

УДК 577 + 547.963.3

ФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Д. Л. ЛАШКОВА, К. Е. КРУГЛЯКОВА, академик Н. М. ЭМАНУЭЛЬ

О ПРИРОДЕ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ РЕАКЦИИ ДНК С N-АЦЕТИЛЭТИЛЕНИМИНОМ

Ранее нами было обнаружено ⁽¹⁾, что в реакции ДНК с химическими мутагенами — производными этиленимина — возникает хемилюминесценция. Были получены кинетические характеристики свечения и показано, что оно является следствием окислительных процессов. Уменьшение интенсивности свечения при добавлении ингибиторов свободнорадикальных реакций позволило предположить радикальную природу хемилюминесценции реакции ДНК с N-ацетилэтиленимином (N-АЭИ).

Для установления места модификации в молекуле ДНК важно было изучить реакцию N-АЭИ с компонентами нуклеиновых кислот. С этой целью была изучена хемилюминесценция реакций N-АЭИ с 2-дезоксид-рибозой, дезоксигуанозином, гуанозин-5-монофосфатом натрия, аденозиндифосфатом натрия, дезоксиаденозин-5-монофосфатом аммония.

Использованные препараты были венгерского производства, бумажно-хроматографически чистые. Растворы готовили в цитратном буфере: 0,15 M NaCl + 0,015 M цитрат натрия, pH 6,9. Основания были использованы в концентрациях, соответствующих предельной растворимости данного основания: аденин $7 \cdot 10^{-3}$ M, тимин $5 \cdot 10^{-2}$ M, цитозин $1 \cdot 10^{-3}$ M, гуанин $1 \cdot 10^{-5}$ M. Концентрация нуклеотидов, нуклеозидов и 2-дезоксид-рибозы составляла 0,1–0,1 мол/л. N-Ацетилэтиленимин синтезировали по методике, описанной в работе ⁽²⁾. Концентрация мутагена в реакционной смеси была 0,1 мол/л.

Свечение регистрировали на фотометрической установке с охлаждаемым водой фотоумножителем ФЭУ-39. Подробное описание установки дано в работе ⁽³⁾. Реакцию проводили при 72°С в термостатированном сосуде, расположенном вблизи фотокатода умножителя. Для анализа брали 2 мл реакционной смеси. Смесь готовили непосредственно в реакционном сосуде, считая момент смешения мутагена с компонентами НК началом реакции.

Свечение не было обнаружено в реакциях индивидуальных оснований НК с N-АЭИ, в то время как в реакциях нуклеозидов, нуклеотидов и 2-дезоксид-рибозы наблюдается заметное свечение. На рис. 1 приведены кинетические кривые хемилюминесценции. Все они имеют S-образный характер подобно кривым свечения реакции ДНК с N-АЭИ. Спектры хемилюминесценции реакции (рис. 2) также аналогичны спектру свечения реакции ДНК с N-АЭИ. Так как во всех исследованных соединениях, для которых наблюдалось свечение в реакции с мутагеном, общей является углеводная часть, можно предположить, что за свечение ответственна реакция N-АЭИ с углеводной компонентой ДНК.

Из рис. 1 видно, что кинетические кривые отличаются по интенсивности хемилюминесценции, т. е. по скорости взаимодействия N-АЭИ с каждым из соединений. Наибольшей интенсивности свечение достигает в реакциях с пуриннуклеотидами, наименьшей — с нуклеозидами. В реакциях N-АЭИ с пиримидиннуклеотидами свечение вообще не удалось зарегистрировать. Таким образом, наличие заместителей в сахаре (основание, фосфатная группа) влияет на активность реакционного центра. Наиболее чувствителен к природе основания и к присутствию различных заместителей в саха-

ре гликозидный атом углевода $\left(\begin{array}{c} \diagup \\ \text{C}_1 \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} \text{N} \\ \diagup \\ \text{H} \end{array} \right)$. Так, в пуриннуклеотидах гликозидная связь менее устойчива, чем в пиримидиннуклеотидах ⁽⁵⁾. Специфика гидроксила при гликозидном атоме или замещающих его группировок заключается в том, что такие группировки обладают высокой реакционной способностью. Это объясняется стабилизацией образующегося при их отщеплении карбониевого иона за счет свободной пары электронов соседнего кислородного атома ⁽⁴⁾.

Более легкий разрыв гликозидной связи должен соответствовать большей скорости реакции, а в нашем случае — большей интенсивности хими-

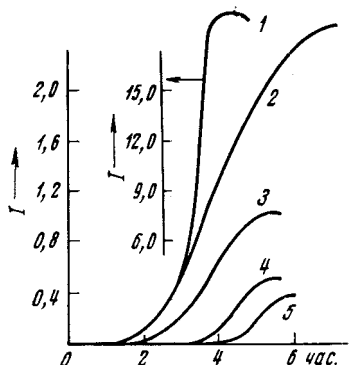


Рис. 1

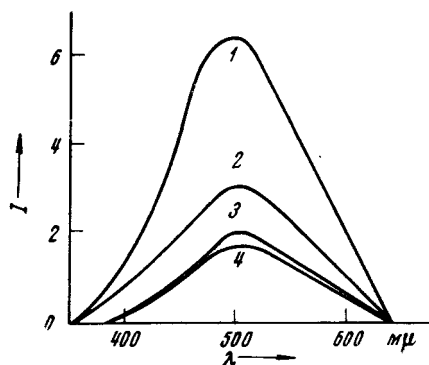


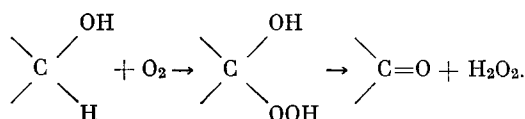
Рис. 2

Рис. 1. Кинетические кривые хемилюминесценции реакций N-ацетилэтилен-имина (0,1 M) с компонентами нуклеиновых кислот (0,01 M): 1 — дезокси-аденозин-5-монофосфат аммония; 2 — гуанозин-5-монофосфат натрия; 3 — 2-дезокси-D-рибоза; 4 — дезоксигуанозин; 5 — цитидин-5-монофосфат натрия

Рис. 2. Спектры хемилюминесценции реакций N-АЭИ (0,1 M) с компонентами НК: 1 — гуанозин-5-монофосфат натрия (0,01 M), 2 — аденозин-дифосфат натрия (0,02 M), 3 — 2-дезокси-D-рибоза (0,1 M), 4 — цитидин-5-монофосфат натрия (0,01 M)

люминесценции. Если предположить, что в нашем случае за хемилюминесценцией ответствен гликозидный атом углевода, то интенсивность свечения в пуриннуклеотидах должна быть выше, чем в пиримидиннуклеотидах в соответствии с устойчивостью гликозидной связи. И действительно, в наших опытах интенсивность хемилюминесценции в реакциях N-АЭИ с пуриннуклеотидами была выше, чем с пиримидиннуклеотидами. Другим подтверждением высказанного предположения явились опыты с полиолами. Были исследованы многоатомные спирты (маннит и дульцит), в которых альдегидная группа восстановлена и отсутствует специфический гликозидный атом. В реакциях этих соединений с N-АЭИ отсутствует хемилюминесценция.

Полученные результаты позволяют предположить, что окислению подвергается гликозидный атом углевода, так как хемилюминесценция реакции ДНК с N-АЭИ, как уже было сказано выше, обусловлена окислительными процессами. Согласно данным ⁽⁶⁾, окисление углевода кислородом в присутствии катализатора сопровождается образованием лактона и H_2O_2 :



В наших экспериментах H_2O_2 была обнаружена в ходе реакции 2-дезокси-D-рибозы с N-АЭИ. При этом кинетическая кривая образования перекиси

водорода оказалась идентичной кинетической кривой хемилюминесценции: она имеет S-образный характер, одинаковую константу скорости, но больший период индукции. Это дает возможность предположить, что H_2O_2 является продуктом распада одного из возможных промежуточных соединений, ответственного за свечение.

Таким образом, анализ экспериментальных данных позволяет предположить, что хемилюминесценция, наблюдаемая в реакции ДНК с N-АЭИ, есть результат окисления углеводной компоненты ДНК по гликозидному атому.

Институт химической физики
Академии наук СССР
Москва

Поступило
14 XII 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Д. Л. Зыбина, К. С. Волокитина и др., Мол. биол., 4, в. 1, 3 (1970).
² Д. Л. Зыбина, М. А. Смотряева и др., Биофизика, 12, № 3, 549 (1967). ³ В. Я. Шляпинтох, О. Н. Карпухин и др., Хемилюминесцентные методы исследования медленных химических процессов, «Наука», 1966, стр. 12, 239. ⁴ Н. К. Кочетков, А. Ф. Бочков и др., Химия углеводов, М., 1967, стр. 187. ⁵ А. Микельсон, Химия нуклеозидов и нуклеотидов, М., 1966, стр. 35. ⁶ M. Rotenberg, M. Thirkau, Helv. chim. acta, 42, 226 (1959).