

Л. А. ПЛУГИНА, Ж. И. ОРЛОВА, Л. Л. ГУМАНОВ

О МЕХАНИЗМЕ ДЕЙСТВИЯ ДИАЗОКЕТОНОВ.

**ВЛИЯНИЕ 1,4-БИСДИАЗОАЦЕТИЛБУТАНА НА НУКЛЕОТИДНЫЙ
ПУЛ ФАГА T4В am 1141**

(Представлено академиком Н. М. Эмануэлем 26 VIII 1971)

Диазокетоны — 1,4-бисдiazоацетилбутан (БДБ) и азасерин — обнаруживают мутагенное действие на животных, растениях и микроорганизмах (¹⁻³). Один из диазокетонов, 1,2-бисдiazоацетилэтан, оказался сильным ингибитором злокачественных опухолей в эксперименте (⁴). Цитостатическое действие диазокетонов определяется влиянием их на синтез ДНК, который ингибируется обратимо (⁵). Экспериментальные данные, полученные нами при изучении механизма действия диазокетонов, привели к заключению, что ингибирование синтеза ДНК происходит вследствие инактивации рибонуклеотидредуктазы. Если это так, то следствием должно быть уменьшение содержания восстановленных рибонуклеотидов в нуклеотидном пуле. Настоящая работа посвящена изучению действия БДБ на нуклеотидный пул мутанта am1141 фага T4В.

Изучали пул пиримидиновых нуклеотидов, которые метили, вводя в инкубационную смесь радиоактивный цитозин. После разделения нуклеотидов хроматографией на бумаге элюировали пятна, содержащие 5-оксиметилдезоксицитидинмонофосфат (5-ОМДЦМФ) и цитидинмонофосфат (ЦМФ). О действии 1,4-бисдiazоацетилбутана судили по изменению содержания этой пары нуклеотидов в пуле.

Фаг T4В am1141, дефектный по ДНК-полимеразе, очищали и концентрировали осаждением полиэтиленгликолем (⁶) до концентрации 10^{11} частиц/мл. Клетки *Escherichia coli* выращивали на синтетической среде М-9 до концентрации $4 \cdot 10^8$ клеток/мл. 25 мл суспензии клеток заражали фагом множественностью 10:1, инкубировали в течение 3 мин. при 37°, затем вводили БДБ (конечная концентрация 2,5; 10 и 50 ммол/л), а еще через 3 мин. вводили цитозин-2-С¹⁴ (1 мС/мл; уд. акт. 42 мС/г). После 1-часовой инкубации по 20 мл суспензии клеток из контрольного и опытного сосудов отбирали в охлажденные льдом центрифужные пробирки, клетки отделяли центрифугированием при 4° и извлекали нуклеотиды 20 мл холодной 1N уксусной кислоты (⁷). После удаления кислоты лиофилизацией нуклеотиды обрабатывали 1N хлорной кислотой в течение 20 мин. при 100° для разрушения пирофосфатных связей (⁸). Мононуклеотиды делили хроматографией на бумаге (FN₂, «Filtrak», ГДР) в системе этанол — тетраборат натрия (⁹), используя ЦМФ в качестве свидетеля. Хроматограммы экспонировали с рентгеновской пленкой РТ-1 в течение 3 мес. Участки хроматограмм, соответствующие радиоактивным ЦМФ и 5-ОМДЦМФ на автордиограмме, вырезали, элюировали водой, растворы концентрировали и определяли их радиоактивность на торцовом счетчике.

Мы не имели в качестве свидетеля 5-ОМДЦМФ, поэтому идентифицировали это производное в виде основания, 5-оксиметилцитозина (5-ОМЦ), после соответствующего гидролиза монофосфата, извлеченного из хроматограммы (¹⁰). При совместном хроматографировании гидролизата с 5-ОМЦ на пластинке из алюминиевой фольги с закрепленным слоем силикагеля («Silufol UV 254», «Kavalier», Чехословакия) в системе изопропанол —

аммиак — вода (85 : 1,3 : 15) радиоактивность была обнаружена в 5-ОМЦ. Так как существуют только восстановленные формы 5-ОМЦ-нуклеотидов, а нуклеотидный пул фага после обработки его 1*N* хлорной кислотой содержал только монофосфаты, можно считать доказанным, что второе радиоактивное пятно на автордиограмме принадлежит 5-ОМДЦМФ.

Выбор фага в качестве объекта исследования позволяет избежать влияния на нуклеотидный пул регуляторной системы, существующей у

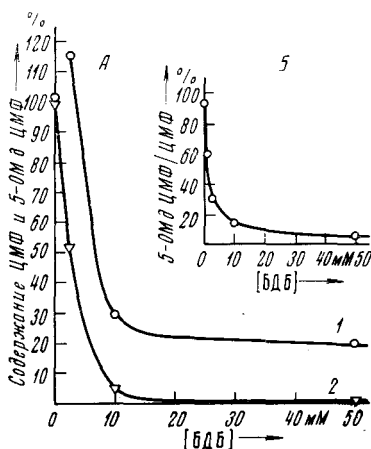


Рис. 1. Влияние БДБ на содержание 5-ОМДЦМФ и ЦМФ (А) и на соотношение 5-ОМДЦМФ / ЦМФ (Б) в нуклеотидном пуле фага Т4В am1141. 1 — ЦМФ; 2 — 5-ОМДЦМФ

БДБ 10 ммол/л количество 5-ОМДЦМФ составляет 4А, ЦМФ 29% от контроля, а при концентрации 50 ммол/л эти величины составляют 1,0 и 19,5% соответственно.

Из рис. 1Б видно, что БДБ неодинаково влияет на количество восстановленных и невосстановленных нуклеотидов. В контроле отношение 5-ОМДЦМФ / ЦМФ составляет 94%, а при увеличении концентрации БДБ от 2,5 до 10 и 50 ммол/л оно уменьшается до 31,14 и 5% соответственно. Таким образом, хотя БДБ в концентрациях выше 2,5 ммол/л угнетает образование как 5-ОМДЦМФ, так и ЦМФ, степень влияния на их синтез различна. Данные, приведенные на рис. 1Б, говорят о том, что синтез восстановленных нуклеотидов тормозится сильнее, чем невосстановленных, поэтому отношение 5-ОМДЦМФ / ЦМФ в присутствии БДБ значительно меньше, чем в контроле. Отсюда можно заключить, что действие БДБ направлено преимущественно на синтез дезоксирибонуклеотидов.

При концентрации БДБ ниже 2,5 ммол/л количество ЦМФ превышает количество его в контроле, в то время как синтез 5-ОМДЦМФ значительно подавлен (рис. 1А). Следовательно, синтез 5-ОМДЦМФ более чувствителен к действию БДБ и угнетается даже низкими его концентрациями, между тем как количество синтезирующегося ЦМФ сначала возрастает, и только с увеличением концентрации БДБ выше 2,5 ммол/л начинает уменьшаться.

Высокая чувствительность синтеза дезоксирибонуклеотидов к действию БДБ подтверждает сделанный нами вывод, что механизм действия диазо-кетонов состоит в подавлении синтеза ДНК путем инактивации рибонуклеотидредуктазы. Главным источником дезоксирибонуклеотидов в клетке является реакция восстановления рибонуклеотидов, катализируемая рибонуклеотидредуктазой. Сильное уменьшение содержания восстановленных рибонуклеотидов в нуклеотидном пуле в присутствии БДБ означает,

что ингибитор блокирует реакцию восстановления. По-видимому, ингибирование синтеза дезоксирибонуклеотидов является первичным эффектом diaзокетонов. В то же время diaзокетоны подавляют и синтез рибонуклеотидов, хотя и не так значительно. Это заставляет предполагать, что, помимо рибонуклеотидредуктазы, diaзокетоны затрагивают какие-то другие ферментные системы.

Филиал Института химической физики
Академии наук СССР
Черноголовка Московской обл.

Поступило
12 VII 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ И. А. Рапопорт, ДАН, **130**, 1134 (1960). ² Н. Н. Зоз, В сборн. Супермутации, «Наука», 1966, стр. 93. ³ V. N. Jurek, W. Szybalsky, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., **44**, 446 (1958). ⁴ Н. М. Эмануэль, Л. Л. Гуманов и др., ДАН, **183**, 724 (1968). ⁵ Л. А. Плугина, Н. Г. Шуппе и др., Биохимия, **36**, 304 (1971). ⁶ R. R. Yamamoto, B. M. Alberts et al., Virology, **40**, 734 (1970). ⁷ R. N. Nazar, H. G. Lawford, J. T.-F. Wong, Anal. Biochem., **35**, 305 (1970). ⁸ M. Y. Chu, G. A. Fischer, Biochem. Pharmacol., **11**, 423 (1962). ⁹ P. Reichard, Acta chem. scand., **12**, 2048 (1958). ¹⁰ Г. Уайатт, В кн. Нуклеиновые кислоты, ИЛ, 1957, стр. 455.