

П. И. ЦЕЙТЛИН, К. Е. КРУТЛЯКОВА, Н. Н. ЗОЗ, А. М. СЕРЕБРЯНЫЙ,  
А. И. ГОРИН, М. А. СМОТРЯЕВА, К. Х. РАНДАЛУ,  
В. К. АТКОЧЮПАЙТЕ, В. С. БОГДАНОВА

### ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ДНК И ДНП ПОД ДЕЙСТВИЕМ N-НИТРОЗО-N-МЕТИЛМОЧЕВИНЫ

(Представлено академиком Н. М. Эмануэлем 23 I 1975)

Работами академика Н. М. Эмануэля с сотрудниками показана перспективность использования физико-химических и кинетических методов при изучении механизма действия биологически активных веществ (<sup>1</sup>). Казалось интересным использовать эти методы в исследованиях механизма действия широко известного противоопухолевого агента (<sup>2</sup>), канцерогена (<sup>3</sup>) и мутагена (<sup>4</sup>) — N-нитрозо-N-метилмочевина (НММ). Было высказано предположение, что в механизме биологического действия НММ определенную роль может играть реакция ее взаимодействия с ДНК (<sup>5</sup>). В связи с тем, что ДНК свои генетические функции в ядрах эукариотов выполняет в комплексе с ядерными белками, представляет интерес рассмотрение повреждений, вызываемых супермутагенами при их взаимодействии с дезоксирибонуклеопротеидными комплексами (ДНП).

Препараты ДНП в растворителе с высокой ионной силой (0,6 M NaCl, 0,1 M фосфатный буфер, pH 7,0), выделенные из свежзамороженной вилочковой железы телянка, содержали не менее 55% белка. ДНК из этой же железы выделяли по методу Кэя (<sup>6</sup>).

НММ, <sup>14</sup>СН<sub>3</sub>-НММ, <sup>14</sup>СО-НММ синтезированы из хлоргидрата метил-амин и мочевины (<sup>7</sup>). Удельная активность <sup>14</sup>СН<sub>3</sub>-НММ 326 мС/г-моль, <sup>14</sup>СО-НММ 150 мС/г-моль.

Нами установлено, что в процессе реакции ДНП с НММ (0,6 M NaCl, 0,1 M фосфатный буфер, pH 7,0, 37°С, концентрация ДНП по ДНК 600 мкг/мл, НММ 2·10<sup>-4</sup> мол/мл, 100 мол. НММ на 1 моль Р<sub>ДНК</sub>) свойства ДНП резко меняются. При переводе пробы реакционной массы в растворитель с ионной силой, близкой к физиологической (0,12 M NaCl, 0,02 M фосфатный буфер, pH 7,0), где, как известно, ДНП нерастворим, для опытных образцов наблюдается повышение растворимости (рис. 1). Для определения растворимости 1 мл опытной и контрольной пробы разбавляли в пять раз добавлением Н<sub>2</sub>O, раствор выдерживали 30 мин. и затем центрифугировали 30 мин., 6000 g, все операции проводили на холоду (+2°). В супернатанте определяли концентрацию ДНК после гидролиза в 5% НСЮ<sub>4</sub> спектрофотометрически, концентрацию белка — по методу Лоури. Количества ДНК и белка, перешедшие в супернатант, выражали в процентах к общему количеству ДНК или белка, взятых в реакцию. Известно, что растворимость нуклеопротеида в среде с физиологической ионной силой может возрастать либо при потере некоторой части белка, либо в результате деполимеризации ДНК, входящей в состав ДНП. О возможной деполимеризации ДНК в составе ДНП под действием НММ свидетельствуют наши эксперименты по изучению кинетики изменения вязкости растворов ДНК в процессе ее инкубации с НММ (рис. 2). Через 24 часа инкубации характеристическая вязкость растворов ДНК снижается более чем в 5 раз. Как видно из рис. 3, количество одиночных разрывов линейно увеличивается в течение первых 4 час. реакции, после чего начинают появляться и

двойные разрывы. По-видимому, увеличение растворимости ДНП в 0,12 *M* NaCl+0,02 *M* фосфатном буфере нельзя объяснить появлением двойных разрывов в ДНК, так как через 10 час. инкубации свободной ДНК с НММ появляется менее 1 парного разрыва, а растворимость ДНП возрастает приблизительно в 10 раз. Через 24 часа инкубации, когда в свободной ДНК накапливается не более 4,5 парных разрывов, ДНП практически перестает осаждаться совсем. В пользу первичности эффекта ослабления и диссоциации связи ДНК — белок говорят и результаты центрифугирования ДНП, растворимого в 0,12 *M* NaCl и 0,02 *M* фосфатном буфере при 180 000 *g* в течение 20 час. В этом случае из раствора осаждается вся ДНК и только 50% белка. Остальной белок при этих условиях центрифугирования не осаждается и остается в растворе.

Кинетику изменения вязкости ДНП в процессе инкубации с НММ в приведенных выше условиях строго измерить не удается, так как процессы агрегации белка и, возможно, части молекул ДНП феноменологически экранируют эффект изменения вязкости, который должен наблюдаться при нарушении структурной организации ДНП. Однако при снижении концентрации НММ совершенно определенно можно регистрировать изменения характера вискозиметрических кривых плавления ДНП (рис. 4). В отличие от контрольных препаратов, вязкость опытных растворов ДНП возрастает с момента начала нагревания и достигает максимальных значений, характерных для вязкости растворов ДНК, уже в области 55—60°. Как было показано ранее, подъем вязкости растворов ДНП при нагревании от 45 до 75° вызван диссоциацией связей ДНК — белок (8). Диссоциация ДНП в этой области температур показана и другими методами (9). Поэтому сдвиг ветви подъема характеристической вязкости на кривой плавления ДНП после реакции его с НММ в области более низких температур свидетельствует об ослаблении в ДНП связей ДНК — белок.

Для идентификации реакций, протекающих при действии НММ на ДНП, изучено включение радиоактивной метки из <sup>14</sup>C-НММ в ДНП и его компоненты. Для этого 15 мл раствора ДНП (200 мкг/мл по ДНК) в 0,6 *M* NaCl+0,1 *M* фосфатном буфере, рН 7,0 смешивали с раствором 11,5 мг радиоактивной НММ в 15 мл того же буфера. Смесь инкубировали 5 час. при 22—24° и затем диализовали 18 час. при 4° против того же буфера. ДНП осаждали центрифугированием в течение 24 час. при 4°, 160 000 *g* и

Таблица 4

Количество продуктов метилирования и карбамоилирования ДНП и его компонентов при действии НММ

	Выход продуктов (мол. × 10 <sup>6</sup> )		
	в цельном ДНП (в расчете на 100 мкг ДНК)	в ДНК (на 100 мкг)	в белке (на 100 мкг)
<sup>14</sup> CO-НММ	0,37±0,10	0,022±0,009	0,18±0,04
<sup>14</sup> CH <sub>3</sub> -НММ	0,30±0,15	0,09±0,03	0,12±0,03
Отношение выхода продуктов карбамоилирования к выходу продуктов метилирования	1,2	0,24	1,5

растворяли в 3 *M* NaCl+5 *M* мочеvine при 4°. Радиоактивность, находившаяся в растворе, характеризовала общее включение метки в ДНП. Затем центрифугированием в тех же условиях осаждали ДНК. В этом случае радиоактивность раствора характеризовала уже включение метки в белок ДНП. Осадок ДНК растворяли при 4° в 0,15 *M* NaCl, обрабатывали проназой, осаждали этанолом и фильтровали на миллипоровом фильтре. Радиоактивность растворов и фильтров определяли в толуольном и диоксановом сцинтилляторах на приборе «Марк-2»; результаты сведены в табл. 1, из данных которой видно, что при действии НММ на ДНП, так же как и в случае ДНК, протекают реакции метилирования и карбамоилирования

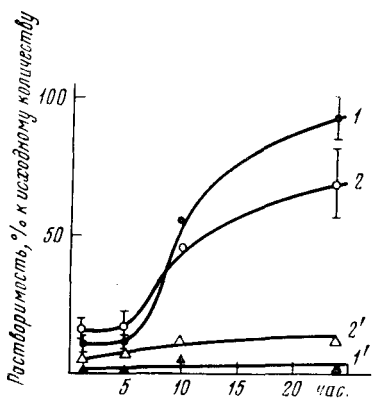


Рис. 1

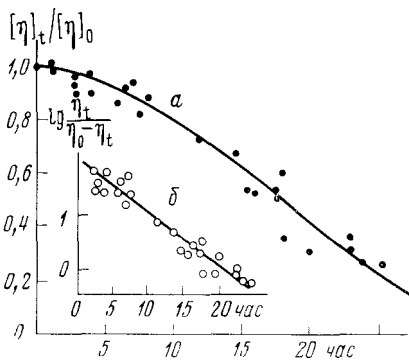


Рис. 2

Рис. 1. Кинетика изменения растворимости ДНП в 0,12 *M* NaCl+0,02 *M* фосфатном буфере, pH 7,0 при реакции с НММ. 1, 2 — процент соответственно ДНК и белка, перешедших в раствор, по отношению к общему количеству ДНК и белка, взятых для перевода в данный растворитель; 1', 2' — то же для контрольного ДНП (инкубирован при 37° без НММ)

Рис. 2. *a* — кинетическая кривая изменения характеристической вязкости растворов ДНК при действии НММ. Растворитель 0,15 *M* NaCl+0,015 *M* цитрат Na, pH 7,0. Условия инкубации:  $C_{\text{ДНК}} = 624$  мг/мл,  $C_{\text{НММ}} = 0,1$  *M*, 37°. Вязкость измеряли на трехшариковом вискозиметре типа Оствальда, измеряемая концентрация ДНК 20 мг/мл, 37°. *б* — полулогарифмическая анаморфаза кинетической кривой *a* в координатах уравнения автокатализа 1 порядка

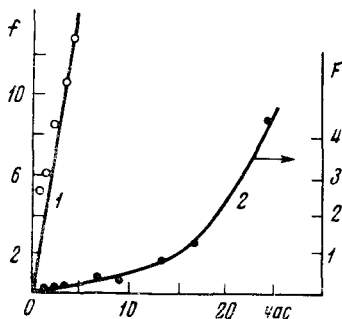


Рис. 3

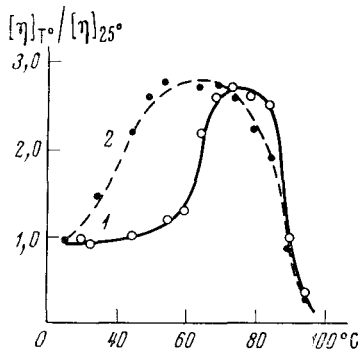


Рис. 4

Рис. 3. Кинетические кривые изменения количества одиночных (1) и парных (2) разрывов в молекуле ДНК. Условия инкубации те же, что и для рис. 2. Разрывы в ДНК определяли по (15)

Рис. 4. Влияние НММ на температурную зависимость относительного изменения характеристической вязкости растворов ДНП. Растворитель 0,6 *M* NaCl+0,1 *M* фосфатный буфер, pH 5,5. Перед нагревом раствор ДНП (концентрация по ДНК 20 мг/мл) инкубировали с НММ ( $10^{-3}$  *M*) при 25°. 1 — контроль, 2 — опыт.

Суммарный выход обеих реакций примерно одинаков, но в то время как метилированию в равной мере подвергаются оба компонента ДНП, карбамоилирование направлено в основном на белок. В результате выход продуктов метилирования ДНК примерно в 4 раза выше выхода продуктов карбамоилирования.

Основными местами атаки в ДНК при метилировании являются гуанин и аденин (обзор см. в (10)). Кроме того, НММ способна метилировать фосфатные группы ДНК (11). Способность НММ метилировать гистоны не изучена, но, исходя из общих соображений, присоединение действующего алкилирующего агента НММ — карбкатиона  $\text{CH}_3^+$  к положительно заряжен-

ным белкам ДНП маловероятно, и метилируются, по-видимому, кислые белки. Наиболее вероятно, что изменение взаимодействия ДНК — белок вызывается реакцией карбамоилирования. Способность НММ эффективно карбамоилировать амины<sup>(12)</sup>, полилизин и гистоны<sup>(13)</sup> известна. В результате карбамоилирования положительно заряженные  $\epsilon$ -аминогруппы лизина превращаются в мочевинные и перестают взаимодействовать с фосфатной группой ДНК. Кроме того, указывалось, что нуклеофильность фосфатных групп ДНК много выше нуклеофильности оснований, поэтому большая часть <sup>14</sup>СО метки, включившейся в ДНК, по-видимому, связана с фосфатными группами<sup>(14)</sup>, что также уменьшает взаимодействие ДНК — белок.

Таким образом, результаты настоящей работы показывают, что НММ, действуя на ДНК, свободную от белка, вызывает одиночные и двойные разрывы полинуклеотидных тяжей. При действии НММ на нуклеопротеидный комплекс модификации подвергается и ДНК, и белок, в результате чего нарушается взаимодействие между ними.

Авторы выражают искреннюю благодарность акад. Н. М. Эмануэлю за постоянное внимание и интерес к работе.

Институт химической физики  
Академии наук СССР

Поступило  
20 I 1975

Институт медицинской генетики  
Академии медицинских наук СССР  
Москва

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> Н. М. Эмануэль, В кн. Химическая кинетика и цепные реакции, М., «Наука», 1966, стр. 531. <sup>2</sup> Н. М. Эмануэль, Е. М. Вермель и др., ДАН, т. 163, 483 (1965). <sup>3</sup> Н. Druckrey, R. Preussman et al., Naturwiss., В. 48, 165 (1961). <sup>4</sup> И. А. Рапопорт, ДАН, т. 146, 1418 (1962). <sup>5</sup> М. А. Смотряева, А. М. Серебряный, К. Е. Круглякова, В сб. Химический мутагенез и создание селекционного материала, М., «Наука», 1972, стр. 81. <sup>6</sup> Е. Р. М. Кау, N. S. Simmons, A. Z. Dounce, J. Am. Chem. Soc., v. 74, 1724 (1962). <sup>7</sup> Ф. Арндт, В сб. Синтезы органических препаратов. ИЛ, т. 2, 1949, стр. 373. <sup>8</sup> Н. В. Челябинов, А. И. Горин и др., Бюлл. эксп. биол. и мед., № 2, 28 (1973). <sup>9</sup> Ю. И. Козлов, В. Г. Дебабов, И. А. Сладкова, Мол. биол., т. 6, в. 3, 359 (1972). <sup>10</sup> С. В. Васильева, А. М. Серебряный, И. А. Рапопорт, Генетика, т. 9, № 7, 80 (1973). <sup>11</sup> P. D. Lawley, Chem. Biol. Interactions, v. 7, № 2, 127 (1973). <sup>12</sup> J. Z. Boivin, P. A. Boivin, Canad. J. Chem., v. 29, 478 (1951). <sup>13</sup> B. Schmall, C. J. Cheng et al., Cancer Res., v. 33, 1921 (1973). <sup>14</sup> А. М. Серебряный, М. А. Смотряева и др., ДАН, т. 185, № 4, 847 (1969). <sup>15</sup> Н. И. Рябченко, П. И. Цейтлин, Радиобиология, т. 3, № 3, 331 (1963).