

Н. И. ГРИНЕВА, член-корреспондент АН СССР Д. Г. КНОРРЕ,
В. А. КУРБАТОВ

ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЕ АЛКИЛИРОВАНИЕ ТРАНСПОРТНОЙ РНК 4-(N-2-ХЛОРЭТИЛ-N-МЕТИЛАМИНО)-БЕНЗИЛАМИНОМ

Существенной особенностью алкилирования тРНК и полинуклеотидов 2-хлорэтиламинами в растворах с низким содержанием солей является электростатическое взаимодействие молекул полиэлектролитов с алкилирующими этилениммониевыми катионами (¹). Это взаимодействие приводит к аномально высоким значениям относительных констант скоростей алкилирования тРНК, которые могут при достаточном разбавлении полиэлектролита превосходить соответствующие величины для алкилирования гетероциклических оснований в нуклеозидах по крайней мере на 2—3 порядка. Однако при концентрациях солей, обычно применяемых в опытах по модификации нуклеиновых кислот (около 0,1 М), электростатические взаимодействия резко ослабевают и эффективность алкилирования резко снижается, поскольку алкилирующие катионы расходятся в основном на гидролиз и реакцию с анионами буферных растворов. Можно ожидать, что промежуточная частица, несущая суммарный заряд 2+, будет более эффективно связываться с полианионом при значительной ионной силе и тем самым более эффективно алкилировать полинуклеотид.

В настоящей работе исследована эффективность алкилирования тРНК 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)-бензиламином *. рК аминогруппы в боковой цепи этого соединения около 10 (²), и промежуточный катион при алкилировании в нейтральной среде имеет заряд +2.

Константа k_0 скорости лимитирующей стадии — образования R^{2+} — определена argentометрически в $1 \cdot 10^{-3}$ М растворе RCl^+ при 40°, pH 7 в присутствии 0,1 М CH_3COONa и равна $(0,68 \pm 0,03) \cdot 10^{-2}$ мин⁻¹. Она, по существу, совпадает с соответствующими величинами для ранее исследованных ацеталей 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)-бензальдегида, что понятно, поскольку рК третичных аминогрупп этих соединений одинаковы (^{2, 3}). Для оценки относительной реакционной способности низкомолекулярного нуклеофила по отношению к промежуточным частицам, имеющим разный электрический заряд, но одинаковое, по-видимому, строение реакционного центра, мы используем реакцию со «стандартным» нуклеофилом — ионом ацетата. Концентрация продукта алкилирования ацетата — 4-(N-2-ацетоксиэтил-N-метиламино)-бензиламина — определяется при помощи гидроксамовой реакции, принимая значение эквивалентного коэффициента экстинкции при 495 мμ 730 см²/ммоль по аналогии с (⁴). Отношение констант скоростей реакций катиона R^{2+} с ионом ацетата (k_{Ac}) и водой (a) вычисляется по формуле

$$\frac{k_{Ac}}{a} = \frac{[CH_3COOR^+]}{[RCl^+]_0 (1 - e^{-k_0 t}) - [CH_3COOR^+]} \frac{1}{[CH_3COONa]},$$

где $[RCl^+]$ — начальная концентрация RCl^+ , $[CH_3COONa]_0$ — начальная концентрация ацетата натрия, $[CH_3COOR^+]$ — текущая концентрация продукта, $[RCl^+]_0 \ll [CH_3COONa]_0$.

При концентрациях RCl^+ $2 \cdot 10^{-3}$ М и ацетата 0,1 и 0,25 М эта величина равна $8,7 \pm 0,8$ л/моль и $7,5 \pm 0,6$ л/моль соответственно, т. е. по существу совпадает с найденными ранее для промежуточных частиц с зарядами +1

* Далее сокращенно — RCl^+ .

и 0*. Эта величина типична для для всех исследованных 2-хлорэтиламинов (см. ссылки в (1)). Изучаемые нами хлорэтиламины имеют одинаковые константы скоростей лимитирующей стадии, а промежуточные частицы имеют одинаковые относительные константы скоростей в реакциях со стандартным нуклеофилом.

Соотношения k/a для наиболее реакционноспособных компонент нуклеиновых кислот — остатков гетероциклических оснований — в реакциях

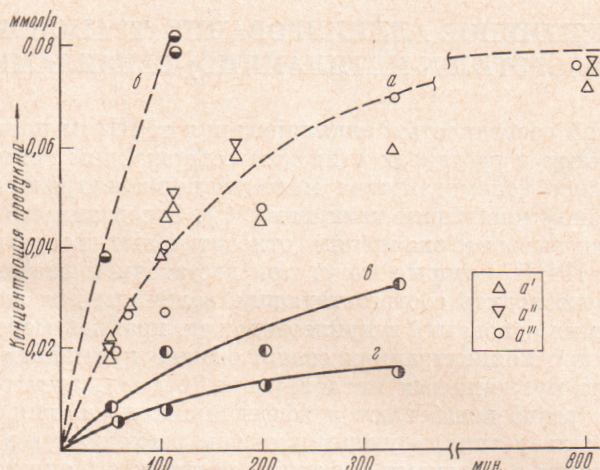


Рис. 1. Кинетические кривые накопления остатков R^+ в тРНК при алкилировании (pH 7; 40°)

Кривая	Концентрация, мол/л				
	(нуклеотид РНК) $\times 10^3$	реагент $\times 10^3$	NaClO_4	CH_3COONa	$\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$
a'	1,6	0,08	0,1		
a''	3,2	0,08	0,1		
a'''	1,6	0,08		0,1	
$б$	1,6	0,16	0,1		
$в$	1,6	0,08	0,5		
$г$	1,6	0,08	0,1		0,015

a — $б$ — кинетические кривые образования R^{2+} , рассчитанные с использованием константы скорости отщепления Cl^- $0,68 \cdot 10^{-2} \text{ мин}^{-1}$

с хлорэтиламинами в нейтральной среде тоже известны и по порядку величины не превышают 10 л/моль (1, 4).

Алкилирование тРНК, очищенной от хлоридов 3-кратным переосаждением этанолом из 1 M NaClO_4 , проведено с использованием C^{14} — RCl^+ , синтезированного из C^{14} -4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)-бензальдегида (5). Удельная радиоактивность препарата 2000 имп/сек·μмоль. Алкилированную тРНК выделяли 4-кратным переосаждением спиртом в присутствии 0,01 M ЭДТА, 1 M CH_3COONa . Концентрации тРНК и RCl^+ подобраны так, чтобы при максимальной глубине модификации было нейтрализовано не более 10% анионных зарядов тРНК.

Как видно из рис. 1а, при алкилировании тРНК в 0,1 M NaClO_4 или CH_3COONa кинетические кривые образования R^{2+} и накопления алкилированных нуклеотидов тРНК практически совпадают. Поскольку реагент почти количественно расходуется на тРНК даже в присутствии нуклео-

* Электронейтральные промежуточные частицы образуются при отщеплении Cl^- в хлорэтиламинах, содержащих метилфосфатные группы (1).

фильного ацетата, соотношение $k_{\text{РНК}}/a$ не может быть удовлетворительно определено в этих условиях. Допуская, что расход реагента на тРНК составляет не менее 95% расхода в лимитирующей стадии, определяем нижний предел этой величины — 12 000 л/моль (в расчете на все нуклеотиды тРНК). Высокая эффективность алкилирования тРНК сохраняется при изменении концентрации RCl^+ , во всяком случае пока $[\text{RCl}]_0 \ll [\text{тРНК}]_0$ (рис. 1а, б). Лишь при очень высокой концентрации NaClO_4 или в присутствии ионов Mg^{2+} заметная доля реагента приходится на гидролиз (рис. 1в, г). Округленные значения $k_{\text{РНК}}/a$ в этих условиях составляют 400 и 200 л/моль соответственно. Эти величины все еще превышают на полтора порядка типичное для гетероциклических оснований значение k/a . При алкилировании без добавок солей практически качественное включение реагента наблюдается в интервале концентрации тРНК 2—40 мМ нуклеотидов.

Таким образом, 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)-бензиламин оказывается весьма эффективным модификатором, количественно расходующимся на тРНК. По сравнению с 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)-бензальдегидом (⁶), расход которого на алкилирование 2 мМ тРНК в 0,1 М ацетате не превышает 5%, он значительно более эффективно алкилирует тРНК в солевых растворах, в связи с чем может использоваться при низких концентрациях (порядка 10^{-4} М) и не требует применения смешанных водно-органических растворителей. Дополнительным преимуществом его по сравнению с водорастворимым реагентом 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)-бензилиден-уридин-5'-метилфосфатом (⁵) является отсутствие в нем кислотно-лабильной ацетальной связи, что расширяет диапазон pH, при которых можно исследовать алкилирование. Возможность проводить алкилирование при $\text{pH} < 6$ может оказаться существенной для модификации аминокислот-тРНК, содержащей лабильную при более высоких pH сложноэфирную связь. В терминах чисто электростатического связывания противоионов в ионной атмосфере полииона увеличение $k_{\text{РНК}}/a$ означает повышение локальной концентрации алкилирующих катионов в объеме, занятом полиэлектролитом. Распределение концентрации заряженных частиц в полиэлектролитных системах с различным содержанием солей исследовано по влиянию полииона на константу скорости реакции, протекающей в «свободном» объеме. В работе (⁷) оценены константы скорости реакции щелочного гидролиза сложноэфирной связи в катионе фенилового эфира триметилглицина (X^+) и дифенилового эфира N,N,N',N'-тетраметилэтилендиаминдиуксусной кислоты (X^{2+}) в отсутствие (k^0) и в присутствии (k) полиметакриловой и других поликислот. В соответствии с данными настоящей и предыдущей (¹) работ, соотношение k^0/k для X^+ понижается до 1,0 уже в 0,1 М соли, в то время как для X^{2+} эта величина равна 1,09 даже в 0,32 М соли. Это указывает на сохранение градиента концентрации X^{2+} в системе при различной ионной силе, хотя эффект незначителен. Анализ результатов (⁷) показывает, что в рабочих концентрациях поликислот (0,01 М) и инертной соли ($10^{-2} \div 10^{-4}$ М) соотношение «занятого полиэлектролитом» и «свободного» объемов системы $\phi / (1 - \phi) = 0,01 \div 0,1$. Тем самым слабому уменьшению концентрации катионов в «свободном» объеме должно соответствовать значительное увеличение локальной концентрации X^+ и X^{2+} вблизи полииона.

Новосибирский институт органической химии
Сибирского отделения Академии наук СССР

Поступило
7 VI 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Н. И. Гринева, В. Ф. Зарытова и др., ДАН, 194, 331 (1970). ² В. С. Богачев, А. Г. Веняминова, Н. И. Гринева, Изв. СО АН СССР, сер. хим. наук, № 14, в. 6, 110 (1970). ³ Н. И. Гринева, В. Ф. Зарытова, Д. Г. Кнорре, ЖОХ, 40, 215 (1970). ⁴ С. С. Price et al., Biochim. et biophys. acta, 166, 327 (1968). ⁵ А. М. Беликова и др., Мол. биол., 4, 30 (1970). ⁶ А. М. Беликова и др., Мол. биол., 3, 210 (1969). ⁷ Н. Morawetz, J. A. Shafer, J. Phys. Chem., 67, 1293 (1963).