Доклады Академии наук СССР
1970. Том 195, № 3

УДК 575

ГЕНЕТИКА

А. Е. БЕДНЯК

К МЕХАНИЗМУ ДЕЙСТВИЯ ХИМИЧЕСКИХ МУТАГЕНОВ ГРУППЫ N-НИТРОЗО-N-АЛКИЛМОЧЕВИН

(Представлено академиком Н. П. Дубининым 4 VI 1970)

Открытие И. А. Рапопортом в 1962 г. сверхмутагенного эффекта у N-нитрозо-N-алкилмочевин ([1], [2]) выдвинуло задачу выяснения химического механизма действия этой группы соединений. Результаты первых наших опытов по исследованию взаимодействия нитрозоалкилмочевин с компонентами нуклеиновых кислот (свободные основания, нуклеозиды и нуклеотиды) ([3], [4]) позволили предположить алкилирующий характер действия этих мутагенов на молекулу ДНК. В дальнейшем удалось экспериментально доказать метилирование ДНК N-нитрозо-N-метилмочевиной (НММ) как в нейтральной, так и слабокислой средах. При этом было установлено, что одним из продуктов метилирования молекулы ДНК является 7-метилгуанин ([5]).

В настоящем сообщении мы приводим новые экспериментальные данные* о метилировании пуриновой части ДНК при действии НММ в нейтральной среде. В опытах использовали два образца ДНК — торговый препарат из крови цыпленка фирмы Reanal (Венгрия) ($\varepsilon(P)_{260} > 7000$; соотношение N / P 1,6; содержание белка 1%) и ДНК, выделенную нами из фага Т-4В по методу Гирера — Шрамма — Георгиева. НММ синтезировали исходя из мочевины и метиламина ([6]). Кроме обычной НММ использовали НММ-C^{14}, меченную по метильной группе. Раствор ДНК в смеси 0,05 *M* фосфатного буфера ($KH_2PO_4 + NaOH$) pH 7 и 0,05 *M* NaCl (объем раствора 10 мл, концентрация ДНК 1 мг/мл) обрабатывали НММ (концентрация 10 мг/мл) до полного растворения мутагена. При получении радиоавтограмм, кроме обычной НММ (9 мг/мл), одновременно добавляли меченую НММ (1 мг/мл). Реакционные смеси выдерживали в термостате при 37° в течение 48 час. Далее ДНК осаждали равным объемом спирта, отделяли и растворяли в 0,1 *M* NaCl до концентрации 2 мг/мл ([7]) — рабочий раствор ДНК. Маточный раствор после центрифугирования исследовали отдельно.

Исследование маточного раствора. Опыт 1. В задачу входило выяснение наличия низкомолекулярных соединений (главным образом алкилированных оснований), образующихся вследствие частичной деградации молекул ДНК, алкилированной НММ. Для разделения предполагаемых алкилированных оснований применили двумерное хроматографирование на хроматографической бумаге (Ленинградская С). Сконцентрированный маточный раствор (из 5 мг ДНК) наносили на бумагу и хроматографировали последовательно в системах *н*-бутанол — вода, 86 : 14 (система 1) и метанол — соляная кислота — вода, 7 : 2 : 1 (система 2). Хроматограммы проявляли как в у.-ф. свете (ультрахемископ), так и на рентгеновской пленке РТ-2 при экспозиции 20 суток. Часть аналогичных хроматограмм, приготовленных на специально очищенной бумаге, использовали для идентификации соответствующих продуктов по у.-ф. спектрам поглощения (методики описаны в ([4], [8])).

Из сравнения одних и тех же хроматограмм, проявленных в у.-ф. свете и на рентгеновской пленке (рис. 1*а*), выяснено, что продукты I — III об-

* Экспериментальная часть работы выполнена нами в отделе химического мутагенеза Института химической физики АН СССР.

наруживаются в у.-ф. свете и являются радиоактивными. Следовательно, они могут быть метилированными основаниями. Радиоактивный продукт IV в у.-ф. свете не наблюдается (выяснение его природы мы здесь не приводим). Продукт I идентифицирован как 7-метилгуанин сравнением с синтетически полученным 7-метилгуанином по хроматографическим свойствам (системы 1 и 2, способ «свидетелей») и спектрам поглощения (рис. 2) ([9]).

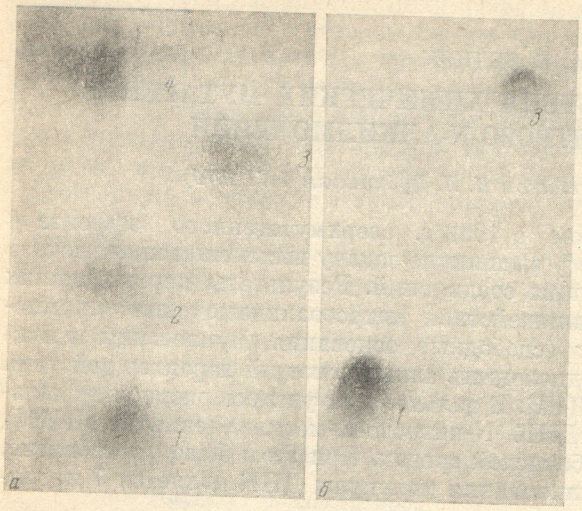

Рис. 1. Радиоавтограммы двумерных хроматограмм. *а* — маточный раствор после осаждения ДНК спиртом из реакционной смеси (ДНК из фага Т-4В): продукт *I* — 7-метилгуанин, *II* — 7-метиладенин, *III* — 3-метиладенин, *IV* — не идентифицирован; *б* — гидролизат ДНК (из фага Т-4В): продукт *I* — 7-метилгуанин, *III* — 3-метиладенин

Спектры поглощения продуктов II и III оказались очень близкими: продукт II λ_{max} 270—272 мμ в 0,1 *N* HCl и 270—271 мμ в 0,1 *N* KOH; продукт III λ_{max} 273—275 мμ в 0,1 *N* HCl и 272—274 мμ в 0,1 *N* KOH. После бромирования, проведенного как указано в ([8]), характер спектров продуктов II и III не изменяется, что может указывать на их адениновую природу.

Концентрированные элюаты продуктов II и III обработали нитритом натрия в кислой среде и реакционные смеси подвергали хроматографированию в системах 1 и 2. Спектры поглощения элюатов из дезаминированных продуктов II (λ_{max} в 0,1 *N* HCl и 0,1 *N* KOH 250 и 260—262 мμ соответственно) и III (λ_{max} 253—255 и 265 мμ соответственно) оказались характерными для гипоксантинов и соответствуют спектрам 7- и 3-метилгипоксантина ([10]).

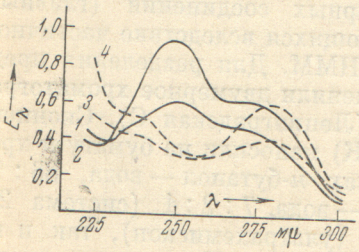

Рис. 2

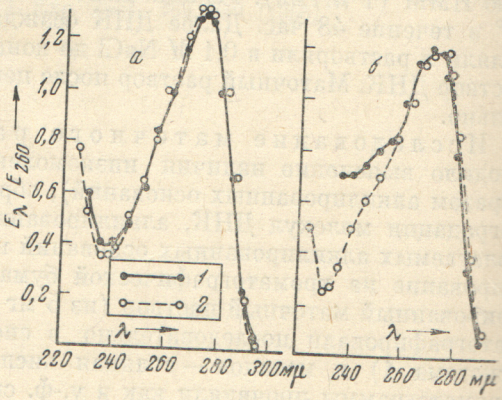

Рис. 3

Рис. 2. У.-ф. спектры поглощения продукта I и 7-метилгуанина. *1* — продукт I и *2* — 7-метилгуанин в 0,1 *N* HCl, *3* — продукт II и *4* — 7-метилгуанин в 0,1 *N* KOH

Рис. 3. У.-ф. спектры поглощения продукта II и 7-метиладенина в 0,1 *N* HCl (*а*) и 0,1 *N* KOH (*б*). *1* — продукт II, *2* — 7-метиладенин

Окончательная идентификация продуктов II и III как 7- и 3-метиладенина проведена сравнением с синтетически полученными 7- и 3-метиладенином по хроматографическим свойствам (системы 1 и 2, способ «свидетелей») и спектрам поглощения — рис. 3 и 4 ([10–12]). Молярные соотношения 7-ме-

тилгуанина, 3-метиладенина и 7-метиладенина в маточных растворах ДНК оказались следующими. Препарат ДНК из крови цыпленка 8,5 : 3,2 : 1; ДНК из фага Т-4В 3,5 : 3,1 (использовали расчетные коэффициенты для гуанина и аденина) ([13]). Логично заключить, что образование метилированных пуринов в маточном растворе происходит вследствие депуринизации молекулы ДНК, метилированной НММ. Это находит прямое подтверждение в последующих опытах.

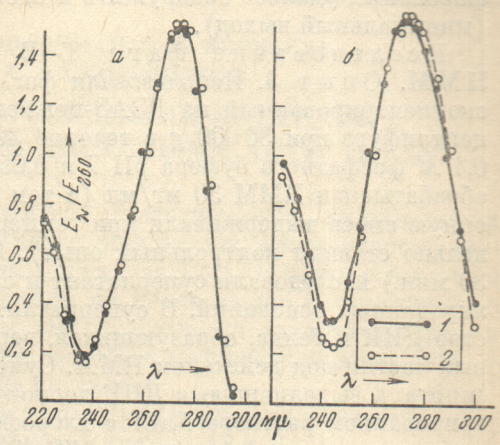

Рис. 4. У.-ф. спектры поглощения продукта III и 3-метиладенина в 0,1 *N* HCl (*а*) и 0,1 *N* KOH (*б*). *1* — продукт III, *2* — 3-метиладенин

Исследование ДНК после обработки НММ. Опыт 2. Часть рабочего раствора ДНК подкисляли 2 *N* HCl до получения 0,1 *N* HCl и выдерживали в термостате при 37° в течение суток — гидролиз ДНК до пуриновых оснований. Гидролизат (1—1,5 мг ДНК) наносили на хроматографическую бумагу и подвергали двумерному хроматографированию как в опыте 1 (при хроматографировании в системе 1 апуриновая кислота оставалась на старте и затем удалялась вырезанием соответствующего фрагмента хроматограммы). Радиоавтограммы (рис. 1*б*) указывают на содержание в гидролизате радиоактивных продуктов I и III. По хроматографическим свойствам и характеру поглощения эти продукты оказались идентичными продуктам I и III из хроматограмм маточного раствора (см. рис. 1*а*), т. е. являются 7-метилгуанином и 3-метиладенином соответственно.

Опыт 3. Вторую часть рабочего раствора ДНК (~ 5 мг ДНК) выдерживали в термостате при 37° в течение 4 суток в присутствии хлороформа — депуринизация алкилированной ДНК в нейтральной среде. По истечении этого времени ДНК осаждали спиртом, отделяли и подвергали гидролизу. Гидролизат хроматографировали, как в опытах 1 и 2. Хроматограммы гидролизатов содержали только один радиоактивный продукт — 7-метилгуанин. Маточный раствор исследовали, как в опыте 1. Хроматограммы этого маточного раствора содержали два радиоактивных продукта, которые оказались 7-метилгуанином и 3-метиладенином (идентификацию проводили, как в опыте 1). Молярные отношения 3-метиладенина (3 МА) к 7-метилгуанина (7 МГ) в маточном растворе этого опыта мы сравнили с таковыми в опыте 1:

	ДНК из крови цыпленка	ДНК из фага Т-4В
Опыт № 1	0,376	0,855
Опыт № 3	0,11	0,25

Из результатов опытов 1—3 следует, что при взаимодействии НММ с ДНК происходит метилирование как гуаниновых, так и адениновых остатков. Метилированная ДНК депуринируется с отщеплением 7-метилгуанина, 3- и 7-метиладенина. При этом 3-метиладенин отщепляется быстрее, чем 7-метилгуанин (в соответствии с литературными данными о депуринизации алкилированной ДНК ([11-12, 14])). Еще быстрее, по-видимому, отщепляется 7-метиладенин, который практически уже не обнаруживается в опытах 2 и 3. Обращает на себя внимание сравнительная легкость метилирования аденина в молекуле ДНК и инертность к метилированию аденина в аденозине и адениловой кислоте (рибозидах) при действии НММ. Так, из модельных опытов по обработке адениновых компонентов нитрозометилмочевиной в аналогичных условиях выяснено, что аденозин

не изменяется, а аденозин-5-монофосфат этэрифицируется по фосфатной группе (продукты метилирования гетероциклической части не обнаружены) ([4]). По-иному ведет себя аденин. Ранее, в реакционной смеси аденин + НММ, мы обнаружили 3-метиладенин (максимальный выход) и 1-метиладенин ([4]). В последнее время, применив двумерное хроматографирование, удалось обнаружить и идентифицировать также 7-метиладенин (минимальный выход).

Исследование фага Т-4В E. coli после обработки НММ. Опыт 4. Использовали фаг Т-4В, предварительно очищенный и сконцентрированный на ДЭАЭ-целлюлозе, а затем осажденный на суперцентрифуге при 30 000 *g* в течение 30 мин. ([15]). Суспензию фага в смеси 0,1 *M* фосфатного буфера pH 7 и 0,05 *M* NaCl (титр $5 \cdot 10^{12}$, объем 30 мл) обрабатывали НММ 30 мг/мл (в том числе НММ-C^{14}, 2 мг/мл) и реакционную смесь выдерживали при температуре 37° в течение 3 суток (параллельно ставили контрольный опыт). После центрифугирования (30 000 *g*, 30 мин.) исследовали супернатант и осажденный фаг на содержание метилированных оснований. В супернатанте обнаружили значительное количество ДНК и белка, образующихся, вероятно, вследствие разрушения фаговых частиц под действием НММ. Супернатант обработали двумя объемами спирта, а выделившуюся ДНК депротеинировали встряхиванием в концентрированном растворе NaCl с хлороформом в присутствии изоамилового спирта по описанной методике ([16]). Эту ДНК гидролизовали, а гидролизат хроматографировали и исследовали, как в опыте 2. На хроматограмме и радиоавтограмме гидролизата (количество ДНК 3,5 мг/мл, ватман № 17) четко обнаруживается 7-метилгуанин. На хроматограмме и радиоавтограмме маточного раствора супернатанта наряду с другими (не идентифицированными) продуктами обнаруживаются 7-метилгуанин и 3-метиладенин (идентифицировали, как в опыте 1). Молярное соотношение 3МА / 7МГ ~ ~ 0,5. Осажденный фаг суспендировали в 0,1 *M* NaCl и выделяли ДНК по указанной выше методике ([17]). ДНК, выделенной из осажденного фага, оказалось в 4 раза меньше, чем в супернатанте. Кислотный гидролизат этой ДНК (1,5 мг) содержал один радиоактивный компонент, располагающийся на радиоавтограмме подобно 7-метилгуанину. Совершенно очевидно, что в этом опыте основная часть метилированных оснований отщепляется от молекул ДНК уже после разрушения фаговых частиц (нет уверенности и в том, что НММ не алкилирует ДНК после разрушения фаговых частиц в процессе опыта), и, следовательно, результат опыта не может отражать процесс депуринизации ДНК внутрифаговых частиц ([17]). Но результат опыта четко свидетельствует о том, что метилирование ДНК по гуаниновым и адениновым основаниям идет и в присутствии белка.

Выражаем благодарность Е. С. Головчинской с сотрудниками (Всесоюзный научно-исследовательский химико-фармацевтический институт) за предоставление синтетических препаратов 7-метилгуанина и 7- и 3-метиладенина.

Хабаровский государственный
медицинский институт

Поступило
4 VI 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] И. А. Рапопорт, ДАН, 146, 1418 (1962). [2] И. А. Рапопорт, В сборн. Супермутагены, «Наука», 1966, стр. 9. [3] Л. Л. Гуманов, А. Е. Бедняк, Н. П. Новренко, В сборн. Супермутагены, «Наука», 1966, стр. 34. [4] А. Е. Бедняк, С. Т. Сизова, В сборн. Специфичность химического мутагенеза, «Наука», 1968, стр. 20. [5] А. Е. Бедняк, А. А. Дружков, Сборн. Химич. мутагенез и селекция, 1970. [6] Синтезы органических препаратов, ИЛ, 2, 1949, стр. 373. [7] А. С. Спирин, Биохимия, 23, в. 5, 656 (1958). [8] Т. В. Венкстерн, А. А. Баев, Спектры поглощения минорных оснований, их нуклеозидов, нуклеотидов и некоторых олигорибонуклеотидов, «Наука», 1965, стр. 4. [9] W. Pfleiderer, Iustus Libigs Ann. Chem., 647, 167 (1961). [10] G. Wolstenholme et al., Ciba Foundation Symposium on the Chemistry and Biology of Purines, London, Churchill, 1957, p. 39. [11] P. Lawley, P. Brookes, Biochem. J., 89, № 1, 127 (1963). [12] P. Lawley P. Brookes, Biochem. J., 92, № 3, 673 (1964). [13] А. С. Спирин, А. Н. Белозерский, Биохимия, 21, 768 (1956). [14] E. Kriek, P. Emmelot, Biochem. et biophys. acta, 91, 59 (1964). [15] Т. И. Тихоненко и др., Микробиология, 32, 723 (1963). [16] Химия и биохимия нуклеиновых кислот, Л., 1968, стр. 109. [17] С. Д. Кононова и др., В сборн. Специфичность химического мутагенеза, «Наука», 1968, стр. 76.