



УДК 547.963.3

СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ЛАБИЛИЗАЦИЯ N-ГЛИКОЗИДНОЙ СВЯЗИ
В ДЕЗОКСИРИБОЗИЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ АДЕНИНА
ПРИ МОДИФИКАЦИИ АМИНОМЕТИЛОЛЬНЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ

Селин Ю. А., Коломыйцева Е. Н., Поверенный А. М.

*Научно-исследовательский институт медицинской радиологии
Академии медицинских наук СССР, Обнинск*

Показано, что модификация аденинового ядра аминометилольными соединениями, образующимися при реакции формальдегида с аминокислотами, сопровождается расщеплением N-гликозидной связи в дезоксиаденозине и дезоксиаденозин-5'-фосфате. Полупериод расщепления N-гликозидной связи в дезоксиаденозине, модифицированном N-оксиметиленглицином, равен 8 ч при pH 6,2 и 3 ч при pH 5,7 (48°). Действие аминометилольных производных аминокислот на аденозин, дезоксигуанозин и дезоксицитидин не сопровождается расщеплением N-гликозидной связи. При совместном действии формальдегида и аминокислоты на ДНК происходит избирательное отщепление аденина и вследствие этого деградация полинуклеотидной цепи. Протеканием этих реакций в клетке можно объяснить мутагенное и цитостатическое действие формальдегида. Обсуждаются возможные недостатки применения формальдегида для исследования комплексов ДНК-белок.

Ранее нами было показано, что присутствие аминокислот в реакционной среде существенно образом изменяет взаимодействие формальдегида с компонентами нуклеиновых кислот [1, 2]. Первичное связывание формальдегида аминокислотами ведет к образованию продуктов, которые затем вступают в реакцию с нуклеотидами и ДНК со скоростью, превосходящей скорость обычной формальдегидной реакции на два порядка [2]. Продукт взаимодействия CH_2O с аминокислотой, способный реагировать с компонентами нуклеиновых кислот, представляет собой монопроизводное аминокислоты — метилольное или метиленовое [2]. Поскольку существование метиленовых производных аминокислот считается маловероятным [3—5], можно условно принять, что монопроизводное аминокислоты, реагирующее с компонентами нуклеиновых кислот, является метилольным, например монометилэоглицин (ММГ).

Представляется оправданным предположение, что известный мутагенный и цитостатический эффект CH_2O может быть связан с действием на нуклеиновые кислоты именно метилольных производных аминов, формирующихся в реакции CH_2O с внутриклеточными аминами, свободными аминокислотами и аминокислотными остатками белков. Однако из-за обратимости модификации [2] компонентов нуклеиновых кислот метилольными производными аминов при таком объяснении причин мутагенного и цитостатического действия CH_2O возникала необходимость обратиться к поиску дополнительных реакций, обусловленных взаимодействием аминометилольных соединений с нуклеиновыми кислотами. Было установлено, что при инкубации ДНК с CH_2O в присутствии аминокислот происходит деградация полинуклеотидной цепи [2]. Но причины деградации

радации оставались невыясненными, и не существовало никаких очевидных связей между реакцией модификации нуклеотидов метилольными производными аминов и деградацией ДНК. Это побудило нас продолжить изучение реакций аминометилольных производных с компонентами нуклеиновых кислот и ДНК.

Ранее изучавшаяся модификация нуклеотидов под действием ММГ характеризуется большой скоростью, и реакция достигает равновесия за несколько часов при комнатной температуре [2]. Поэтому, характеризуя модификацию, не приходилось увеличивать время наблюдения и повышать температуру реакционной смеси. В настоящей работе изучали действие ММГ на нуклеозиды, нуклеотиды и ДНК при более длительном времени инкубации и при температуре, несколько превышающей комнатную.

Расщепление гликозидной связи в дезоксиаденозине в присутствии ММГ. При БХ смеси, содержащей $5 \cdot 10^{-3}$ М нуклеозида и 0,2 М ММГ, т. е. 0,2 М CH_2O в присутствии 0,6 М глицина [2], разделение нуклеозида и ММГ приводит к быстрой регенерации нуклеозида, поскольку скорость обратной реакции ММГ с дезоксиаденозином очень высока (k_{-1} равна 0,46 мин^{-1} при 20°). Поэтому при проведении хроматографии сразу после достижения равновесия в реакции модификации нуклеозида на хроматограммах присутствует только пятно дезоксиаденозина (R_f 0,48). Однако более длительная инкубация (2—12 ч) при 48° и при нейтральном pH приводит к появлению на хроматограмме второго, видимого в УФ, пятна с R_f 0,68. Содержание вещества в этом пятне увеличивается в зависимости от времени инкубации. По подвижности, спектральным характеристикам, отрицательной реакции на дезоксирибозу вещество, содержащееся в пятне, было идентифицировано как аденин, модифицированный ММГ. При инкубации нуклеотида только с аминокислотой или только с CH_2O при последующем добавлении перед нанесением на бумагу соответственно CH_2O до 0,2 М или глицина до 0,6 М пятна с R_f 0,68 не обнаруживалось. Эти данные позволили заключить, что в присутствии ММГ в дезоксиаденозине происходит выраженное расщепление N-гликозидной связи.

Методика измерения кинетики расщепления гликозидной связи в дезоксиаденозине. Кинетику появления аденина в реакционной смеси при инкубации дезоксиаденозина с ММГ изучали спектрофотометрически. Основанием для этого послужили обнаруженные нами различия УФ-спектров аденина и дезоксиаденозина, модифицированных ММГ. В то время как исходные спектры основания и нуклеозида в достаточной мере совпадают, спектр основания в результате реакции с ММГ претерпевает большее смещение в длинноволновую область, чем спектр нуклеозида (рис. 1). При взаимодействии с ММГ максимум в спектре нуклеозида смещается с 260 к 265 нм, а в спектре основания, — с 260,5 к 285 нм.

Реакция аденина, так же как и аденозина, с ММГ обратима, о чем свидетельствует зависимость степени изменения УФ-спектров от концентрации ММГ в реакционной смеси (рис. 1) и восстановление исходного спектра основания, которое наблюдали через 5 ч после разведения в 100 раз раствора, содержавшего $5 \cdot 10^{-3}$ М аденин в 0,2 М ММГ. Однако равновесие в реакции аденина с ММГ полностью смещается в сторону образования модифицированного основания уже при 0,15 М ММГ (рис. 1). Поэтому при тех концентрациях ММГ в реакционной смеси (0,05—0,25 М), которые были использованы в опытах по изучению скорости расщепления гликозидной связи в дезоксиаденозине, практически весь аденин, появляющийся в результате распада нуклеозида, модифицирован. Следовательно, благодаря особенностям спектра модифицированного аденина разрыв гликозидной связи в дезоксиаденозине в присутствии ММГ будет сопровождаться возрастанием экстинкции реакционной смеси в длинноволновой части спектра; это дает возможность по приросту оптической плотности раствора во времени при 295 нм, где поглощение нуклеозида минимально, измерить кинетику расщепления гликозидной связи.

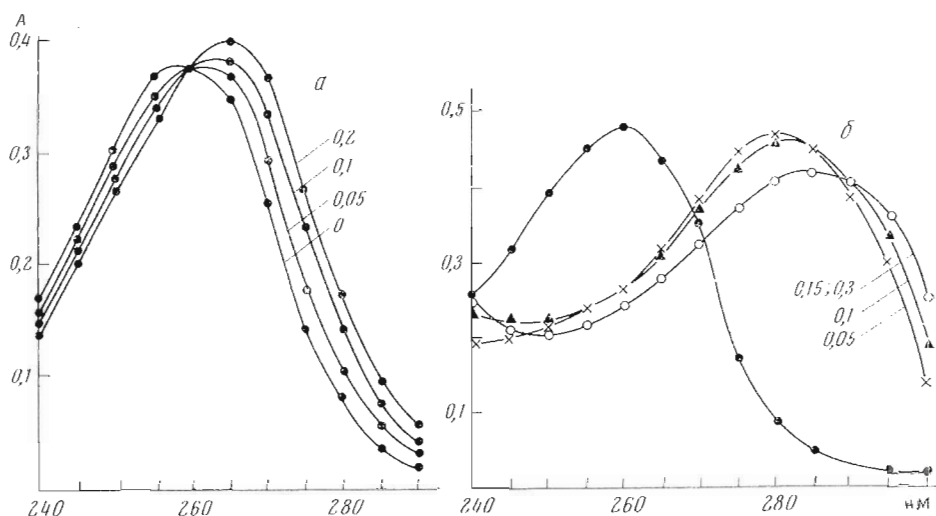


Рис. 1

Рис. 1. Изменения УФ-спектров растворов дезоксиаденозина (а) и аденина (б), обусловленные реакцией с ММГ. Молярные концентрации ММГ указаны около кривых. Спектры измеряли после инкубации (3 ч, 20°)

Рис. 2. Спектральные изменения раствора дезоксиаденозина при инкубации с ММГ. Условия: рН 5,7, 48°. Время инкубации (часы) указано около спектров. A_{∞} — рассчитанный спектр для случая полного гидролиза нуклеозида

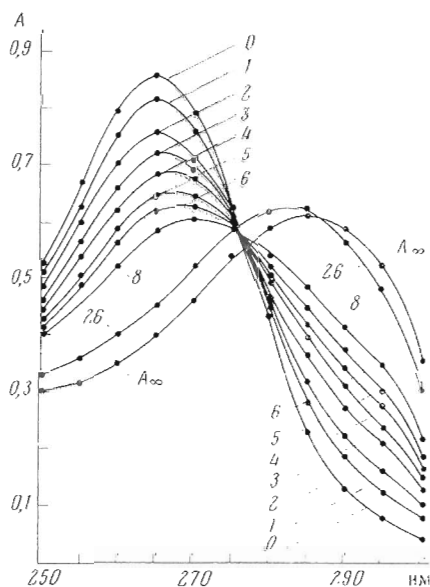


Рис. 2

Поскольку в присутствии 0,2 М ММГ модифицирован весь содержащийся в растворе аденин, то при известной исходной концентрации основания определяли молярные коэффициенты экстинкции модифицированного основания (ϵ_{295} равен 10 100). На основании ϵ_{295} модифицированного аденина рассчитывали поглощение реакционной смеси при 295 нм для случая полного перехода присутствующего в растворе нуклеозида в основание, что было необходимо для оценки содержания аденина в среде в любой момент времени от начала инкубации. Исходную концентрацию нуклеозида, учитываемую при расчете поглощения реакционной смеси для случая полного превращения нуклеозида, определяли на основании известной величины ϵ_{260} для дезоксиаденозина и поглощения смеси при 260 нм в начальный момент инкубации, поскольку при модификации поглощение раствора дезоксиаденозина при 260 нм не изменяется (рис. 1).

Вероятный механизм превращения дезоксиаденозина. При изучении превращения нуклеозида описанным методом было установлено, что в

результате инкубации $5,3 \cdot 10^{-5}$ М дезоксиаденозина с 0,2 М ММГ при рН 5,7 и 48° за 26 ч практически весь нуклеозид превращается в основание (рис. 2). В условиях опыта (0,2 М ММГ, 48°) через несколько минут после добавления ММГ к дезоксиаденозину устанавливается равновесие, при котором модифицировано лишь 40% присутствующего в растворе нуклеозида (определенная спектрофотометрически [2] константа равновесия реакции модификации нуклеозида при 48° равна $3,3 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1}$). Так как расщепление N-гликозидной связи обуславливается, по-видимому, модификацией нуклеозида, полное превращение дезоксиаденозина в аденин можно объяснить тем, что при распаде модифицированного нуклеозида восстановление равновесия в реакции нуклеозида с ММГ приводит к быстрой модификации части присутствующего в растворе нуклеозида. Этот процесс идет до полного превращения нуклеозида.

Предположив, что расщепление гликозидной связи происходит в модифицированном нуклеозиде и обусловлено лабилизацией N-гликозидной связи вследствие модификации, реакции, относящиеся к нуклеозиду, можно отразить следующей схемой:



где А — исходный нуклеозид, А_М — модифицированный нуклеозид, П — продукты превращения нуклеозида (модифицированное основание и дезоксирибоза), k_1 — константа скорости прямой реакции псевдопервого порядка, k_{-1} — константа скорости обратной реакции аденина с ММГ и k_2 — константа скорости расщепления гликозидной связи.

После достижения равновесия в быстрой реакции модификации нуклеозида изменение содержания в растворе как А, так и А_М будет обуславливаться только реакцией расщепления гликозидной связи:

$$\frac{da}{dt} + \frac{da_\text{М}}{dt} = -k_2 a_\text{М}, \quad (2)$$

где a — концентрация нуклеозида, остающегося немодифицированным в момент времени t , $a_\text{М}$ — концентрация модифицированного нуклеозида.

Обозначив концентрацию всего присутствующего в растворе в момент времени t нуклеозида, т. е. $(a + a_\text{М})$, через a_c , запишем

$$a_\text{М} = \frac{K \cdot [\text{ММГ}] \cdot a_c}{K \cdot [\text{ММГ}] + 1}, \quad (3)$$

где K — константа равновесия реакции модификации нуклеозида.

Выразив a и $a_\text{М}$ в уравнении (2) через a_c при последующем интегрировании и после простого преобразования, получим

$$k_2 = \frac{2,3}{t} \cdot \frac{K \cdot [\text{ММГ}] + 1}{K \cdot [\text{ММГ}]} \cdot \lg \frac{(A_\infty - A_0)}{(A_\infty - A_t)}, \quad (4)$$

где A_0 — экстинкция реакционной смеси в начале инкубации при 295 нм, A_t — экстинкция в момент времени t от начала инкубации, A_∞ — экстинкция раствора после полного превращения нуклеозида.

Измеряемая спектрофотометрически кинетика расщепления гликозидной связи хорошо описывается уравнением (4): при 0,2 М ММГ, рН 6,2 и 48° $k_2 = 1,45 \cdot 10^{-3} \text{ мин}^{-1}$ (рис. 3).

Величина k_2 не зависит от концентрации ММГ (рис. 4). Это свидетельствует в пользу предположения, на основании которого выведено уравнение (4), т. е. что разрыв гликозидной связи нуклеозида обусловлен только его модификацией, приводящей к ослаблению гликозидной связи, а не дополнительной реакцией модифицированного нуклеозида с ММГ. Однако в стадии, определяющей общую скорость превращения нуклеозида, должны принимать участие водородные ионы, о чем свидетельствует ли-

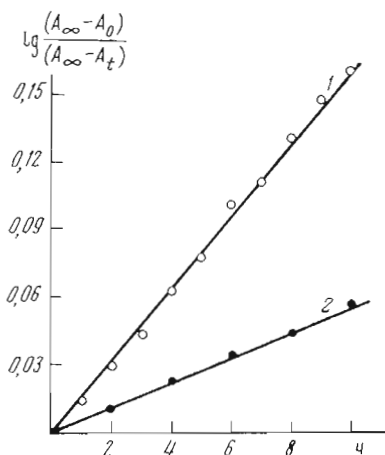


Рис. 3

Рис. 3. Кинетика гидролиза дезоксиаденозина (1) и *d*-АМР (2) модифицированных ММГ

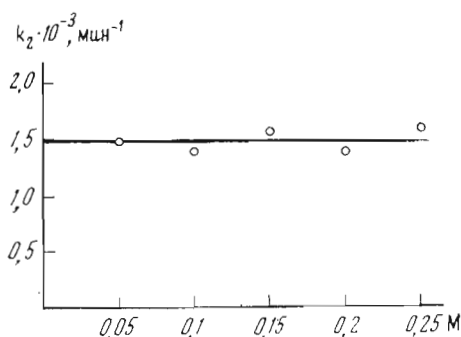


Рис. 4

Рис. 4. Величины константы скорости гидролиза модифицированного дезоксиаденозина при различных концентрациях ММГ (рН 6,2, 48°)

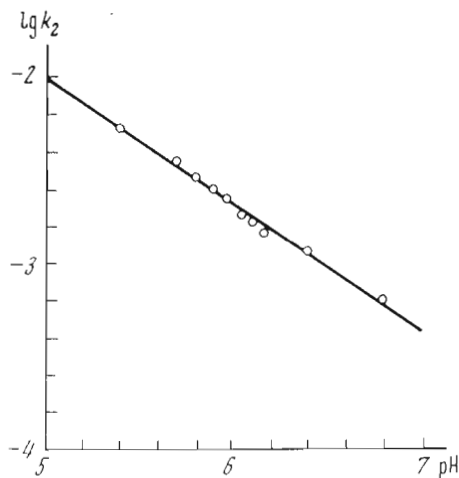


Рис. 5

нейная зависимость скорости расщепления гликозидной связи от концентрации водородных ионов (рис. 5).

Фосфорилирование дезоксиаденозина снижает скорость расщепления гликозидной связи под влиянием ММГ. Величина k_2 для модифицированного *d*-АМР при рН 6,2 и 48° равна $5,4 \cdot 10^{-4} \text{ мин}^{-1}$, т. е. почти в 3 раза меньше k_2 модифицированного нуклеозида в тех же условиях (рис. 3). Определенная спектрофотометрически величина K , входящая в уравнение (4), при 48° для *d*-АМР, как и для дезоксиаденозина, равна $3,3 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1}$.

Как спектрофотометрически, так и хроматографически заметного расщепления гликозидной связи в аденозине и АМР не было обнаружено даже после инкубации 72 ч с 0,2 М ММГ при рН 5,7. Иначе говоря, оценить возможное уменьшение стабильности гликозидной связи в аденозине и АМР под влиянием модификации не представляется возможным за время наблюдения, достаточное для полного превращения дезоксиаденозина и *d*-АМР в этих условиях.

Влияние ММГ на гликозидную связь в производных гуанина. Известно, что изменения в экзоциклических заместителях гуанинового ядра могут вызвать уменьшение стабильности N-гликозидной связи в производных гуанина в той же мере, а в ряде случаев и в большей степени, чем изменения в экзоциклических заместителях аденинового ядра — в производ-

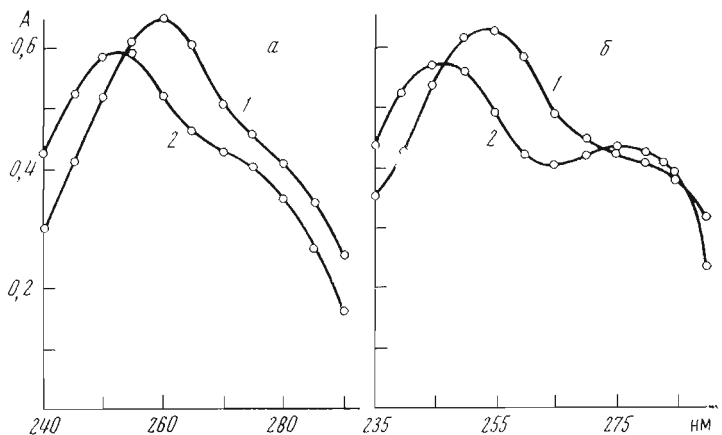


Рис. 6. Изменения УФ-спектров растворов дезоксигуанозина (а) и гуанина (б) при переходе модифицированной ММГ формы (1) в немодифицированную (2). Спектры 1 измеряли сразу после разведения реакционной смеси ($5 \cdot 10^{-3}$ М нуклеиновый компонент, 0,1 М ММГ, 0,1 М Na-фосфатный буфер, рН 6,8) в 100 раз фосфатным буфером. Спектры 2 измеряли через 5 ч после разведения. Температура -20°

ных аденина [6]. Поэтому мы предполагали обнаружить увеличение скорости расщепления гликозидной связи в результате модификации ММГ и в дезоксирибозольных производных гуанина.

В опытах с производными гуанина появление основания при расщеплении N-гликозидной связи в присутствии ММГ можно определять спектрофотометрически. Как в случае нуклеозида, так и нуклеотида при переходе модифицированной в реакции с ММГ формы в немодифицированную, наблюдаемом при уменьшении концентрации ММГ в реакционной смеси, оптическая плотность раствора при 254 нм не изменяется (рис. 6). Если же этот процесс происходит с модифицированным основанием, то при 254 нм не имеет место выраженное снижение экстинкции раствора (рис. 6). В модельных опытах проводили модификацию нуклеозида и основания, а затем смесь разводили в 100 раз буфером. Разведение вызвало регенерацию нуклеозида и основания и, как следствие этого, уменьшение экстинкции раствора при 254 нм, пропорциональное содержанию основания в смеси (рис. 7). Тест является достаточно чувствительным и позволяет обнаружить примеси основания в нуклеозиде, даже если они составляют не более 5%.

Значение константы равновесия ($340 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1}$) реакции модификации дезоксигуанозина при 20° значительно выше величины константы равновесия реакции модификации дезоксиаденозина при той же температуре ($11,3 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1}$). При 48° насыщение спектральных изменений, вызываемых реакцией дезоксигуанозина с ММГ, наблюдается уже в 0,1 М ММГ, т. е. весь присутствующий нуклеозид при этой концентрации ММГ модифицирован. Следовательно, если бы скорость превращения модифицированного дезоксигуанозина была сравнима со скоростью превращения дезоксиаденозина, то в 0,2 М ММГ при 48° выход основания был бы выше в растворе гуанинового нуклеозида, поскольку при этих условиях в случае дезоксиаденозина модифицировано только 40% присутствующего в растворе нуклеозида. Однако при инкубации (48° , 72 ч) дезоксиаденозина или d-G MP с 0,2 М ММГ при рН 5,7, как показало применение описанного выше теста, значимого количества основания не появлялось (относительное уменьшение экстинкции было меньше 0,01, рис. 7). Так же не обнаруживалось основания и после инкубации при 100° 60 мин с 0,2 М ММГ при том же рН, а в случае дезоксиаденозина в этих условиях 60% нуклеозида превращается в основание.

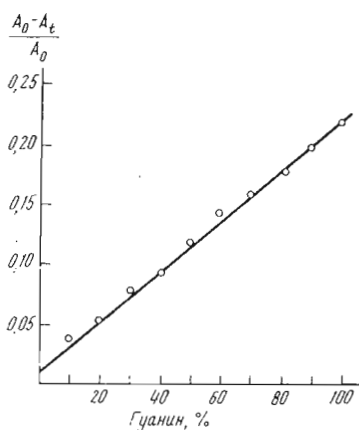


Рис. 7

Рис. 7. Зависимость относительного уменьшения экстинкции при 254 нм смеси модифицированных дезоксигуанозина и гуанина от относительного процентного содержания основания при регенерации нуклеозида и основания. A_0 измерили сразу после разведения смеси в 100 раз, A_t — через 5 ч. Температура — 20°

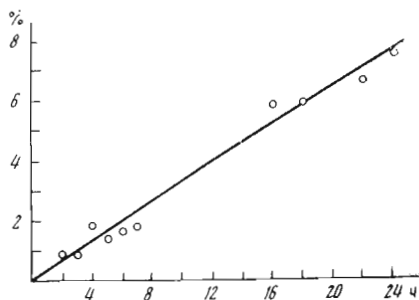


Рис. 8

Рис. 8. Количество кислоторастворимого материала (в % к общему содержанию ДНК в реакционной смеси) при инкубации ДНК с ММГ в течение различного времени при 48°

Отрицательный тест на присутствие гуанина в этих опытах можно объяснить только отсутствием значимого расщепления гликозидной связи в дезоксигуанозине. В контрольном опыте, в котором предварительно проводили кислотный гидролиз нуклеозида, а затем доводили рН смеси до 5,7, добавляли ММГ до 0,2 М и смесь прогревали (100°, 10 мин), относительное уменьшение экстинкции было равно 0,22, что свидетельствовало о полном гидролизе нуклеозида. Также происходил гидролиз, если рН раствора нуклеозида с 0,2 М ММГ после инкубации (100°, 60 мин, рН 5,7) доводили до 1,0, раствор прогревали (100°, 30 мин), а затем возвращали рН к 5,7 для последующего определения основания.

Влияние ММГ на гликозидную связь в дезоксицитидине. При анализе реакционной смеси, содержащей дезоксицитидин и ММГ, также не было получено доказательств ускорения гидролиза дезоксинуклеозида под действием ММГ.

Возможное присутствие основания после инкубации дезоксицитидина с ММГ определяли ВХ (растворитель — 0,01 М Na-фосфатный буфер, рН 6,8, R_f цитозина — 0,6, R_f дезоксицитидина — 0,81). Поскольку подвижность модифицированного нуклеозида отличалась от подвижности немодифицированного нуклеозида и ММГ, то переход дезоксицитидина из модифицированной ММГ формы в немодифицированную (с k_{-1} 0,053 мин⁻¹) в процессе хроматографии приводил к размыванию границ пятна нуклеозида. Поэтому перед нанесением на хроматограмму реакционную смесь, содержащую нуклеозид в $5 \cdot 10^{-2}$ М концентрации, разводили в 20 раз 0,01 М Na-фосфатным буфером (рН 6,85) и выдерживали 3 ч, что вызывало практически полную регенерацию нуклеозида. Затем на хроматограмму наносили 0,2 мл смеси.

В контрольных опытах было определено, что таким способом можно обнаружить цитозин, присутствующий в смеси в $5 \cdot 10^{-3}$ М концентрации, т. е. 10% от исходного содержания дезоксицитидина. Однако при хроматографии раствора нуклеозида, инкубированного с 0,2 М ММГ при рН 5,7 (48°, 96 ч), цитозин не был обнаружен.

Таким образом, полученные результаты позволяют заключить, что расщепление N-гликозидной связи в результате реакции с ММГ значи-

Таблица 1

Изменение нуклеотидного состава ДНК в результате обработки ММГ

ДНК	Соотношение оснований, мол.%			
	А	Г	С	Т
До обработки	28,8	21,2	21,4	28,6
После обработки	23,0	22,9	23,3	30,8

Таблица 2

Спектрофотометрические характеристики вещества, обнаруженного при хроматографии ДНК, обработанной ММГ

pH	$\lambda_{\text{макс}}$, нм	$A_{\text{макс}}$	A_{230}/A_{260}	A_{280}/A_{260}	A_{290}/A_{260}
2	262	0,322	0,77	0,37	0,07
6	260	0,320	0,77	0,13	0,01
12	269	0,290	0,57	0,6	0,025

тельно облегчается только в дезоксиаденозине и его производных. В дезоксигуанозине и дезоксицитидине, а также в аденозине и АМР расщепления N-гликозидной связи в присутствии ММГ при выбранных условиях не наблюдалось.

Отщепление аденина от ДНК в присутствии ММГ. В опытах с использованием ДНК были подтверждены данные о специфическом отщеплении аденина под действием ММГ. Был проанализирован нуклеотидный состав полимерной фракции ДНК, выделенной после инкубации (48°, 24 ч) термоденатурированной тимусной ДНК с 0,2 М ММГ pH 5,7. В этих условиях константа скорости снижения вязкости раствора ДНК равна $7,6 \cdot 10^{-3}$ мин⁻¹. При использованной концентрации ионов натрия в растворе такая скорость уменьшения вязкости обуславливается гидролизом одной из ~ 9300 фосфоэфирных связей молекулы ДНК с $M 3 \cdot 10^6$ примерно за 1,5 ч. Поэтому образование определяемой спектрофотометрически уже в первые часы инкубации кислоторастворимой фракции (рис. 8) можно объяснить только отщеплением оснований от молекулы ДНК. К 24 ч инкубации в кислоторастворимую фракцию переходит $\sim 7,5\%$ исходного материала ДНК. Анализ нуклеотидного состава ДНК, осажденной кислотой в это время, показал, что в кислотонерастворимой фракции относительное содержание аденина уменьшилось в результате инкубации на 5,8% (табл. 1), т. е. из ДНК был удален каждый пятый аденин. Относительное содержание остальных оснований практически в равной степени увеличено. Контролем в этом опыте служила ДНК, осажденная из реакционной смеси в начале инкубации.

С целью установить, действительно ли только аденин отщепляется от ДНК под действием ММГ, проводили БХ растворов ДНК после обработки ММГ в различных условиях (растворитель — бутанол, насыщенный водой). В указанном растворителе обладают подвижностью только основания и нуклеозиды, а нуклеотиды и полинуклеотиды остаются на старте. ДНК эритроцитов цыплят растворяли в воде и денатурировали прогреванием (95°, 5 мин). После добавления раствора ММГ реакционная смесь содержала 3,0 мг/мл ДНК, 0,2 М ММГ в 0,03 М Na-фосфатном буфере (pH смеси 5,7). После инкубации (48 ч при 48° или 40 мин при 95°) раствор наносили по 0,2 мл на бумагу и хроматографировали. За 40 мин при 95° почти вся присутствующая в растворе ДНК переходит в кислоторастворимую фракцию. Но независимо от условий обработки ДНК на хроматограммах

обнаруживалось только одно видимое в УФ-свете пятно с R_f 0,28. После элюирования пятна (объем элюата 3 мл) при разных pH определяли λ_{\max} и отношение абсорбций элюата при различных длинах волн. В табл. 2 представлены данные, полученные в опыте с инкубацией ДНК при 95°. Полученные величины отношений абсорбций характерны для аденина. При элюировании пятна 0,1 М Na-фосфатным буфером (pH 6,8) элюат после добавления раствора ММГ до 0,1 М претерпевал спектральные изменения, характерные для аденина в присутствии ММГ, т. е. λ_{\max} смещалась к 285 нм, λ_{\min} — к 248 нм. По подвижности и по другим характеристикам вещество, содержащееся в единственном на хроматограмме пятне, было идентифицировано как аденин. Содержание аденина в пятне, как можно судить по величине экстинций элюатов при λ_{\max} (табл. 2), составляет ~ 15% от общего содержания аденина в образце ДНК, наносимом на хроматограмму. Кроме аденина, ни в УФ-свете, ни при элюировании различных участков хроматограмм и последующем определении поглощения элюатов, других оснований или нуклеозидов не обнаруживалось.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что при модификации ММГ в дезоксиаденозине и его производных происходит значительная лабильзация N-гликозидной связи, вследствие чего гликозидная связь уже в нейтральной среде и при достаточно низкой температуре расщепляется примерно в 10 000 раз быстрее, чем в немодифицированном дезоксиаденозине [6]. Степень дестабилизации гликозидной связи, вызываемой ММГ, сопоставима с дестабилизацией, обусловливаемой известными алкилирующими агентами при их реакции с производными дезоксиаденозина [6]. Такой же эффект, как и ММГ, вызывают продукты взаимодействия CH_2O и с другими аминокислотами.

Модификация дезоксигуанозина, дезоксцитидина и аденозина продуктом взаимодействия CH_2O с глицином не приводит к столь выраженной дестабилизации N-гликозидной связи. После обработки этих нуклеозидов ММГ длительное время в условиях, при которых аденин отщепляется от дезоксиаденозина и его производных полностью или в значительной степени, оснований обнаружить не удалось.

В присутствии ММГ аденин также отщепляется от ДНК. В пределах чувствительности хроматографического метода полученные данные свидетельствуют, что, кроме аденина, другие основания не отщепляются от ДНК. Можно надеяться, что эти данные будут подтверждены и при применении более чувствительных методов анализа материала, отщепляющегося от ДНК под действием ММГ. В этом случае обнаруженная специфичность в дестабилизации N-гликозидной связи ММГ может быть использована как для частичного, так и для полного удаления аденина из молекулы ДНК, например, в исследованиях, связанных с изучением первичной и вторичной структуры ДНК.

Лабильзация гликозидных связей устанавливает причинную связь между модификацией оснований ДНК и деградацией ДНК в присутствии ММГ [2]. Расщепление гликозидных связей в модифицированной ДНК приводит к возникновению ДНК с частично удаленными основаниями. В такой ДНК, как показано в работе [7], уже в нейтральной среде и при низких температурах с заметной скоростью происходит гидролиз фосфоэфирных связей по местам с удаленными основаниями.

Полученные данные заставляют обратиться к вопросу о причинах мутагенного действия CH_2O , являющегося одним из первых химических мутагенов [8]. Механизм формальдегидного мутагенеза до сих пор остается не выясненным. Попытки объяснить его образованием метиленовых шпиков между пуриновыми нуклеотидами [9] не представляются достаточно оправданными из-за слишком малой скорости образования этих шпиков, небольшого выхода бис-метиленовых производных и несоответствия физиологических условий оптимальным условиям реакции [10]. Предлагаемое нами возможное объяснение механизма действия CH_2O на генети-

ческий аппарат клетки предполагает первичное образование метилольных производных аминов, белков и аминокислот. Эта реакция очень быстрая и может обеспечиваться даже фондом свободных аминокислот клетки [11]. Метилольные производные, в свою очередь, активнейшим образом реагируют с нуклеиновыми кислотами [2], а следствием взаимодействия, как свидетельствуют данные настоящей работы, является значительное ослабление гликозидных связей, резкое возрастание возможности их расщепления.

Из изложенного также следует, что при применении формальдегида в качестве фиксатора в структурных исследованиях комплексов нуклеиновых кислот с белками существует реальная возможность нежелательных изменений исследуемых комплексов. Эти изменения могут, по-видимому, возникать в результате взаимодействия CH_2O со свободными аминогруппами белков и, через продукты этой реакции, с нуклеиновой кислотой.

Экспериментальная часть

В опытах использовали следующие реактивы: аденин, гуанин («Сhemapol», ЧССР), цитозин («Reanal», Венгрия), дезоксиаденозин, дезоксигуанозин («Calbiochem», США), дезоксицитидин («Fluka», Швейцария), аденозин, аденозин-5'-фосфат («Reanal», Венгрия), дезоксиаденозин-5'-фосфат («Serva», ФРГ), дезоксигуанозин-5'-фосфат («Calbiochem», США), глицин х. ч. («Reanal», Венгрия), формальдегид, который готовили из фармацевтического формалина, как описано ранее [12]. Концентрацию формальдегида определяли йодометрическим методом [13].

Все исследуемые реакции компонентов нуклеиновых кислот с ММГ проводили в 0,1 М Na-фосфатном буфере. Содержание ММГ в реакционных смесях определяли, как описано ранее [2]. При этом содержание глицина в растворе в опытах с небольшими концентрациями ММГ не уменьшали ниже границы, определяемой требованием полного связывания CH_2O . Такую концентрацию глицина оценивали, исходя из константы равновесия реакции образования ММГ [3—5]. рН реакционных смесей контролировали в начале и после завершения реакций. Константы скоростей и константы равновесия реакций нуклеозидов с ММГ определяли так же, как в опытах с нуклеотидами [2]. Все константы получены при рН реакционной смеси 6,4. В работе использовали спектрофотометры «Spektrom-201» (Венгрия) или СФ-4А с термостатируемой приставкой. Для предотвращения испарения растворов в ходе наблюдения использовали кюветы с тефлоновыми крышками. Состав раствора в контрольной кювете от реакционной смеси отличался только отсутствием нуклеинового компонента. Ширина кювет — 1 см.

ДНК тимуса теленка выделяли методом Кэя и соавт. [14] в модификации. Содержание белка и РНК в препаратах не превышало 1%. Использовали также препарат ДНК эритроцитов цыплят («Reanal», Венгрия). Кинетику уменьшения молекулярного веса термоденатурированной тимусной ДНК в ходе инкубации с формальдегидом и глицином при 48° определяли вискозиметрически. Раствор ДНК (100 мкг/мл) в 0,1 М Na-фосфатном буфере (рН 8,0), прогретой при 95°, 5 мин, смешивали с равным объемом 1, 2 М глицина в том же буфере, и смесь прогревали непосредственно в вискозиметре при 48°. Реакцию начинали добавлением CH_2O до 0,2 М концентрации. Реакционная смесь имела рН 5,7. Исходный молекулярный вес однотяжевой ДНК был равен $3 \cdot 10^6$.

Количество кислоторастворимого материала, появляющегося при инкубации высокополимерной ДНК с формальдегидом и глицином, определяли спектрофотометрически, как описано ранее [2]. Нуклеотидный состав кислоторастворимой фракции ДНК после инкубации с CH_2O в присутствии глицина определяли хроматографически [15] после гидролиза в запаянных ампулах 85%-ной муравьиной кислотой.

Хроматографию на бумаге («медленная», Ленинград) компонентов нуклеиновых кислот и ДНК, подвергнутых обработке формальдегидом с аминокислотой, проводили, используя в качестве растворителя в опытах с нуклеотидами 0,01 М Na-фосфатный буфер (рН 6,85), в опытах с ДНК — бутанол, насыщенный водой. Присутствие дезоксирибозы на хроматограммах выявляли с помощью реактива Динс, положение аминокислоты — с помощью нингидрина [16].

Авторы выражают благодарность Э. И. Будовскому за плодотворную дискуссию и замечания при написании статьи и Н. Е. Смирновой за помощь в проведении экспериментов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Семин Ю. А., Симонов В. В., Поверенный А. М. (1973) Докл. АН СССР, 208, 1480—1483.
2. Семин Ю. А., Коломыйцева Е. П., Поверенный А. М. (1973) Молекулярн. биология, 8, 276—285.
3. French D., Edsall J. (1945) in *Advances in Protein Chemistry* (Anson M. L., Edsall J. T., eds.), vol. 2, pp. 278—335, Academic Press, New York.
4. Турьян Я. И., Жанталай Б. П. (1962) Кинетика и катализ, 3, 325—331.
5. Жанталай Б. П., Турьян Я. И. (1965) Кинетика и катализ, 3, 761—764.
6. Кочетков Н. К., Будовский Э. И., Свердлов Е. Д., Симуква И. А., Турчинский М. Ф., Шибаяев В. Н. (1970) *Органическая химия нуклеиновых кислот*, стр. 489—500, «Химия», М.
7. Strauss V., Hill T. (1970). *Biochim. et biophys. acta*, 243, 14—21.
8. Рапопорт И. А. (1946) Докл. АН СССР, 54, 65—68.
9. Фельдман М. Я., Залманзон Е. С., Михайлова Л. Н. (1971) Молекулярн. биология, 5, 847—857.
10. Feldman M. Ya. (1967) *Biochim. et biophys. acta*, 149, 20—26.
11. Piperno J. R., Oxender D. L. (1968) *J. Biol. Chem.*, 243, 5914—5920.
12. Симонов В. В., Рябченко Н. И., Поверенный А. М. (1967) Молекулярн. биология, 1, 297—301.
13. Бауер К. (1953) *Анализ органических соединений*, стр. 182, Изд. АН СССР, М.
14. Кау Е. Р. М., Simmons N. S (1952) *J. Amer. Chem. Soc.*, 74, 1724—1726.
15. Ванюшин Б. Ф. (1964) *Современные методы в биохимии* (Орехович В. Н.), 1, стр. 236—250, Медгиз, М.
16. Мацек К. (1962) *Хроматография на бумаге* (Хайс И. М., Мацек К.) стр. 741 и 746, И. Л., М.

Поступила в редакцию
23.VII.1974

SPECIFIC DESTABILIZATION OF N-GLYCOSIDIC BOND IN DEOXYADENOSINE AND ITS DERIVATIVES CAUSED BY MODIFICATION WITH AMINOMETHYLOL COMPOUNDS

SIOMIN Yu. A., KOLOMIYTSEVA E. N., POVERENNY A. M.

*Institute of Medical Radiology,
Academy of Medical Sciences of the USSR, Obninsk*

It is shown that modification of the adenylic nucleus with aminomethylol compounds formed during the reaction of formaldehyde with amino acids is followed by the breakdown of N-glycosidic bond in deoxyadenosine and deoxyadenosine 5'-phosphate. The half-period of N-glycosidic bond dissolution in deoxyadenosine modified with N-hydroxymethylenglycine is found to be 8 hours at pH 6.2 and 3 hours at pH 5.7 (48°). The modification of adenosine, deoxyguanosine and deoxycytidine with aminomethylol derivatives is not accompanied by the cleavage of N-glycosidic bond. The simultaneous action of formaldehyde and an amino acid leads to selective elimination of adenine, and a degradation of polynucleotide chain occurs as a result of adenine loss. The mutagenic and lethal effects of formaldehyde are accounted for by the assumption that the abovementioned reactions might proceed in the cell. The possible limitations of the formaldehyde use for the structural studies of DNA—protein complexes are discussed.