комплексах на 5—7 порядков выше скорости алкилирования в растворе в тех же условиях.

Если отношение константы скорости алкилирования к удельной скорости гидролиза в комплексе, p/s истинное, не зависит от соотношения концентраций воды и реакционных центров в РНК или ДНК, реагирующих по конкурентной схеме, и если гидролиз в комплексе и растворе протекает одинаково, т. е. $k_9[\text{H}_2\text{O}] = k_6[\text{H}_2\text{O}]$, то различия в p/s истинном в комплексе ($[\text{НК} \cdot \text{R}]/[\text{НК} \cdot \text{РОН}] > 100$) и в растворе (8 M^{-1}) демонстрируют, что алкилирование в комплексах любой концентрации по скорости эквивалентно алкилированию в растворе с эффективной концентрацией нуклеотидов не менее 12 M.

Согласно [13, 18], алкилирование нуклеиновых кислот в растворе протекает по пути (2) \rightarrow (7). Увеличение его скорости в комплексе на несколько порядков по сравнению со скоростью алкилирования в растворе в сравнимых условиях может означать изменение механизма алкилирования по пути (1) \rightarrow (3) \rightarrow (5) на реакцию по пути (1) \rightarrow (8). Последний будет реализоваться лишь в случае способности этой реакции протекать с большей скоростью по сравнению с алкилированием через лимитирующую стадию.

Для того чтобы выяснить, какой путь алкилирования реализуется в комплексе, мы определили суммарные скорости алкилирования $k_{\text{алк}}$ на примере рРНК и 23S-РНК с помощью $(\text{Ar})_5\text{ARCl}$, $(\text{Nr})_5\text{NRCl}$, $(\text{pN})_5\text{RCl}$ и $(\text{pC})_6\text{RCl}$ при различных температурах.

Алкилирование непосредственно в комплексе должно быть реакцией первого порядка вследствие псевдомолекулярности процесса (пути (5) или (8)). Суммарная реакция по пути (1) \rightarrow (8) или по пути (1) \rightarrow (3) \rightarrow (5) может быть реакцией первого порядка при условии

$$k_{+1}([\text{НК}] + [\text{R}'\text{Cl}]) + k_{-1} \gg k_8 \quad (\text{I})$$

и

$$k_{+1}([\text{НК}] + [\text{R}'\text{Cl}]) + k_{-1} \gg k_0 \ll k_5 \quad (\text{II})$$

соответственно. Первый порядок реакции подтверждается линейностью анаморфозы кинетических кривых алкилирования 23S-РНК с помощью $(\text{pC})_6\text{RCl}$ и рРНК реагентами $(\text{Ar})_5\text{ARCl}$, $(\text{Nr})_5\text{NRCl}$ и $(\text{pN})_5\text{RCl}$.

Вследствие большого различия в скоростях алкилирования в комплексе и в растворе долей реакции по пути (2) \rightarrow (7) в растворе можно пренебречь и о $k_{\text{алк}}$ в комплексе судить по скорости накопления продуктов алкилирования РНК. При этом при соблюдении условия (II) $k_{\text{алк}} = k'_0$ в комплексе, если реакция в комплексе двухстадийна.

Сравнение значений k_{+1} и k_{-1} для образования $\text{A}_n \cdot \text{U}_n$ комплексов по данным работ [21, 22] с k_0 по [18] показывает, что при 0° для используемых концентраций k_0 на 8—9 порядков меньше суммы $k_{+1}([\text{НК}] + [\text{R}'\text{Cl}]) + k_{-1}$.

Для определения суммарной константы скорости алкилирования нуклеиновой кислоты собственно в комплексе мы можем рассматривать только реакции по пути (3) \rightarrow (5) или (8), что представляется достаточным при соблюдении условий (I) и (II). Такое рассмотрение допустимо, если

Константы скорости алкилирования рРНК 2',3'-O-[4-(N-2-хлорэтил-N-метил-амино)бензилиден]олигонуклеотидами в комплексах в зависимости от температуры (буфер А)

Реагент	Температура, °C	$k_{\text{алк}}$, с ⁻¹	k_0 , для (Me)pURCl, с ⁻¹ [6, 20]
(Np) ₅ NRCl	18,3	$(4,40 \pm 0,16) \cdot 10^{-6}$	$3,4 \cdot 10^{-6}$
	18,0	$(3,82 \pm 0,32) \cdot 10^{-6}$	
	32,0	$0,79 \cdot 10^{-5}$	$3,89 \cdot 10^{-5}$
	40,0	$(3,56 \pm 1,0) \cdot 10^{-5}$	$1,15 \cdot 10^{-4}$
(pN) ₅ RCl	25	$(8,4 \pm 1,3) \cdot 10^{-6}$	$1,56 \cdot 10^{-5}$
	30	$(1,40 \pm 0,36) \cdot 10^{-5}$	$2,09 \cdot 10^{-5}$
	40	$(4,87 \pm 0,97) \cdot 10^{-5}$	$1,15 \cdot 10^{-4}$
	20	$(6,9 \pm 0,18) \cdot 10^{-6}$	$6,3 \cdot 10^{-6}$
(pC) ₆ RCl *	20	$7,3 \cdot 10^{-6}$	

* Для алкилирования 23S-РНК.

реакция протекает в комплексе, достигающем равновесия, и если в этих комплексах взаимодействие близко количественному. Основанием к такому рассмотрению служат высокие значения p/s в комплексе, близость степени ковалентного присоединения реагентов к РНК [1, 3] и степени связывания реагентов в комплексы [3, 20], а также данные о продуктах реакции в комплексах, свидетельствующие о количественном алкилировании аденина, гуанина, цитозина и участия в этой реакции фосфодиэфирных групп [3]. Реакции (3) → (5) или (8) кинетически неразличимы, и поэтому о механизме можно судить, только сопоставляя значения $k_{\text{алк}}$ и k_0 . Поэтому, если соотношение (II) соблюдается, то из стационарности концентраций промежуточной частицы

$$\frac{d[\text{НК} \cdot \text{R}^+]}{dt} = k'_0[\text{НК} \cdot \text{R}'\text{Cl}] - k_5[\text{НК} \cdot \text{R}^+] = 0,$$

$$[\text{НК} \cdot \text{R}'\text{Cl}]_0 = [\text{НК} \cdot \text{R}'\text{Cl}] + [\text{НК} \cdot \text{R}^+] + [\text{НК} \cdot \text{R}'].$$

Или, пренебрегая малой концентрацией активных промежуточных частиц:

$$[\text{НК} \cdot \text{R}'\text{Cl}]_0 \cong [\text{НК} \cdot \text{R}'\text{Cl}] + [\text{НК} \cdot \text{R}'],$$

отсюда

$$\frac{d[\text{НК} \cdot \text{R}']}{dt} = k'_0 \{[\text{НК} \cdot \text{R}'\text{Cl}]_0 - [\text{НК} \cdot \text{R}']\}$$

и, следовательно,

$$k_{\text{алк}}t = k'_0t = \ln \frac{\{[\text{НК} \cdot \text{R}'\text{Cl}]_0 - [\text{НК} \cdot \text{R}']\}}{[\text{НК} \cdot \text{R}'\text{Cl}]_0}. \quad (\text{III})$$

В табл. 3 приведены значения $k_{\text{алк}}$ первого порядка, вычисленные из кинетических кривых графически и по уравнению (III). Начальную концентрацию комплекса РНК с (Np)_{n-1}NRCl определяли из величины плато кинетической кривой, принимая, что путь (9) практически не реализуется. Значения $k_{\text{алк}}$ близки значениям k_0 для ионизации хлора в растворе и мало зависят от вида реагента, его длины, характера комплексов. От температуры полученные $k_{\text{алк}}$ зависят аналогично k_0 для ионизации хлора в растворе.

Эти результаты означают, что алкилирование в подавляющем большинстве комплексов, как и в растворе, протекает по двухстадийному механизму с лимитирующей стадией образования промежуточной частицы (путь (1) → (3) → (5) на схеме). Кинетика реакции в комплексе опреде-

ляется k_0' , p/s и концентрацией комплексов, т. е. константами равновесия. Для алкилирования в комплексе и в растворе k_0' и k_0 практически одинаковы. Следовательно, хлорэтиламиногруппа реагента в комплексе НК·(Np)_{n-1}NRCl не сближена ни с одним из нуклеофильных центров нуклеиновой кислоты настолько, чтобы они могли конкурировать с азотом аминогруппы за взаимодействие с углеродом С—С-связи или влиять на сольватную оболочку хлорэтиламиногруппы и менять сольватационные эффекты. Это в свою очередь указывает на отсутствие особого конформационного соответствия реакционных центров на первой стадии реакции. Различия в скорости алкилирования в комплексе и в растворе, таким образом, определяются второй стадией реакции: взаимодействием этиленимоний-катиона с нуклеиновой кислотой в комплексе.

Согласно [7—10], ускорение реакции в комплексах по сравнению с бимолекулярными реакциями в растворах отражает эффективную концентрацию в мольных долях одного вещества относительно другого, когда бимолекулярная реакция будет протекать как псевдомономолекулярная с той же численной константой скорости, что и реакция в комплексе. Если полученная эффективная концентрация выше реально достижимой, то ускорение реакции связывают, кроме концентрационных, с другими эффектами, из которых ориентационные эффекты относятся к основным [6, 7]. На этом основании различие в p/s для псевдомономолекулярного процесса в комплексе и бимолекулярной реакции в растворе при одинаково протекающем гидролизе сводится к различию в эффективной концентрации не менее чем 12 М нуклеофильных группировок нуклеиновой кислоты вокруг реагента. Это, на наш взгляд, превышает реально достижимую концентрацию в несколько раз, если принять, что реальная эффективная концентрация воды принимается 10 [8] или 55 М [6]. Отсюда обнаруженное ускорение алкилирования в комплексах на второй стадии происходит благодаря особой взаимной ориентации реагирующих группировок, возникающей в комплексе, вероятно, вследствие образования положительно заряженной группы в (Np)_{n-1}NR⁺ и ее электростатического эффекта на ориентацию реакционных центров уже сближенных в комплексе реагирующих частиц.

Экспериментальная часть

рРНК выделяли фенольной экстракцией биомассы *E. coli* MRE-600 по методике работы [23] или рибосом [24]: $E_{260}^{0.1\%}$ 18—20 в 0,2 М NaCl, 0,01 М MgCl₂, 0,1 М Трис-HCl, pH 7,3 (буфер А). 23S-РНК выделяли ультрацентрифугированием рРНК, полученной из рибосом, в линейном градиенте сахаразы от 5 до 20% в 0,1 М Трис-HCl-буфере, содержащем 0,01 М MgCl₂, 0,05 М NH₄Cl, pH 7,4 (Spinco L-65, США, ротор SW-25, 25 000 об/мин), 20 ч при 4° [25]. Об индивидуальности 23S-РНК и 16S- +23S-РНК судили по данным центрифугирования в сахарозном градиенте и электрофореза в полиакриламидном геле. По УФ-поглощению растворов соотношение 16S- и 23S-РНК 1 : 2. Содержание белка по Лоури менее 1%.

Концентрацию рРНК рассчитывали по УФ-поглощению раствора в буфере А. Молярную экстинкцию полимеров ϵ_{260} (pH 7,3) определяли после щелочного гидролиза в 0,3 н. КОН при 37° в течение 20 ч. Молярную экстинкцию одного мономерного звена, равную в среднем $10,48 \cdot 10^3$ для 16S- +23S-РНК и $10,40 \cdot 10^3$ — для 23S-РНК при pH 7 (вычислено на основании нуклеотидного состава [26]), рассчитывали на 5100 нуклеотидов для 16S- +23S-РНК ($33 \cdot 10^6$ — $36 \cdot 10^6$) и на 3400 нуклеотидов для 23S-РНК ($28,5 \cdot 10^6$) [27].

ДНК *E. coli* выделяли из биомассы *E. coli* MRE-600 четырехкратной экстракцией фенолом [28]. ДНК селезенки крупного рогатого скота — препарат завода химреактивов (Олайне, ЛатвССР), ДНК очищали гель-фильтрацией на сефадексе G-100 (Pharmacia, Швеция) либо 20-часовым

ультрацентрифугированием при 20° в щелочном градиенте плотности сахарозы (5—25%). Фракции, содержащие ДНК, нейтрализовали и осаждали спиртом. Коэффициенты седиментации выделенных ДНК вычисляли с помощью маркера ДНК фага T7 (ДНК селезенки 8—10S, ДНК *E. coli* 9—11S или 50S). По данным щелочного гидролиза, примеси РНК и белка по Фолину в полученных препаратах ДНК не обнаружено.

Экстинкция при 260 нм усредненного нуклеотида денатурированной ДНК *E. coli* (50S) — $7,25 \cdot 10^3$ и ДНК селезенки — $7,20 \cdot 10^3$. Эти величины рассчитывали на основании содержания фосфора, поглощения растворов ДНК до и после гидролиза ДНКазой и фосфодиэстеразой змеиного яда в буфере А и нуклеотидного состава [29, 30]. Концентрацию ДНК выражали в молях полимера в расчете на 10 000 нуклеотидов; ДНК денатурировали, нагревая ее растворы 15 мин в 0,01 М Трис-НСl-буфере, рН 7,3, при 96° и быстро охлаждали до температуры опыта.

рНК₁^{Val} пекарских дрожжей любезно предоставлена В. Д. Аксельродом (Институт молекулярной биологии, Москва).

Чистота препаратов [¹⁴C](Ar)_{n-1} ARCl, $n = 4-6$ (5 Ки/моль) [20, 31] и [¹⁴C](pC)₆ RCl [32] составляла 92—98%.

[¹⁴C](Np)₅ NRCl и [¹⁴C](pN)₅ RCl получали аналогично описанному в работе [31], (pN)_n — гидролизом рНК эндонуклеазой *Serratia marcescens* [33], (Np)₅N — дефосфорилированием (pN)₆ щелочной фосфоэстеразой [34].

Для выделения комплементарных рНК олигонуклеотидов 1,11 нмоль рНК и 3,5 мкмоль (pN)₆ в 1 мл буфера А выдерживали сутки при 0°, фильтровали через сефадекс G-75 при 0° в буфере А (колонка 50 × 2,1 см, объем фракций 0,6 мл, скорость 24 мл/ч). Полимерную фракцию концентрировали до 1 мл и фильтровали при 45° через сефадекс G-75 (50 × 2,1 см) в 0,01 М Трис-НСl-буфере, рН 7,3. Фракцию (pN)₆ обессоливали, упаривали и превращали в [¹⁴C]p(Np)_{n-1} NRCl (5 Ки/моль) либо в [¹⁴C](Np)_{n-1} NRCl после предварительного дефосфорилирования. Получение и свойства [¹⁴C]d(pCG)ARCl описаны в работе [2].

Определение эффективности алкилирования в комплексах (табл. 2). Алкилирование РНК проводили по описанной методике [4]. 0,02—0,1 мкМ РНК в 0,1—20 мкМ растворе реагентов в буфере А выдерживали при 5—50° либо до полного превращения реагента в активную промежуточную частицу, либо останавливали по ходу реакции. При частичной ионизации реагентов и при получении кинетических кривых реакцию останавливали, добавляя для гидролиза бензилиденовой связи в реагентах 1 М ацетат натрия до 0,1 М и выдерживали 40 мин при 40°. Алкилированную РНК выделяли осаждением спиртом в присутствии NaCl и этилендиаминтетрауксусной кислоты или гель-фильтрацией на сефадексе G-75. Степень модификации определяли по радиоактивности и выражали в молях реагента, присоединившегося к молю РНК.

Алкилирование ДНК проводили аналогично работе [4]. Концентрация ДНК — 1—2 ОЕ₂₆₀/мл, реагента — 0,1—10 мкМ. Алкилированную ДНК выделяли гель-фильтрацией на сефадексе. О количестве реагента, связанного с ДНК, судили по радиоактивности и степень модификации выражали в молях остатков реагента на 10⁴ моль нуклеотидов ДНК.

После некоторых преобразований формулы из работы [35] вычисляли p/s :

$$\begin{aligned} p/s &= \ln \frac{b \cdot [\text{НК}]_0}{b \cdot [\text{НК}]_0 - [\text{R}' - \text{НК}]} / \{[\text{R}'\text{Cl}]_0(1 - e^{-k_0 t}) - [\text{R}' - \text{НК}]\} = \\ &= 2,3 \lg \frac{b}{b - ra} / [\text{РНК}]_0 [a(1 - e^{-k_0 t}) - ra] = \\ &= 2,3 \lg \frac{b}{b - ra} / [\text{РНК}]_0 a(1 - e^{-k_0 t} - r), \end{aligned}$$

где $[\text{НК}]_0$ — исходная концентрация нуклеиновой кислоты, М; $\text{R}'\text{Cl}$ —

$(Nr)_{n-1} NRCl$; b — число участков связывания; $b \cdot [HK]_0$ — начальная концентрация участков связывания реагента; $a = [R'Cl]_0/[HK]_0$; k_0 — константа скорости образования промежуточной алкилирующей частицы (отщепления хлор-иона); $[R'-HK]$ — концентрация продуктов алкилирования, равная $ra [HK]_0$, где r — мольная доля реагента, израсходованного на алкилирование РНК; ra — степень алкилирования в молях реагента на моль НК.

Исследование кинетики алкилирования. 0,06—0,41 мкМ рРНК и 23S-РНК алкилировали $(Ar)_5ARCl$, $(pC)_6RCl$, $(Nr)_5NRCl$ и $(pN)_5RCl$ в буфере А при 18—41° при концентрациях реагентов, не превышающих концентрации участков связывания. Через определенные промежутки времени отбирали пробы по 0,1—0,3 мл. Реакцию останавливали как описано выше. Непрореагировавший реагент отделяли гель-фильтрацией на сефадексе G-75 при 45—60° в 0,01 М Трис-НСl-буфере, рН 7,5. Степень модификации определяли по радиоактивности полимерной фракции и выражали в молях реагента, присоединившегося к молью РНК. Для отделения алкилированной РНК после гидролиза бензидиновой связи применяли также осаждение РНК 2-кратным избытком этилового спирта из раствора в 2 М NaCl.

Расчет константы скорости алкилирования РНК в комплексе, $k_{алк}$, с вышеперечисленными реагентами проводили графически или по уравнению (IV), где $[РНК \cdot (Nr)_{n-1}NR]_{\infty}$ — число молей реагента, проалкилировавшего РНК в комплексе, определяемое из величины плато кинетической кривой алкилирования РНК; $[РНК \cdot (Nr)_{n-1}NR]_t$ — число молей реагента, ковалентно связанное с РНК в момент времени t :

$$k_{алк}t = \ln \frac{[РНК \cdot (Nr)_{n-1}NR]_{\infty}}{[РНК \cdot (Nr)_{n-1}NR]_{\infty} - [РНК \cdot (Nr)_{n-1}NR]_t} \quad (IV)$$

Авторы благодарят Д. Г. Кнорре за ценные замечания при обсуждении работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гринева Н. И., Карпова Г. Г. (1974) Молекулярн. биология, 8, 832—844.
2. Гринева Н. И., Карпова Г. Г., Кузнецова Л. М., Чимитова Т. А., Венкстерн Т. В., Шершнева Л. П., Баев А. А. (1976) Молекулярн. биология, 10, 1260—1271.
3. Гринева Н. И., Карпова Г. Г. (1975) Биоорг. химия, 1, 588—597.
4. Гринева Н. И., Карпова Г. Г., Мызина С. Д., Чемасова А. Н. (1975) Биоорг. химия, 1, 1707—1715.
5. Гринева Н. И., Карпова Г. Г., Мызина С. Д., Фодор И., Баев А. А. (1975) Докл. АН СССР, 223, 1477—1481.
6. Дженкс В. (1972) Катализ в химии и энзимологии, «Мир», М.
7. Кошланд Д. (1971) Ж. Всес. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева, 16, 158—165.
8. Уэстли Дж. (1972) Ферментативный катализ, «Мир», М.
9. Baker R. V. (1967) Design of Active-Site-Directed Irreversible Enzymes Inhibitors, J. Wiley, N. Y.
10. Диксон М., Уэбб Л. (1966) Ферменты, «Мир», М.
11. Benn M. H., Kazmaier P., Watanatada C. (1970) J. Chem. Soc., Chem. Commun., 1685—1687.
12. Власов В. В., Гринева Н. И., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г. (1970) Молекулярн. биология, 4, 201—204.
13. Беликова А. М., Вахрушева Т. Е., Власов В. В., Гринева Н. И., Кнорре Д. Г., Курбатов В. А. (1969) Молекулярн. биология, 3, 210—220.
14. Гринева Н. И., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Курбатов В. А. (1971) Докл. АН СССР, 194, 331—334.
15. Веньямина А. Г., Гринева Н. И. (1971) Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим., вып. 4, 111—118.
16. Гринева Н. И., Кнорре Д. Г., Севженко Л. П., Теплова Н. М. (1970) Молекулярн. биология, 4, 307—312.
17. Власов В. В., Кнорре Д. Г. (1974) Молекулярн. биология, 8, 234—243.
18. Власов В. В., Гринева Н. И., Кнорре Д. Г. (1969) Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим., вып. 1, 104—109.

19. Зеликова А. М., Гринева Н. И., Карпова Г. Г. (1972) Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим., вып. 4, 110—116.
20. Гринева Н. И., Карпова Г. Г., Шамовский Г. Г. (1974) Молекулярн. биология, 8, 358—371.
21. Pörschke M., Eigen M. (1971) J. Mol. Biol., 62, 361—381.
22. Pörschke M., Uhlenbeck O. C., Martin F. N. (1973) Biopolymers, 12, 1313—1335.
23. Збарский И. Б., Дебов С. С. (1968) Химия и биохимия нуклеиновых кислот, с. 94, «Медицина», Л.
24. Nirenberg M. W., Matthaei J. H. (1961) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 47, 1588—1602.
25. Мак-Конки Э. (1970) в сб. Методы исследования нуклеиновых кислот, с. 127—138, «Мир», М.
26. Спирия А. С., Гаврилова Л. П. (1974) Рибосома, с. 73, «Наука», М.
27. Fellner P. (1971) Biochemie, 53, 573—583.
28. Thomas C. A., Berns K. I., Kelly T. J. (1967) in Procedures in Nucleic Acids Research (Cantoni G. L., Davies D. R., eds.), p. 535.
29. Зеликова А. М., Гринева Н. И., Кнорре Д. Г., Мызина С. Д. (1973) Докл. АН СССР, 212, 876—879.
30. Спирия А. С. (1962) Успехи биол. химии, 4, 93—133.
31. Grineva N. I., Karпова G. G. (1973) FEBS Lett., 32, 351—355.
32. Райт В. К., Карпова Г. Г., Гринева Н. И. (1977) Биоорган. химия, 3, 31—38.
33. Vasilenko S. K., Ankilova V. N., Dimitrova F. F., Serbo N. A. (1972) FEBS Lett., 27, 215—218.
34. Василенко С. К. (1964) Биохимия, 29, 1190—1198.
35. Гринева Н. И., Кнорре Д. Г., Курбатов В. А. (1971) Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим., вып. 2, 107—111.

Поступила в редакцию
10.VIII.1976
После доработки
30.XII.1976

**ON MECHANISM OF NUCLEIC ACID ALKYLATION WITHIN COMPLEMENTARY
COMPLEXES. THE KINETICS OF RNA AND DNA ALKYLATION BY
2',3'-O-[4-(N-2-CHLOROETHYL-N-METHYLAMINO)BENZYLIDENE]
OLIGONUCLEOTIDES**

BENIMETSKAYA L. Z., GRINEVA N. I., KARPOVA G. G.,
ПИЧКО Н. П., ШИМИТОВА Т. А.

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

The study was made of the RNA and DNA alkylation within the complementary complexes using alkylating derivatives of oligoadenylates, oligocytidylates, d(pCG)A, and mixed hexa- or pentanucleotides (Np)_{*n*-1}NRCl. Alkylation was shown to proceed via a two-stage mechanism whereby at the rate-limiting stage an active intermediate is formed, characterized by the rate constant approaching the ionization constant (k_0) of C-Cl bond in (Np)_{*n*-1}NRCl in the solution. Similarly to k_0 , the rate constant for the total process of alkylation within the complex does not depend on the chain-length and nature of oligonucleotide moiety of the reagent, at the same time manifesting temperature dependence analogous to that for k_0 . At the second stage, considerable increase in the alkylation rate is observed as compared to the reaction in solution. Under the conditions of reagent complexation, the apparent effectivity of alkylation was estimated and its dependence on the complexation conditions and parameters demonstrated. The rate of alkylation within the complex at 10^{-4} — 10^{-6} M concentrations of nucleic acids is 5-7 orders of magnitude higher than the reaction in solution. Whatever the complex concentration, alkylation in the complex is equivalent to that with at least 12 M reactants in solution.