



УДК 547.963.32.04

АЛКИЛИРОВАННЫЕ ОСНОВАНИЯ, ОБРАЗУЮЩИЕСЯ ПРИ 5'-КОМПЛЕМЕНТАРНО АДРЕСОВАННОЙ МОДИФИКАЦИИ ДНК, И КИНЕТИКА ИХ ЭЛИМИНИРОВАНИЯ В УСЛОВИЯХ АЛКИЛИРОВАНИЯ

Бенимецкая Л. Э., Карнова Г. Г., Гринева Н. И.

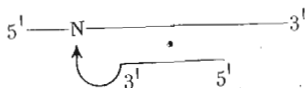
Новосибирский государственный университет;

Новосибирский институт органической химии СО АН СССР;

Центральный научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови, Москва

При алкилировании денатурированной ДНК селезенки быка в комплексе с $(Ar)_5ARCl$ образуются 3-RAde, 7-RGua и 7-RAde. Их количество в условиях насыщения реагентом при 20° составляет соответственно 13, 8 и 4 на 10 000 нуклеотидов ДНК в среднем. В условиях алкилирования или элиминирования происходит расщепление имидазольного цикла 7-RAde. Определены константы скорости элиминирования алкилированных оснований из ДНК в условиях алкилирования (рН 7,4) и их зависимость от температуры. Константа скорости элиминирования 3-RAde в 4—6 раз выше константы скорости элиминирования 7-RGua и расщепленного 7-RAde. Скорость элиминирования оснований в 12—100 раз ниже скорости ионизации C—Cl-связи в реагентах, лимитирующей стадии алкилирования.

При алкилировании РНК или ДНК в комплементарных комплексах с бензилиденовыми производными олигонуклеотидов, содержащими алкилирующую группировку на 3'-конце, протекает 5'-комплементарно адресованная модификация, заключающаяся в алкилировании оснований, расположенных вблизи 5'-конца участка нуклеиновой кислоты, комплементарного реагенту [1, 2]:



Алкилирующие производные различных олигонуклеотидов в комплексе с РНК алкилируют многие основания с образованием 7-алкилгуанина, 3-алкилцитозина, алкилпсевдоуридина, алкилгипоксантина и алкиладенина; место алкилирования последних не установлено [1, 3].

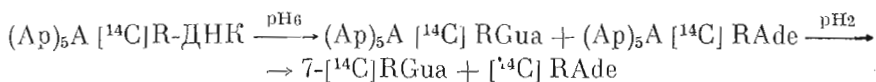
В комплексах с ДНК производное гексаденилата алкилирует практически только гуанин и аденин. Положение заместителя при алкилировании аденина и в этом случае неизвестно [4]. Согласно данным [5—7],

Принятые сокращения: $(Ar)_5ARCl$, $URCl$, $(Me)_pURCl$ — 2',3'-[4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензилиден]гексаденилат, уридин и его 5'-метилфосфат; RAde, RGua — 2-(N-метил-N-4-формилфениламино)этиладенин и гуанин; RCl — 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензальдегид.

гликозидные связи 3- и 7-алкиладенозинов нестабильны. Поэтому параллельно с алкилированием в комплексах (особенно при повышенной температуре, необходимой для точного узнавания реагентом участка связывания) может протекать и элиминирование алкилированных оснований. Это может привести к неверному суждению о степени модификации и числе комплементарных реагенту последовательностей в ДНК.

Целью данной работы являлось установление строения алкилированных аденинов и определение кинетики элиминирования из ДНК этих соединений и идентифицированного ранее 7-RGua [4] в условиях алкилирования в комплексах (рН 7,4). Ранее были определены константы скорости элиминирования при рН 6 оснований из ДНК, алкилированной (Me)₃URCl и URCl вне комплексов, и показано, что при рН 6 одновременно с алкилированием протекает элиминирование модифицированных оснований со скоростью, зависящей от рН и строения заместителя [8, 9].

Для идентификации алкилированных оснований в данной работе получили ДНК селезенки быка, модифицированную в комплексе в условиях насыщения ДНК реагентом [¹⁴C](Ap)₅ARCl при 20° [4]. При этом алкилировалось максимальное количество оснований ДНК: 25 из 1000. Алкилированные основания элиминировали из ДНК при рН 6 и 60° [8] и образующиеся вещества идентифицировали после гидролиза бензилиденовой группировки в замещающих остатках реагента при рН 2 и 40°:



При хроматографии на бумаге в системе А основания, содержащие радиоактивный остаток R, разделяются на 7-RGua (31 %) и смесь алкилированных по различным положениям RAde (67 %) (табл. 1).

Алкилированные основания количественно элиминируются из ДНК как при рН 6 (60°, 8 ч), так и при 7,4 (70°, 20 ч); состав элиминированных веществ в обоих случаях одинаков (табл. 1). Кроме описанных в работе [4], были обнаружены неидентифицированные вещества *N*₁ и *N*₂. Оказалось, что присутствие этих веществ и их количество зависят от условий гидролиза бензилиденовой связи. Увеличение времени гидролиза и понижение рН среды уменьшают содержание *N*₁ и *N*₂, которые при этом превращаются в RAde. Через 40 мин при рН 3 и 40° остается до 30 % *N*₁ и *N*₂, а через 2 ч их содержание уменьшается втрое. Если элиминирование оснований проводилось при рН 6 и 60°, когда одновременно гидролизуются гликозидная и бензилиденовая связи, то содержание *N*₁ и *N*₂ после дополнительной обработки продуктов элиминирования при рН 4 и 40° (40 мин) составляет в сумме 16 %.

При анализе скорости элиминирования алкилированных оснований при 70° видно, что полулогарифмическая анаморфоза кинетической кривой накопления продукта с *R*_f 0,70 в системе А, являющегося RAde [4], состоит из 2 линейных участков (рис. 1). Это свидетельствовало о накоплении по крайней мере двух веществ с заметно различающимися скоростями элиминирования и, значит, о гетерогенности продукта с *R*_f 0,70. Плохое разделение изомерных алкилированных аденинов — явление обычное, так как они имеют близкие *R*_f во многих системах [7, 10]. Дополнительное разделение смеси RAde на дауэксе 50 (NH₄⁺-форма) по аналогии с метил-аденинами [10] привело к выделению трех веществ (рис. 2), гомогенных в трех системах растворителей (табл. 1). Первое из веществ, основное по содержанию (70 %), является 3-RAde на основании совпадения разностного УФ-спектра его и RCl с УФ-спектром 3-MeAde [7] при трех значениях рН (табл. 2 и 3); его строение согласуется с положением на профиле элюции с дауэкса 50 [10] и наибольшей скоростью элиминирования 3-MeAde из ДНК [11]. Основное количество продукта RAde накапливается с константой скорости 2,6 · 10⁻⁴ с⁻¹; после элиминирования 70 % оснований кон-

Таблица 1

**Состав и хроматографическая подвижность элиминированных
из ДНК алкилированных оснований и изомерных им соединений**

Вещество	R_f в системах				R_{Ade}^*	Содержание после элиминирова- ния, %		
	А	Б	В	Г		рН гидролиза		
						4 **	2 **	3 ***
7-RGua	0,40	0,20	0,37	0,39	0,74	30,6	31,4	31
(I)	0,7	0,27	0,79	0,81	1,0	53,4	47,1	
(II)	0,7	0,35	0,80	0,88	1,3	10,0	10,0	
(III)	0,7	0,20	0,70	0,85	0,74	6,0	1,5	59
N_1	0,16					10	—	5
N_2	0,84							5
3-MeAde [12]					1,0			
1-MeAde [12]					0,62			
7-MeAde [12]					0,77			
N^5 -Метил- N^5 -Формил- 4,5,6-триаминопири- мидин [12]					0,77			
7-RGua [14]	0,40		0,44					
N^6 -MeAde [12]					1,7			
N^6 -RAde [20]			0,75	0,88				
1-RAde [20]			0,61	0,74				

* Хроматографическая подвижность относительно соответствующего 3-алкиладенина, в системе Б.

** Элиминирование при рН 6.

*** Элиминирование при рН 7,4.

Таблица 2

**УФ-спектры алкилированных оснований, элиминированных из модифицированной
ДНК, и изомерных им соединений**

Вещество	рН	λ_{\max} , нм	$\epsilon_{\max} \cdot 10^{-3}$	λ_{\min} , нм	$\epsilon_{\min} \cdot 10^{-3}$
3-RAde	1	273, 350			
	7	245 плечо 275, 350	12,5; 28,8	235, 310 245, 300	6,7; 8,1
	13	275, 350		245, 305	
(II)	1	260, 350		230, 290	
	7	265, 350	10,1; 28,8	240, 290	6,0; 4,2
	13	270, 350		240, 310	
(III)	1	265, 350			
	7	245 плечо 270, 350	11,9; 28,8	230, 293 233, 300	7,6; 7,7
	13	275, 350		240, 310	
N^6 -RAde [20]	1	265, 350	28,8	235, 295	
	7	275, 350	28,8	233, 295	
	12	275, 350		234, 295	
1-RAde [3, 20]	2	260, 350		240, 287	
	7	278, 350		— 300	
	11	277, 350		230, 300	
N^5 -Формил- N^5 -[β -(N- 4-формилфенил-N- метиламино)- этил]-2,5,6-триами- нопиридин-4-он [14]	1	273, 350		302	
	7	277, 350		259, 302	
	13	350		289	

Таблица 3
Разностные УФ-спектры алкилированных оснований с RCl

Вещества	рН 1						рН 7						рН 13							
	$\lambda_{\text{макс}}$	$\lambda_{\text{мин}}$	$\frac{D_{250}}{D_{260}}$	$\frac{D_{270}}{D_{280}}$	$\frac{D_{280}}{D_{290}}$	$\frac{D_{300}}{D_{360}}$	$\lambda_{\text{макс}}$	$\lambda_{\text{мин}}$	$\frac{D_{250}}{D_{260}}$	$\frac{D_{270}}{D_{280}}$	$\frac{D_{280}}{D_{290}}$	$\frac{D_{320}}{D_{360}}$	$\frac{D_{350}}{D_{360}}$	$\lambda_{\text{макс}}$	$\lambda_{\text{мин}}$	$\frac{D_{250}}{D_{260}}$	$\frac{D_{270}}{D_{280}}$	$\frac{D_{280}}{D_{290}}$	$\frac{D_{320}}{D_{360}}$	$\frac{D_{350}}{D_{360}}$
	3-RAde (II) (III) 3-MeAde [7] 1-MeAde [7] N ⁵ -Метил-N ⁵ -формил-4, 5,6-триаминопиримидин [12] 7-MeAde [7] N ⁶ -MeAde [7] 3-MeGua [22]	270 260 265 274 259 265 273 267 244	235 230 230 236 229 238 237 231	0,57 0,42 0,61 0,60 0,67 0,75 0,76	1,12 0,80 1,20 1,55 0,91 1,15 1,19	0,87 0,47 0,96 1,52 0,23 0,85 1,03	0,54 0,27 0,60 0,79 0,02 0,51 0,05	275 265 270 273 263 272 266	245 240 233 243 238 232 229	0,38 0,36 0,62 0,48 0,85 0,61 0,61	1,43 1,16 1,40 1,70 0,81 1,34	0,80 0,13 0,61 0,98 0,11 0,49	1,35 0,62 0,98 1,55 0,31 1,20	1,50 1,20 1,36 1,62 1,40 1,13 1,22	245 240 245 244 241 247 238 240	0,36 0,50 0,58 0,52 0,55 0,91 0,72	1,40 0,95 1,29 1,77 1,09 0,95 0,86	0,85 0,50 0,90 1,25 0,55 0,59 0,70		

* При рН 11.

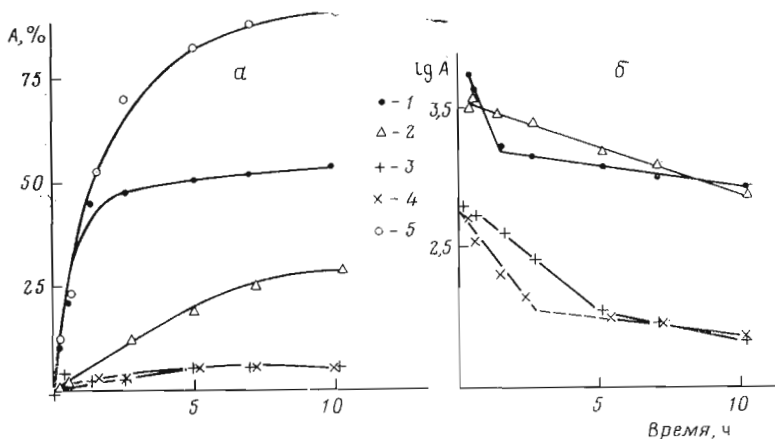


Рис. 1. Кинетические кривые элиминирования (выход A , %) модифицированных оснований из ДНК селезенки, алкилированной в комплексе $(Ar)_5ARCl$ (а) и их полупологарифмические анаморфозы (б). Накопление 3-RAde (1), 7-RGua (2), веществ N_1 (3) и N_2 (4), суммы алкилированных оснований (5); 0,01 М трис-HCl (pH 7,4), 70°

станта скорости накопления остальных алкилированных веществ оказывается в 6 раз ниже (рис. 1).

Вещество из фракции (III) (рис. 2) по разностным спектрам с RCl, положению на профиле элюции с колонки, относительной хроматографической подвижности и низкой константе скорости элиминирования из ДНК отнесено к продукту гидролитического расщепления имидазольного цикла 7-RAde — N^6 -формил- N^5 -[β -(N -4-формилфенил- N -метиламино)этил-4, 5, 6-триаминопиримидину (табл. 3). В 7-алкиладенинах, образующихся в заметных количествах при алкилировании двухтяжевых ДНК [6, 7], как известно, легко раскрывается имидазольный цикл [7, 12]. В этом случае, вероятно, как и после раскрытия имидазольного цикла 7-алкилгуанинов в составе ДНК, гликозидная связь несколько стабилизируется [13].

Вещество фракции (II) (рис. 2) идентифицировать не удалось. По свойствам (табл. 1—3) оно отличается от продуктов гидролитического расщепления имидазольного цикла 7-RGua [14], от 1-RAde, N^6 -RAde и 3-алкилцитозина, который не элиминируется из ДНК в нейтральных средах [8, 9], хотя разностный спектр его и RCl по λ_{\max} и λ_{\min} близок к 1-MeAde, а по спектральным отношениям — к 7-MeAde (табл. 3). Скорость элиминирования веществ (II) и (III) одинакова; так, после быстрого элиминирования $\sim 70\%$ оснований, соответствующих 3-RAde, скорость выщелчения тормозится и оставшиеся 30% оснований, соответствующие в сумме содержанию веществ (II) и (III), элиминируются в 6 раз медленнее, чем 3-RAde. Линейный участок кинетической кривой, соответствующий этому процессу, свидетельствует о том, что эти вещества либо имеют одинаковую скорость элиминирования, либо одно возникает из другого в условиях выделения или анализа элиминированных оснований. Так, аналогично продуктам расщепления 7-RGua [14] и 1-RAde [3] вещества (III) и 3-RAde нестабильны в кислоте, применяемой для гидролиза бензиденовой связи, и могут быть источниками вещества (II).

Полученные данные позволяют заключить, что главным направлением алкилирования ДНК селезенки быка в комплексе с $(Ar)_5ARCl$ является модификация аденина по положению 3 (47%) и гуанина по положению 7 (31%); в комплексе с $(Ar)_5ARCl$ образуется также 10—20% 7-RAde (табл. 1). Это свидетельствует о том, что вблизи 5'-концов 25 олигонуклеотидовых последовательностей, связывающих реагент $(Ar)_5ARCl$ в комплексе с ДНК длиной в 10 килобаз, встречаются в среднем 8 гуанинов и 17

аденинов. Такое распределение алкилированных оснований отличается от содержания Gua (22,7%) и Ade (27,9%) в ДНК селезенки быка [15].

Образование двух изомерных алкиладенинов, хотя и обычное явление при алкилировании ДНК в растворе (вне комплекса), при модификации в комплексе указывает на отсутствие в нем жесткой конформации модифицирующей группы реагента или на образование нескольких конформаций комплексов. Одной из причин этого явления может быть разная конфигурация бензильденовой группы реагента. Кроме того, не исключено, что это связано с различием в расположении модифицирующей группы относительно аденинов ДНК в комплексах полного и неполного спаривания.

Для определения констант скорости элиминирования алкилированных оснований в условиях алкилирования ДНК, модифицированную как описано выше (степень алкилирования $25 (Ap)_5AR$ на 10 килобаз), выдерживали при 70° и рН 7,4 в 0,01 М трис-НСl. Элиминированные основания гидролизовали при рН 3 (40° , 2 ч) и с помощью хроматографии на бумаге в системе А определяли содержание 7-RGua, смеси R-Ade (R_f 0,7), N_1 и N_2 . На рис. 1 приведены кинетические кривые накопления этих веществ. Анаморфоза кинетической кривой накопления 7-RGua свидетельствует о реакции первого порядка, протекающей с константой скорости $5,3 \cdot 10^{-5} \text{ с}^{-1}$ (табл. 4). Анаморфоза кинетической кривой накопления RAdе, как уже упоминалось, состоит из двух линейных участков, которые соответствуют элиминированию 3-RAdе (70% оснований) и суммы веществ (II) и (III) (~30%). Из наклона этих линейных участков оценены константы скорости элиминирования. Константа скорости элиминирования 3-RAdе в 6—7 раз превышает константу скорости элиминирования веществ (II) и (III) и в 5 раз — константу скорости элиминирования 7-RGua.

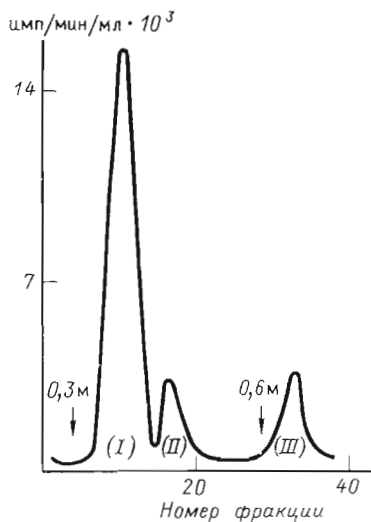


Рис. 2. Профиль разделения алкилированных производных аденина, элиминированных из ДНК, алкилированной $(Ap)_5ARCl$ в комплексе, на дауэксе 50 (NH_4^+) в формате аммония, рН 8,9

Таблица 4

Константы скорости элиминирования ($e^{-1} \cdot 10^4$) алкилированных оснований из ДНК селезенки, модифицированной в комплексах с $(Ap)_5ARCl$, при разных температурах

Элиминированные основания	70° (29) *	60° (10,8) *	50° (3) *
3-RAdе	2,6		
Вещества (II) и (III)	0,4		
7-RGua	0,53		
N_1'	1,0		
N_1''	0,14		
N_2'	1,6		
N_2''	0,28		
3-RAdе+ N_1 + N_2	1,3	0,3	0,09
7-RGua+вещества (II) и (III)+ N_1'' + N_2''	0,3	0,1	0,03

* В скобках для сравнения приведена величина константы скорости ионизации C—Cl-связи, лимитирующей стадии алкилирования [16], $k_0 \cdot 10^4, \text{ с}^{-1}$.

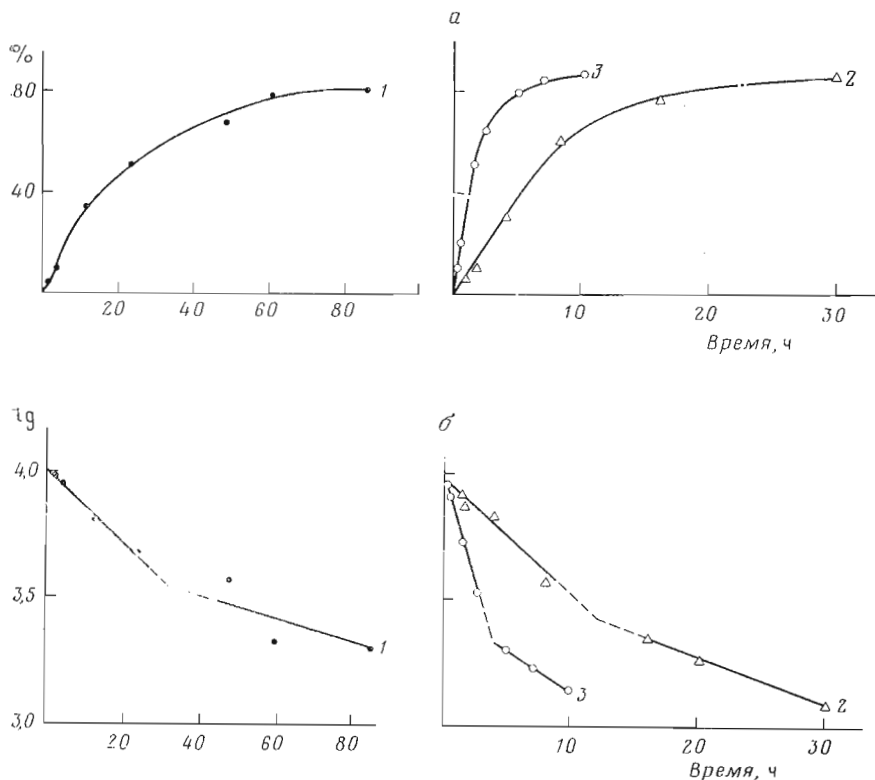


Рис. 3. Кинетические кривые элиминирования смеси модифицированных оснований из алкилированной ДНК при различной температуре (а) и их полулогарифмические анаморфозы (б). 1 — 50, 2 — 60, 3 — 70°

Кинетические кривые накопления веществ N_1 и N_2 в полулогарифмических координатах (рис. 1), так же как и кривые накопления RAdе, состоят из двух линейных участков с разными наклонами, соответствующими константам скоростей элиминирования, различающимися в 6—7 раз аналогично константам для 3-RAdе и для веществ (II) и (III). Это указывает на гетерогенность веществ N_1 и N_2 , которые, как и RAdе, содержат быстро элиминирующиеся компоненты N_1' и N_2' (вероятно, производные 3-RAdе) и медленно элиминирующиеся N_1'' и N_2'' , подобные веществам (II) и/или (III) (табл. 4).

Близость констант скоростей элиминирования 7-RGua и веществ (II) и (III) при большом их отличии от константы для 3-RAdе позволяет оценить эти величины по кинетическим кривым накопления оснований без разделения на бумаге (рис. 3). Константа, полученная из этой кривой для 70°, по наклону первого линейного участка ее анаморфозы соответствует константе для 3-RAdе; наклон второго линейного участка дает константу, отвечающую элиминированию смеси 7-RGua и веществ (II) и (III). Судя по константам для этих веществ, полученным для элиминирования при 70° по данным рис. 1 после хроматографии на бумаге, на первом линейном участке (рис. 3) накопление медленно элиминирующихся веществ не превышает 10%; на втором участке после 3 периодов $t_{1/2}$ элиминирования 90% 3-RAdе уже отщепилось. Следовательно, точность определения констант без разделения веществ на бумаге составляет ~50%.

Зависимость константы скорости элиминирования 3-RAdе от температуры в координатах Аррениуса (рис. 4) дает выражение $K = (4,1 \pm \pm 0,1) \cdot 10^{14} \cdot \exp(-29\,000/RT) \text{ с}^{-1}$. Сравнение полученных констант с известными константами скорости ионизации С—С1-связи, лимитирующей

алкилирование как в растворе [16], так и в комплексах [17] ($K = 6,07 \cdot 10^{13} \cdot \exp(-29\,400/RT) \text{с}^{-1}$ [16]), выявляет, что лабильные алкилированные основания элиминируются в 12—30 раз, а стабильные в 70—100 раз медленнее их образования в составе ДНК (табл. 4). Следовательно, за время, необходимое для полного превращения реагента, элиминирование наиболее лабильного 3-RAde не превысит ошибки определения.

Экспериментальная часть

В работе использовали ДНК селезенки быка (производство Олайнского завода химреактивов, Латвийская ССР). ДНК очищали ультрацентрифугированием в щелочном градиенте плотности сахарозы (5—25%) (Spinco L-65, ротор SW-27 (США), 25 000 об/мин, 17 ч, 20°). Объем градиента 38 мл. В каждую пробирку наносили по 30 ОЕ₂₆₀ ДНК. Фракции, содержащие ДНК, объединяли, нейтрализовали уксусной кислотой до pH 7,0 и осаждали на холоду 2,5 объемами спирта. Осадок ДНК отделяли центрифугированием в течение 15 мин на центрифуге К-23 (ГДР) при 3000—4000 об/мин и температуре 0°.

Коэффициент седиментации ДНК (8—10 S) вычислен после ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы (5—25%) в присутствии маркера ДНК фага T7. Концентрацию ДНК определяли по УФ-поглощению при 260 нм и экстинкции усредненного нуклеотида ϵ , равной $7,20 \cdot 10^3 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$, и выражали в молях полимера длиной в 10 000 нуклеотидов.

$^{14}\text{C}(\text{Ar})_5\text{ARCl}$ получали по методу [18]. Удельная радиоактивность реагента 5 мКи/ммоль. Радиоактивность растворов просчитывали в диоксидном сцинтилляторе, радиоактивность на бумаге — в толуольном, используя счетчик Mark 2 (Nuclear Chicago, США).

Для хроматографии на бумаге применяли следующие системы растворителей: А — изопропанол — аммиак — вода (7 : 1 : 2), Б — бутанол — вода — этанол (80 : 25 : 10), В — изопропанол — конц. HCl — вода (170 : 41 : 39), Г — изопропанол — вода (6 : 4).

Получение алкилированной ДНК. Алкилированную ДНК получали аналогично работе [4]. 200 ОЕ₂₆₀ ДНК в 40 мл 0,01 М трис-HCl (pH 7,4) денатурировали, выдерживая 15 мин в кипящей водяной бане, и быстро охлаждали до температуры опыта (20°), добавляли NaCl до 0,2 М, MgCl₂ до 0,01 М, 5,8 мл 3,1 мкМ раствора $^{14}\text{C}(\text{Ar})_5\text{ARCl}$ в 0,01 М трис-HCl (pH 7,4) и затем 0,01 М трис-HCl (pH 7,4) до конечного объема 100 мл. Раствор выдерживали при 20° в течение 7 сут до полного расходования реагента в соответствии с методикой [16]. Алкилированную ДНК отделяли от избытка реагента переосаждением, как описано выше. Степень модификации определяли по радиоактивности и УФ-поглощению алкилированной ДНК, растворенной в 0,01 М трис-HCl, pH 7,4 (контролировали по соотношению радиоактивности в ДНК и объединенных супернатантах), и выдерживали в молях остатков $^{14}\text{C}(\text{Ar})_5\text{AR}$ на 10^4 нуклеотидов ДНК. Выход алкилированной ДНК 90—95%.

Получение кинетических кривых элиминирования алкилированных оснований. 90 ОЕ₂₆₀ алкилированной ДНК растворяли в 5 мл 0,01 М трис-HCl (pH 7,4) и пробы по 0,2 мл, содержащие по 3,7 ОЕ₂₆₀ ДНК, инкубировали при 50, 60 и 70°. Через определенные промежутки времени реакцию

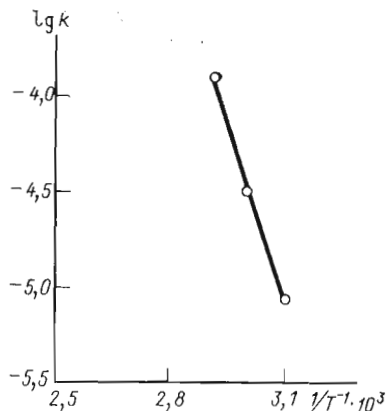


Рис. 4. Зависимость константы скорости элиминирования лабильных соединений из алкилированной ДНК (3-RAde + N_1' + N_2') от абсолютной температуры

в пробах отстаивали осадением ДНК, как описано выше. О степени элиминирования судили по соотношению радиоактивности в ДНК и супернатанте.

Супернатанты, содержащие элиминированные основания, обессоливали на сефадексе G-10 при 4°. Элюцию вели водой, оттитрованной аммиаком до pH 7,0 (колонка 0,8 × 10 см, скорость элюции 20 мл/ч, объем фракций 1 мл). Из каждой фракции отбирали по 0,01 мл на измерение радиоактивности. Выход радиоактивного материала 90%. Фракции, содержащие радиоактивность, объединяли, упаривали досуха, растворяли в 0,2 мл 0,001 н. HCl и выдерживали 2 ч при 40° для гидролиза бензилиденовой связи. Продукты элиминирования при 70° хроматографировали на бумаге FN-1 в системе А. Содержание алкилированных оснований, элиминированных из ДНК, определяли, измеряя радиоактивность хроматограмм. Кинетические кривые приведены на рис. 1 и 3. Константы скорости элиминирования определяли на линейных участках методом наименьших квадратов [19].

Получение алкилированных оснований. 100 ОЕ₂₆₀ алкилированной ДНК растворяли в 7 мл 0,04 М ацетата натрия (pH 6,0) и выдерживали при 60° в течение 8 ч. Элиминированные основания отделяли от ДНК гель-фильтрацией на сефадексе G-75 (колонка 1,0 × 40 см). Для этого на колонку наносили по 3,5 мл раствора, содержащего ДНК в смеси с элиминированными основаниями, элюцию вели 0,001 М трис-HCl (pH 7,4). Скорость элюции 60 мл/ч, объем фракций 1 мл. Из каждой фракции отбирали по 0,1 мл на измерение радиоактивности. Выход радиоактивного материала 95%. Фракции 33—56, содержащие радиоактивный материал, объединяли и раствор концентрировали. Для гидролиза бензилиденовой связи раствор остатка в 1 мл 0,01 М HCl выдерживали 2 ч при 40°.

Идентификация алкилированных оснований. Алкилированные основания разделяли хроматографией на бумаге FN-1 в системе А. RGua (R_f 0,4) и RAde (R_f 0,7) элюировали 0,1 н. HCl и определяли радиоактивность и УФ-поглощение при 260 нм раствора. Раствор, содержащий RAde, упаривали досуха, HCl удаляли упариванием остатка с водой. RAde растворяли в 0,7 мл 0,03 М формиата аммония (pH 8,9) и наносили на колонку с дауксом 50W × 4 (NH₄⁺) (200—400 меш), которую промывали последовательно 25 мл 0,3 М и 25 мл 0,6 М формиата аммония (колонка 0,8 × 10 см, скорость элюции 2,5 мл/ч, объем фракций 0,25 мл). Фракции, содержащие радиоактивный материал, объединяли, формиат аммония удаляли упариванием. Выход 80%. Профиль разделения приведен на рис. 2. Радиоактивный материал каждого пика хроматографировали на бумаге FN-1 в системе Б. Участки хроматограмм соответствующие веществам с R_f 0,27; 0,2 и 0,35, после счета радиоактивности в толуольном сцинтилляторе промывали 3—4 раза эфиром, высушивали и радиоактивный материал элюировали с них 3 мл 0,1 н. HCl в течение 12—15 ч. Элюаты упаривали досуха, следы HCl удаляли упариванием с водой (2—3 раза) и остаток растворяли в 100 мкл 0,01 М трис-HCl (pH 7,0). По 30 мкл этих растворов наносили на бумагу FN-1 и хроматографировали в системах В и Г. В 30—40 мкл раствора полученных веществ с концентрацией 0,5—0,8 ОЕ/мл снимали УФ-спектры при трех значениях pH на микроспектрофотометре МСФП-1 (НИОХ СО АН). Разностные спектры алкилированных оснований снимали против раствора RCl, взятого в концентрации, эквивалентной концентрации алкилированного основания, определенной по радиоактивности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Grineva N. I., Karpova G. G., Kuznetzova L. M., Venkstern T. V., Bayev A. A. (1977) *Nucleic Acids Res.*, 4, 1609—1631.
2. Гринева Н. И., Карпова Г. Г. (1974) *Молекулярн. биология*, 8, 832—840.
3. Гринева Н. И., Карпова Г. Г. (1975) *Биоорганич. химия*, 1, 588—597.

4. Гринева Н. И., Карпова Г. Г., Мызина С. Д., Чемасова А. Н. (1975) Биоорган. химия, 1, 1707—1715.
5. Lawley P. D., Brookes P. (1964) Biochem. J., 92, 19 с.—20 с.
6. Lawley P. D. (1966) in Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, vol. 5, p. 89, Acad. Press, N.Y. — San Francisco — London.
7. Singer B. (1975) in Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, vol. 15, pp. 219—332, Acad. Press, N. Y. — San Francisco — London.
8. Гринева Н. И., Мызина С. Д. (1975) Молекулярн. биология, 9, 502—507.
9. Гринева Н. И., Ломакина Т. С., Мызина С. Д., Наговицына Г. К. (1974) Изв. СО АН СССР. Сер. хим. н., вып. 6, 135—140.
10. Lawley P. D., Shab S. A. (1972) Biochem. J., 128, 117—132.
11. Rhaese H., Freese E. (1969) Biochim. et biophys. acta, 190, 418—433.
12. Singer B., Fraenkel-Conrat H. (1974) Biochemistry, 13, 1913—1920.
13. Kohn K. W., Spears C. L. (1967) Biochim. et biophys. acta, 145, 734—741.
14. Беликова А. М., Гринева Н. И., Еремеева Т. П., Курбатов В. А. (1970) Молекулярн. биология, 4, 663—672.
15. Беликова А. М., Гринева Н. И., Кнорре Д. Г., Мызина С. Д. (1973) Докл. АН СССР, 212, 876—879.
16. Власов В. В., Гринева Н. И., Кнорре Д. Г. (1969) Изв. СО АН СССР. Сер. хим. н., вып. 1, 104—109.
17. Бенимetskая Л. З., Гринева Н. И., Карпова Г. Г., Пичко Н. П., Чимитова Т. А. (1977) Биоорган. химия, 3, 903—913.
18. Grineva N. I., Karпова G. G. (1973) FEBS Lett., 32, 352—355.
19. Свешников А. А. (1972) Основы теории ошибок, Изд-во ЛГУ.
20. Беликова А. М., Гринева Н. И., Карпова Г. Г. (1972) Изв. СО АН СССР. Сер. хим. н., вып. 4, 101—109.
21. Беликова А. М., Гринева Н. И., Карпова Г. Г. (1972) Химия гетероцикл. соед., 109—116.
22. Townsend L. W., Robins R. K. (1962) J. Amer. Chem. Soc., 84, 3008—3012.

Поступила в редакцию
17.III.1978

ALKYLATED BASES FORMED UNDER 5'-COMPLEMENTARY DIRECTED MODIFICATION OF DNA AND KINETICS OF THEIR ELIMINATION UPON ALKYLATION

BENIMETSKAYA L. Z., KARPOVA G. G., GRINEVA N. I.

*Novosibirsk State University and Novosibirsk Institute of Organic
Chemistry, Siberian Branch of the Academy of Sciences of the USSR,
Novosibirsk; Central Institute of Hematology and Blood Transfusion, Moscow*

The structure of alkylated bases is determined which are formed upon alkylation of denatured DNA from bovine spleen with 2',3'-O-4(N-2-chloroethyl-N-methylamino)benzylidene hexaadénylate at 20° under conditions of DNA saturation with the reagent. These are 3-RAde, 7-RGua and 7-RAde constituting about 13, 8 and 4 bases, respectively, per 10 000 nucleotides. The imidazole ring of 7-RAde is cleaved in the course of alkylation. The rate constant of 3-RAde elimination from DNA is 4-6 times higher than that of 7-RGua and of splitted 7-RAde. The rate constants of the elimination are 12-100 times lower than those for C-Cl ionization in the reagents, which is the determining step in alkylation.