

13. *The complete nucleotide sequence of the Xenopus laevis mitochondrial DNA* / B. A. Rao, D.-P. Ma, R. K. Wilson, F. Wong // J. Biol. Chem.—1985.—260, N 24.— P. 9759—9774.
14. *URF6, last unidentified reading frame of human mtDNA, codes NADH-dehydrogenase subunits* / A. Chomin, M. W. J. Cloeter, M. Ragen et al. // Science.—1986.—234, N 4776.— P. 614—618.
15. *Six unidentified reading frames of human mitochondrial DNA encode components of the respiratory-chain NADH-dehydrogenase* / A. Chomin, D. I. Ragan, A. Matsuno-Yagi et al. // Nature.—1985.—314, N 6012.— P. 592—597.
16. *Береговская Н. Н., Савиц А. В.* Возможное кодирование железо-серных белков в митохондриальном геноме млекопитающих // Биополимеры и клетка.—1988.—4, № 5.— С. 238—245.
17. *Nucleotide sequence coding for the respiratory NADH dehydrogenase of E. coli UGG initiation codon* / I. E. Yong, B. L. Roger, H. D. Campbell et al. // Eur. J. Biol. Chem.—1981.—116, N 1.— P. 165—171.

Ин-т химии поверхности АН УССР, Киев  
Ин-т биофизики МЗ СССР, Москва

Получено 24.04.89

УДК 577.113.4

**Ю. В. Пацковский, Т. П. Волощук, А. И. Потопальский**

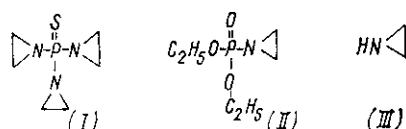
### **ОПРЕДЕЛЕНИЕ НАПРАВЛЕНИЙ АЛКИЛИРОВАНИЯ ДНК ПРОИЗВОДНЫМИ ЭТИЛЕНИМИНА И ВЫДЕЛЕНИЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ОСНОВАНИЙ**

*В работе исследовали направления алкилирования пуриновых оснований в свободном виде и в составе ДНК этиленимином (ЭИ), моноазиридиндиэтилфосфатом и тиотэфом. Методом обращенно-фазовой ВЭЖХ проведено разделение продуктов алкилирования. При сопоставлении спектров поглощения выделенных алкилированных оснований с изученными ранее установлено, что алкилирование аденина происходит в основном по N1, N3, N9, а гуанина — по N1, N7 и N9 положениям гетероцикла. Из кислотных гидролизатов алкилированной разными агентами ДНК выделены 1- и 3-алкиладенин, 6-алкиламинопурин, 1- и 7-алкилгуанин. Обсуждается зависимость физико-химических свойств такой ДНК от направлений алкилирования пуриновых оснований.*

**Введение.** ЭИ (азирин) и его производные относятся к классу электрофильных алкилирующих соединений и обладают мутагенным и канцерогенным действием [1, 2]. Полифункциональные алкилирующие агенты, такие как тиотэф, бензотэф и некоторые другие [3, 4], имеют выраженную противоопухолевую активность и применяются в клинике. Предполагается, что биологический эффект этих соединений обусловлен их взаимодействием с клеточной ДНК. Однако прямых доказательств алкилирования различных компонентов в составе ДНК к настоящему времени получено недостаточно. При этом показана возможность алкилирования тиотэфом метилированных оснований в свободном виде [5]. Установлено, что алкилирование ЭИ и тиотэфом мононуклеотидов происходит в основном по остаткам фосфорной кислоты, а из оснований в составе нуклеотидов алкилируется лишь гуанин [6]. Имеется также ряд данных об изменении физико-химических свойств ДНК в результате алкилирования [7—9]. Мы поставили задачу изучить основные направления алкилирования нуклеиновых кислот ЭИ и его производными и таким образом выяснить, какие нуклеофильные центры в ДНК ответственны за происходящие изменения. Интерес к этому обусловлен также и обнаруженным ранее противоопухолевым действием ДНК, алкилированной тиотэфом [10]. В настоящей работе представлены данные, касающиеся изучения направлений алкилирования пуриновых оснований в свободном виде и в составе ДНК.

**Материалы и методы.** Алкилирующие агенты N, N', N''-триэтиленимид тиофосфорной кислоты (тиотэф, I) и моноэтиленимид диэтилового эфира фосфорной кислоты

(МЭФ, II) синтезированы согласно [11, 12]. В работе также использован ЭИ (III); отечественного производства, очищенный перегонкой.



Препарат ДНК из тимуса теленка (НПО «Биолар», Олайне) очищен от примесей РНК и белка до содержания основного вещества не менее 98 %. Молекулярная масса ДНК, по данным электрофореза в агарозном геле, около  $10^{-6}$ , гиперхромный эффект при тепловой денатурации 33 %.

ДНК алкилировали в водном растворе (1 мг/мл) при температуре 37 °С в течение 24 ч, концентрация алкилирующего агента 20 мМ. Непрореагировавший реагент удаляли экстракцией хлороформом. Препарат алкилированной ДНК гидролизовали 0,1 М HCl при температуре 37 °С в течение 24 ч или 50 %-ным водным раствором уксусной кислоты при 100 °С в течение 8 ч. Полученный гидролизат доводили натрий-фосфатным буфером до pH 7,0 и наносили на колонку для разделения методом ВЭЖХ.

Алкилирование аденина, гуанина и дезоксигуанозина (реактивы фирмы «Reanal», ВНР) проводили следующим образом: в раствор 50 мМ препарата в воде (гуанин алкилировали в виде суспензии) вносили 100 мМ алкилирующего агента, pH смеси доводили разбавленной HClO<sub>4</sub> до значений 6,0—6,1. Смесь выдерживали 24 ч при 37 °С, после чего продукты реакции разделяли методом ВЭЖХ. Условия приведены в [13].

**Результаты и обсуждение.** Ранее установлено, что определяющее влияние на изменение УФ-спектров поглощения компонентов нуклеиновых кислот при их модификации оказывает направление алкилирования [14]. Природа алкильного радикала при этом существенного значения не имеет, и отклонения в спектральных данных для продуктов алкилирования не превышают 1—3 нм (табл. 1). Это послужило для нас основанием провести идентификацию выделенных продуктов, сравнивая их спектральные характеристики с соответствующими данными описанных ранее алкилированных компонентов нуклеиновых кислот [14].

Изучение УФ-спектров соединений, полученных в результате алкилирования аденина реагентами I или II и последующего разделения методом обращенно-фазовой ВЭЖХ, показало, что продукты модификации являются N1-, N3- и N9-производными (рис. 1, табл. 1). При хроматографии продуктов алкилирования была отмечена определенная закономерность.

В каждой группе модифицированных аденинов наибольшая хроматографическая подвижность наблюдалась для N1-производных, вследствие чего с колонки первыми элюировались основания с заместителем в N1-положении, затем N3- и N9-изомеры и последними — N6-замещен-

Таблица 1

Спектральные характеристики продуктов алкилирования аденина ЭИ, диэтилсульфатом (ДЭС) с окисью этилена (ОЭ) \*  
Spectral characteristics of the products of adenine alkylation with ethyleneimine (EI), diethylsulfate (DES) and ethylene oxide (EO) \*

Направление алкилирования	Алкилирующий агент	pH	Длина волны поглощения, нм	
			$\lambda_{\text{max}}$	$\lambda_{\text{min}}$
N1	ДЭС	1	260	233
		12	271	242
	ЭИ	1	263	235
		12	272	246
N3	ДЭС	1	274	240
		12	273	247
	ЭИ	1	276	233
		12	274	245
N9	ДЭС	1	258	230
		12	262	228
	ЭИ	1	259	228
		12	263	234
N6	ОЭ	1	272	233
		12	273	236
	ЭИ	1	272	233
		12	273	244
Аденин	1	262,5	229	
	12	269,5	237	

\* Данные взяты из работы [13].

ные пурины. Структура алкильного радикала существенно сказывается на гидрофобных свойствах алкилированных аденинов, изменяя в широком диапазоне их коэффициенты удерживания, что дало возможность разделить многокомпонентные смеси алкилированных продуктов.

Производные аденина, алкилированные МЭФ и тиотэфом, оказались нестабильными и претерпевали изменения как в процессе алкилирования, так и последующего анализа. Длительное алкилирование или

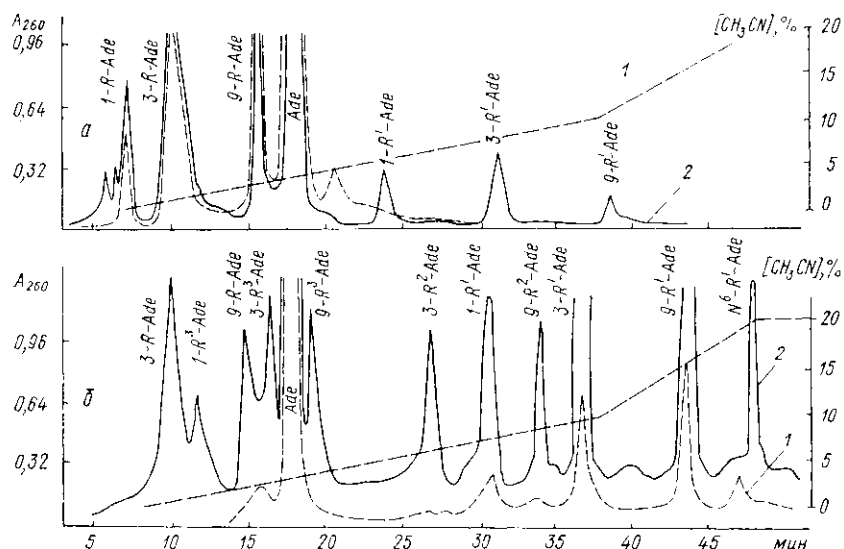


Рис. 1. Хроматографическое разделение продуктов алкилирования аденина: а — полученных в результате обработки МЭФ (1) и ЭИ (2); б — полученных при взаимодействии с тиотэфом в течение 24 ч при 37°C (1) и 8 ч при 100°C (2). R — аминоэтильный радикал; R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> и R<sup>3</sup> — предположительно радикалы, образующиеся в результате последовательного расщепления одной, двух или трех фосфамидных связей соответственно

Fig. 1. Separation of the products of adenine alkylation with ethyleneimine derivatives; а — alkylation with monoaziridinediethylphosphate (1) and ethyleneimine (2), б — alkylation with ThioTEPA at 37°C for 24 h (1) and at 100°C for 8 h (2)

обработка щелочью (0,1 М КОН, 100°C, 30 мин) приводили к появлению в составе реакционной смеси нескольких спектральных «аналогов» алкилзамещенных аденинов, отличающихся по времени удерживания на колонке. Например, при алкилировании МЭФ мы обнаружили по два продукта замещения в положениях 1, 3 и 9, а при алкилировании тиотэфом — по два продукта в положении 1 и по четыре — в положениях 3 и 9 (продукты с радикалами R, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> и R<sup>3</sup>, рис. 1).

Ранее было показано, что одной из причин разрушения тиотэфа в водной среде является гидролиз фосфамидных связей [15], вследствие чего продукты алкилирования содержат аминоэтильный радикал [5]. Очевидна корреляция обнаруженного нами факта образования различного количества «аналогов» с числом фосфамидных связей в молекулах алкилирующих агентов — у ЭИ их нет, у МЭФ — одна, у тиотэфа — три. В связи с этим конечными продуктами превращений алкилпроизводных аденина могут быть соответствующие аминоэтилпроизводные. Действительно, в экспериментах по алкилированию МЭФ и тиотэфом обнаруживаются продукты с присутствием аминоэтиладенина хроматографическими и спектральными характеристиками. Аминоэтильный радикал в составе оснований и нуклеозидов является достаточно стабильным, что было обнаружено ранее на примере взаимодействия ЭИ с гуанозином и дезоксигуанозином [16].

Закономерности алкилирования и хроматографического поведения алкилпроизводных аденина и гуанина оказались во многом сходными,

поэтому ниже мы отметим лишь некоторые особенности, касающиеся направлений алкилирования гуанина и дезоксигуанозина. В молекуле гуанина основным центром алкилирования производными ЭИ также является атом азота в положении 9 гетероцикла. Кроме того, в смеси обнаружены спектральные аналоги 1- и 7-алкилпроизводных гуанина

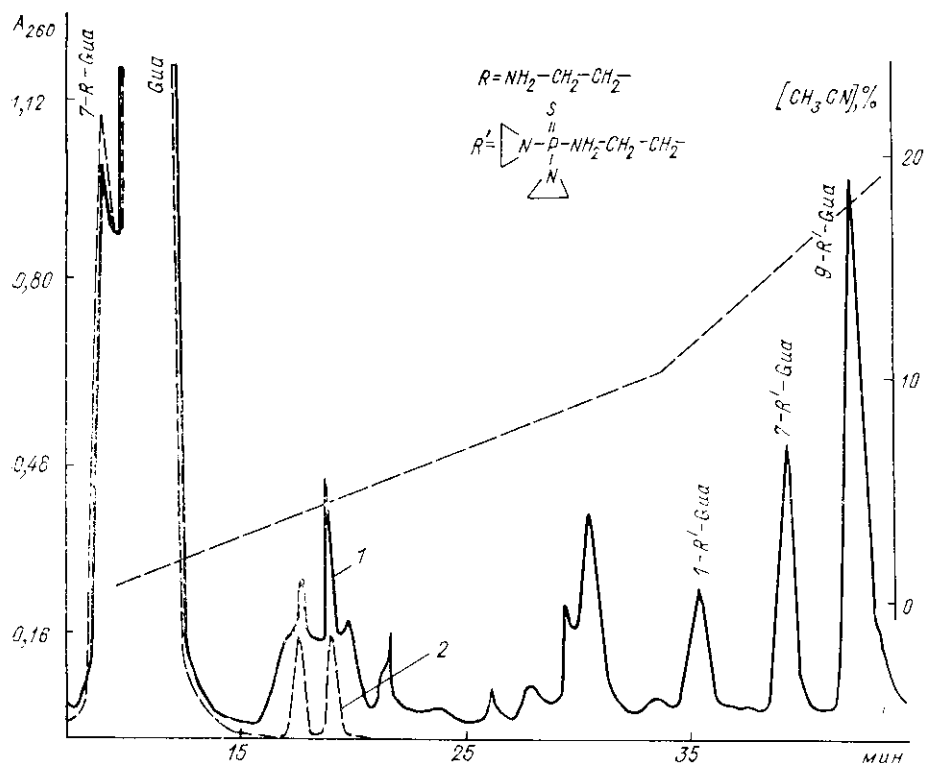


Рис. 2. Хроматографическое разделение продуктов алкилирования гуанина тиотэфом (1) и ЭИ (2)

Fig. 2. Separation of the products of guanine alkylation with ThioTEPA (1) and ethylethimine (2)

(табл. 2, рис. 2). Отличие в алкилировании аденина, гуанина и соответствующих им нуклеозидов касалось, как и в случае применения других электрофильных алкилирующих агентов [14], реакционной способности атома азота в положении 7. Алкилирование дезоксигуанозина приводило к появлению больших количеств 7-алкилгуанина, образующегося в результате реакции гидролиза гликозидной связи нуклеозида, протекающей, как было показано [17], уже в физиологических условиях. Такое направление алкилирования дезокси-нуклеозида подтверждается и лабильностью продукта алкилирования в щелочных средах [18]. В этих условиях 7-алкилзамещенные пуриновые нуклеозиды и 7,9-диалкилпроизводные пуриновых оснований претерпевают расщепление имидазольного кольца [14]. При кислотном гидролизе продуктов алкилирования дезоксигуанозина обнаружен продукт, по спектрам аналогичный 1-алкилгуанину (табл. 2).

Изученные характеристики алкилированных пуриновых оснований мы использовали в дальнейшем для анализа препаратов алкилированной ДНК. Так, фракция модифицированных оснований, выделенная из реакционной смеси в свободном объеме ДЭАЭ-колонки, методом обратноразнофазовой ВЭЖХ разделена на два основных продукта, идентифицированных как 7-алкилгуанин и 3-алкиладенин. Это согласуется с обнаруженным ранее фактом спонтанной апуринизации ДНК, подверг-

шейся воздействию различных алкилирующих агентов [14]. 7-Алкилгуанин и 3-алкиладенин оказались основными составляющими кислотных гидролизатов алкилированной ДНК (рис. 3). В данном случае подтвердилась та же закономерность хроматографического поведения алкилированных оснований, которая была описана выше для производ-

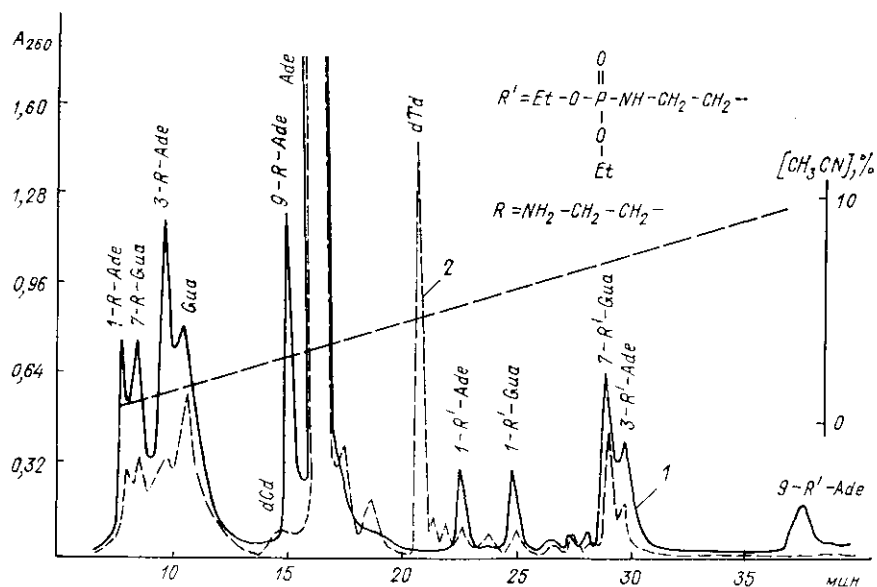


Рис. 3. Разделение методом обращенно-фазовой ВЭЖХ смеси алкилированных пуриновых оснований (1) и кислотного гидролизата ДНК, алкилированного МЭФ (2)  
Fig. 3. HPLC separation of the mixture of alkylated purine bases (1) and of acidic hydrolyzate of the DNA alkylated with monoaziridinediethylphosphate (2)

ных аденина. Вероятно, в процессе кислотного гидролиза алкильные радикалы, образованные МЭФ и тиотэфом, превращаются в аминоэтильные группы, чем и объясняется сходство хроматографических

Таблица 2

Спектральные характеристики продуктов алкилирования гуанина ЭИ и ДЭС \*  
Spectral characteristics of the products of guanine alkylation with ethyleneimine (EI) and diethylsulfate (DES) \*

Направление алкилирования	Алкилирующий агент	pH	Длина волны поглощения, нм	
			$\lambda_{\max}$	$\lambda_{\min}$
N1	ДЭС	1	251 (274)	229
		12	278 (260)	243
	ЭИ	1	253 (272)	233
N7	ДЭС	1	277 (261)	246
		12	249 (274)	233
	ЭИ	1	252 (272)	232
N9	ДЭС	1	283	257
		12	252, 277	230
		1	253, 268	238
		12	254, 278	234
N7, с расщепленным имидазольным циклом	ДЭС	1	254, 269	243
		12	262	221
	ЭИ	1	261	243
Гуанин		1	262	
		12	260	
		1	248,5; 277,5	267
		12	246; 273,5	255

\* Данные взяты из работы [13].

профилей разделения гидролизатов ДНК, алкилированной разными агентами, обнаруженное в экспериментах. Кроме указанных выше 7-алкиладенина (преобладающего в количественном отношении) и 3-алкиладенина, были найдены аналоги 1-алкиладенина и 6-алкиламинопурина. Последний, скорее всего, образуется из 1-замещенных аденинов в результате перегруппировки Димрота, протекающей в щелочных, а иногда и в нейтральных средах [17]. Перегруппировка особенно характерна для 1-аминоэтилпроизводных аденина [18] и не исключено (ввиду их основного характера), что в нашем случае она происходит в более мягких условиях, чем, например, для метил- или этилпроизводных аденина. В качестве минорного продукта из алкилированной ДНК выделен 1-алкилзамещенный гуанин.

Спонтанная апуринизация ДНК при алкилировании может быть основной причиной фрагментации молекул, поскольку фосфодиэфирная связь в апуриновом участке неустойчива и быстро гидролизуеться [17]. Длительное алкилирование обычно приводит к денатурации ДНК [8]. Косвенным доказательством денатурации и ее следствием является алкилирование остатка аденина по N1 положению гетероцикла, которое в составе двухспиральной ДНК участвует в образовании водородной связи и недоступно для алкилирования.

Исходя из вышесказанного, уменьшение плотности отрицательного заряда в молекуле ДНК, сопутствующее ее денатурации и фрагментации, может быть обусловлено (помимо алкилирования концевых фосфатных групп, количество которых увеличивается в ходе реакции) образованием продуктов аминэтирования. Благодаря способности первичных и вторичных аминогрупп алкильных радикалов протонироваться в нейтральных средах ряд модифицированных оснований несет на себе частичный положительный заряд. С этим связывается возможность образования внутренних четвертичных солей между пространственно сближенными фосфатными группами ДНК и ее алкилированными основаниями [2].

Таким образом, нами установлено, что при 24-часовом алкилировании в мягких условиях (37 °С, водная среда) производными ЭИ в составе ДНК в значительной степени алкилируются не только остатки гуанина [6], но и аденина, а учитывая высокую степень фрагментации модифицированной ДНК, можно предполагать и высокий уровень алкилирования концевых фосфатов, аналогично алкилированию фосфатных групп в нуклеотидах.

Направления модификации ДНК и ее компонентов ЭИ и его производными практически не отличаются от направлений алкилирования другими электрофильными агентами. Различие в характере алкильных радикалов, образующихся в процессе реакции, сказывается, как правило, в разнообразии продуктов модификации и их поведении при хроматографии по сравнению с продуктами алкилирования другими химическими агентами, в особенности, монофункциональными.

#### DETECTION OF DIRECTIONS OF DNA ALKYLATION WITH ETHYLENEIMINE DERIVATIVES AND ISOLATION OF MODIFIED BASES

*Yu. V. Patkovsky, T. P. Voloshchuk, A. I. Potopalsky*

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

#### Summary

Alkylation of purine bases with ethyleneimine, monoaziridinediethylphosphate and thiophosphoamide leads to formation of 1-, 3- and 9-alkyl derivatives of adenine, 6-alkylaminopurine and 1-, 7- and 9-alkyl derivatives of guanine. 1- and 7-alkylguanine, 1- and 3-alkyladenine, 6-alkylaminopurine were obtained from the acidic hydrolysates of alkylated DNA. Dependence of the physicochemical properties of alkylated DNA on the direction of purine bases alkylation is discussed.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лавлес А. Генетические эффекты алкилирующих соединений.— М.: Наука, 1970.— 255 с.
2. Росс У. Биологические алкилирующие вещества.— М.: Медицина, 1964.— 260 с.
3. Гиллер С. А., Лидак М. Ю., Лукевиц Э. Я. Химия противоопухолевых веществ // Химиотерапия злокачеств. опухолей.— М.: Медицина, 1977.— С. 10—60.
4. Противоопухолевый препарат БЕНЗОТЭФ // Под ред. П. В. Родионова.— Киев: Высш. школа, 1973.— 174 с.
5. Масс-спектрокопическое исследование взаимодействия тиофосфамида с основаниями нуклеиновых кислот / Л. Ф. Суходуб, В. С. Шелковский, М. В. Косевич и др. // Докл. АН СССР.— 1985.— 283, № 3.— С. 714—716.
6. Структура продуктов модификации нуклеотидов и ДНК этиленмином и тиотэфом / А. М. Серебряный, Г. В. Андриевский, А. Р. Беккер и др. // Биорг. химия.— 1987. 13, № 6.— С. 757—764.
7. Взаимодействие ДНК с противоопухолевым препаратом тиофосфамидом / Т. Л. Пятигорская, О. Ю. Жилкова, Л. М. Муравьева, Л. Ф. Суходуб // Там же.— 1986.— 20, № 2.— С. 2423—2429.
8. Степень алкилирования и физико-химические свойства модифицированных тиофосфамидом ДНК / Ю. В. Пацковский, В. Т. Соловьян, А. И. Потопальский, З. Ю. Ткачук // Молекуляр. биология.— 1984.— Вып. 37.— С. 44—50.
9. Алкилирование ДНК: физико-химические свойства ДНК, модифицированных тиофосфамидом и моноэтиленмином диэтилового эфира фосфорной кислоты / Ю. В. Пацковский, Т. П. Волощук, А. И. Потопальский, З. Ю. Ткачук // Макромолекулы клеток и вирусов.— Киев: Наук. думка, 1986.— С. 40—47.
10. Структурно-функциональные особенности модифицированных нуклеиновых кислот / А. Д. Швед, А. П. Соломко, А. И. Потопальский и др. // Молекуляр. биология.— 1980.— Вып. 26.— С. 64—78.
11. Лидак М. Ю., Гиллер С. А., Медне А. Я. К синтезу ТиоТЭФА // ТиоТЭФА.— Рига: Изд-во АИ ЛатвССР, 1961.— С. 5—8.
12. Гречкин П. П. Фосфорорганические производные этиленмина. Сообщ. 1. Взаимодействие этиленмина с хлорангидами диалкилфосфорных кислот // Изв. АН СССР.— 1956.— № 5.— С. 538—543.
13. Пацковский Ю. В., Волощук Т. П., Потопальский А. И. Некоторые особенности реакции полинуклеотидов с тиофосфамидом // Биополимеры и клетка.— 1989.— 5, № 5.— С. 64—70.
14. Singer B. The chemical effect of nucleic acid alkylation and their relation to mutagenesis and carcinogenesis // Progr. Nucl. Acid Res. and Mol. Biol.— 1975.— 15.— Р. 219—280.
15. Изучение стабильности тиофосфамида в водных и водно-солевых растворах / Т. Л. Пятигорская, О. Ю. Жилкова, Н. М. Архангелова и др. // Хим.-фарм. журн.— 1984.— № 2.— С. 343—349.
16. Hemminki K., Ludlum D. V. Covalent modification of DNA by neoplastic agents // J. Nat. Cancer Inst.— 1984.— 73, N 5.— Р. 1021—1028.
17. Органическая химия нуклеиновых кислот / Н. К. Кочетков, Э. И. Будовский, Е. Д. Свердлов и др. М.: Химия, 1970.— 720 с.
18. Relative reactivities for monofunctional nitrogen mustard alkylation of nucleic acid components / С. С. Price, G. M. Gaucher, P. Koneru et al. // Biochim. et biophys. acta.— 1968.— 166, N 2.— Р. 327—359.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики  
АН УССР, Киев

Получено 02.02.87

УДК 577.112.5:578.841

**Т. Л. Левитина, Н. В. Роднин, Н. М. Гусак,  
С. А. Атепалихина, Э. А. Козлов**

### **ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ТРИПТИЧЕСКИХ И ХИМОТРИПТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ ГРАНУЛИНА ВИРУСА ГРАНУЛЕЗА ОЗИМОЙ СОВКИ, AGROTIS SEGETUM**

Методом высоковольтного электрофореза и хроматографии на бумаге из фракций триптического и химотриптического гидролизатов гранулина, полученных ранее гелефильтрацией и ионообменной хроматографией, выделены дополнительно 81 химотриптический и 20 триптических пептидов. Установлено их частичное или полное строение.