



УДК 547.963.32

КАРБАМОИЛИРОВАНИЕ ОСНОВАНИЙ В ДНК
N-НИТРОЗО-N-МЕТИЛМОЧЕВИНОЙ

Серебряный А. М., Рандаму К. Х. А.

*Институт химической физики
Академии наук СССР, Москва*

Исследована реакция дезоксицитидина и N-нитрозо-N-метилмочевины и выделены карбамоилированные продукты дезоксицитидина: N⁴-карбамоилдезоксцитидин и 3-метил-N⁴-карбамоилдезоксцитидин. Показано, что N-нитрозо-N-метилмочевина карбамоилирует дезоксицитидиновые звенья в нативной и денатурированной ДНК с образованием N⁴-карбамоилдезоксцитидина и 3-метил-N⁴-карбамоилдезоксцитидина.

Исследование механизмов биологического действия химических соединений требует учета всех химических изменений, возникающих при действии этих веществ *in vivo*. В первую очередь представляют интерес изменения, возникающие в ДНК, так как именно они, по-видимому, являются той первопричиной, из которой затем возникают мутагенные и канцерогенные эффекты [1, 2]. По мнению некоторых исследователей, ДНК является также первичной мишенью и при действии канцеролитических агентов [3].

Известна и подробно изучается способность одного из важнейших мутагенов, канцерогенов и антибластомогенных соединений, N-нитрозо-N-метилмочевины, метилировать как нуклеиновые кислоты, так и белки (см. обзор [1]). Известна способность N-нитрозо-N-алкилмочевин карбамоилировать белки [4]. Однако их способность карбамоилировать ДНК остается пока окончательно недоказанной. В литературе можно встретить доводы как в пользу возможности этой реакции [5, 6], так и против [7], причем авторы всех работ обосновывают свое мнение только результатами радиохимических исследований переноса метки от [¹⁴CO]N-нитрозо-N-метилмочевины или 1-(2-хлорэтил)-3-(¹⁴C)циклогексил-1-нитрозомочевины на ДНК. В работах, в которых наблюдался перенос радиоактивной метки, не были установлены направление карбамоилирования и строение образующихся продуктов.

Ранее было показано [8], что из 4 нуклеозидов N-нитрозо-N-алкилмочевины легче всего карбамоилируют цитидин, поэтому следовало ожидать, что если при действии N-нитрозо-N-метилмочевины на ДНК действительно происходит карбамоилирование оснований, то в первую очередь будут образовываться производные цитозина.

Свидетели — карбамоилированные производные дезоксицитидина были получены реакцией дезоксицитидина с N-нитрозо-N-метилмочевинной. Карбамоилированные нуклеозиды имеют pK_a меньше, чем pK_a соответствующих исходных и метилированных нуклеозидов, и поэтому элюируются SE-целлюлозы водой или 0,01 н. соляной кислотой [9]. Поскольку в этом

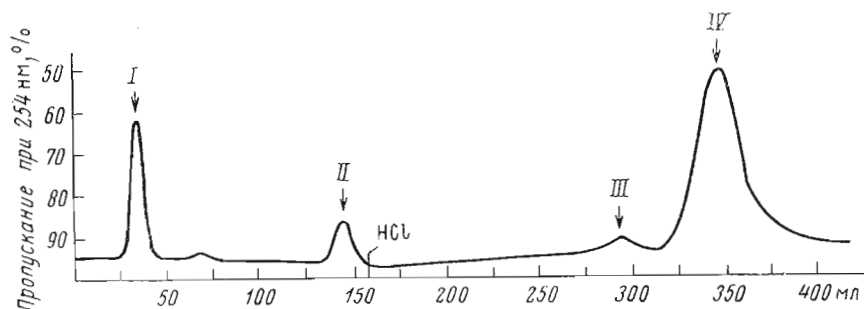


Рис. 1. Хроматография продуктов реакции дезоксицитидина с N-нитрозо-N-метилмочевинной на SE-целлюлозе. I — продукты гидролиза N-нитрозо-N-метилмочевинны, II — N⁴-карбамоилдезоксицитидин, III — 3-метил-N⁴-карбамоилдезоксидеозидин, IV — дезоксицитидин + 3-метилдезоксицитидин

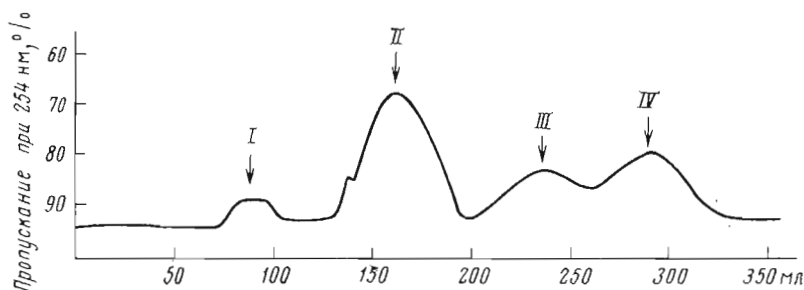


Рис. 2. Хроматография продуктов гидролиза ДНК на сефадексе G-10: I — смесь ферментов, II — пиримидиновые дезоксиинуклеозиды, III — дезоксигуанозин, IV — дезоксиаденозин

случае отпадает необходимость обессоливания фракций, легко может быть осуществлена рехроматография фракций на бумаге. Этот метод и был использован для выделения карбамоилированных производных дезоксицитидина и ДНК.

При хроматографии продуктов реакции N-нитрозо-N-метилмочевинны и дезоксицитидина на SE-целлюлозе (рис. 1) кроме дезоксицитидина (IV) выявляются еще три фракции. Во фракции I находятся продукты гидролиза N-нитрозо-N-метилмочевинны. Данные рехроматографии на бумаге показывают, что во фракции II содержится одно вещество, а во фракции III кроме основного вещества — примесь 3-метилдезоксидеозидина.

Из сопоставления результатов данных опытов с результатами исследований реакции N-нитрозо-N-метилмочевинны с цитидином [9] следует, что, вероятнее всего, во фракции II элюируется N⁴-карбамоилдезоксицитидин, а во фракции III — 3-метил-N⁴-карбамоилдезоксицитидин.

Идентичность УФ-спектра вещества, элюируемого во фракции II, спектру N⁴-карбамоилцитидина и спектра основного вещества из фракции III спектру 3-метил-N⁴-карбамоилцитидина (таблица) позволяет приписать этим веществам указанное строение.

N⁴-Карбамоилдезоксицитидин получен также при реакции дезоксицитидина с нитромочевинной — агентом карбамоилирования аминов. Тождество продуктов реакции дезоксицитидина с N-нитрозо-N-метилмочевинной и нитромочевинной доказано хроматографией на бумаге и сходством УФ-спектров в кислой, нейтральной и щелочной средах. Кроме того, правильность этих отнесений подтверждает обнаружение 3-метилдезоксидеозидина, образующегося, по-видимому, в результате гидролиза 3-метил-N⁴-карбамоилдезоксицитидина во время упаривания кислой фракции III (ср. [9]).

УФ-спектры синтезированных соединений

Соединение	В воде				В 0,1 н. HCl			В 0,1 н. NaOH		
	$\lambda_{\text{мин}}$	$\lambda_{\text{макс}}$	$\frac{D_{\text{макс}_1}}{D_{\text{макс}_2}}$	$\frac{D_{\text{макс}}}{D_{\text{мин}}}$	$\lambda_{\text{мин}}$	$\lambda_{\text{макс}}$	$\frac{D_{\text{макс}}}{D_{\text{мин}}}$	$\lambda_{\text{мин}}$	$\lambda_{\text{макс}}$	$\frac{D_{\text{макс}}}{D_{\text{мин}}}$
N ⁴ -Карбамоил-дезоксцитидин	227, 262	240,287	1,05	2,1	262	297	3,7	250	292	2,1
N ⁴ -Карбамоил-цитидин	227, 262	240,287	1,02	2,0	262	300	4,8	246	294	3,5
3-Метил-N ⁴ -карбамоил-дезоксцитидин	247	226,277	1,2	2,2	225, 262	240,303	4,8	247	279	2,1
3-Метил-N ⁴ -карбамоил-цитидин	247	226,277	1,5	2,1	225, 265	237,305	4,2	247	279	1,9

Гидролиз ДНК, модифицированной [¹⁴CO] нитрозометилмочевинной до нуклеозидов, осуществлен панкреатической ДНКазой и экзонуклеазой А5, содержащей примесь щелочной фосфатазы. После окончания гидролиза хроматографией на сефадексе G-10 фермент и соли отделяли от нуклеозидов и получали пуриновые и пиримидиновые фракции (рис. 2).

Пиримидиновую фракцию продуктов гидролиза ДНК вместе с N⁴-карбамоилдезоксцитидином и 3-метил-N⁴-карбамоилдезоксцитидином подвергли хроматографии на SE-целлюлозе. Выделенные вещества содержали радиоактивные примеси, которые не удалось отделить от свидетелей хроматографией на бумаге в двух системах (рис. 3, 4). Можно сделать вывод, что нитрозометилмочевина действительно карбамоилирует цитозин как в денатурированной, так и в нативной ДНК с образованием N⁴-карбамоилцитозиновых и 3-метил-N⁴-карбамоилцитозиновых звеньев.

При действии на денатурированную ДНК в наших условиях N⁴-карбамоилцитозиновые звенья образуются с частотой 20—40 мкмоль/моль R_{ДНК}. Выход 3-метил-N⁴-карбамоилцитозиновых звеньев втрое меньше.

Из-за низкой удельной активности нитрозометилмочевинной при ее действии на нативную ДНК четко зафиксировано образование лишь N⁴-карбамоилдезоксцитидина с выходом 10—20 мкмоль/моль R_{ДНК}. Количество образовавшегося в этом случае 3-метил-N⁴-карбамоилдезоксцитидина было на грани чувствительности метода.

Ранее нами было показано [8], что N-нитрозо-N-этилмочевина, N-нитрозо-N,N'-диметилмочевина, как и N-нитрозо-N-метилмочевина, способны карбамоилировать основания в нуклеозидах, поэтому, вероятнее всего, и они способны карбамоилировать основания в ДНК.

Карбамоилирующие свойства N-нитрозо-N-метилмочевинны должны находить отражение в ее биологических свойствах. N⁴-Карбамоилдезоксцитидин и 3-метил-N⁴-карбамоилдезоксцитидин, как и продукт его гидролиза — 3-метилурацил, неспособны образовывать канонические уотсон-крикковские пары. В результате образования этих соединений в цепи ДНК будут возникать участки с нарушенной вторичной структурой, а после репликации эти изменения могут привести к ошибкам в матричном синтезе.

Биологическое действие N-нитрозо-N-алкилмочевин обычно связывают с их способностью при алкилировании ДНК образовывать O⁶-алкилпроизводные гуанина. В настоящее время трудно количественно сопоставить выход алкилпроизводных гуанина с выходом карбамоилированных производных цитозина из-за разницы в условиях проведения реакции. Можно ожидать [10, 11], что при действии нитрозометилмочевинны на ДНК

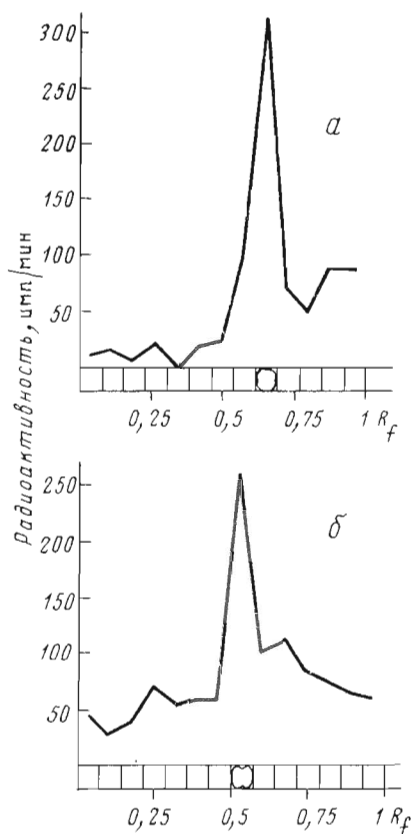


Рис. 3. Рехроматография на бумаге N^4 -карбамоилдезоксицитидина вместе с радиоактивным продуктом гидролиза модифицированной денатурированной ДНК. *a* — система А, *б* — система Б

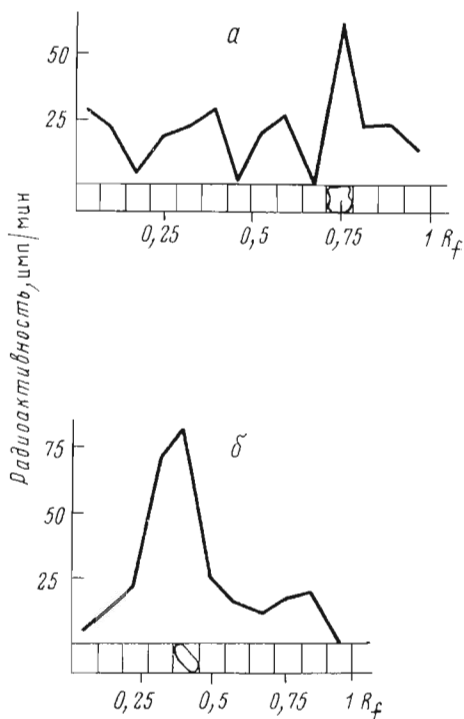


Рис. 4. Рехроматография на бумаге 3-метил- N^4 -карбамоилдезоксицитидина вместе с радиоактивным продуктом гидролиза модифицированной денатурированной ДНК. *a* — система А, *б* — система Б

выход O^6 -метилгуанина на порядок превышает выход N^4 -карбамоилцитозина. Однако для других алкилмочевин, например для N -нитрозо- N,N' -диметилмочевины, обладающей большей карбамоилирующей активностью [8], вклад реакции карбамоилирования в общий эффект модификации ДНК может оказаться значительно большим.

Особенно существенны последствия реакции карбамоилирования при действии N -нитрозо- N -этилмочевинной. Распад N -нитрозо- N -метилмочевины и N -нитрозо- N -этилмочевины протекает практически с одной скоростью, в результате образуется равное количество изоциановой кислоты и метил- и этилкарбкатионов соответственно. Однако алкилирующая способность этилкарбкатиона более чем на порядок меньше алкилирующей активности метилкарбкатиона [12, 13]. В результате при действии на ДНК N -нитрозо- N -этилмочевины будут одинаковыми как количества O^6 -этилпроизводных гуанина и карбамоилированных производных цитозина, так и вклады обеих реакций в биологический эффект. Вопросы эти подлежат, однако, дальнейшей проверке.

Экспериментальная часть

Использованная в работе тимусная ДНК, выделенная стандартным методом [14, 15], имела гиперхромизм 36%; содержание белка в ней по Лоури — 1,3%. Денатурацию проводили нагреванием раствора ДНК

в течение 30 мин при 100°. N-нитрозо-N-метилмочевина синтезирована по описанному методу [16]. [¹⁴CO]Метилмочевина синтезирована из хлоргидрата метиламина и KN¹⁴CO по методике работы [17], а затем нитрозирована. Удельная радиоактивность [¹⁴CO]N-нитрозо-N-метилмочевины 600 мКи/моль.

Использованы: дезоксицитидин (Reanal, Венгрия), SE-целлюлоза (Serva, ФРГ), сефадекс G-10 (Pharmacia, Швеция), бычий сывороточный альбумин, панкреатическая ДНКазы (РФ 3.1.4.5) (СКТБ БАВ, Новосибирск).

Экзонуклеаза А5 (РФ 3.1.4.1), содержащая примесь щелочной фосфатазы, выделена из *Actinomyces coelicolor* А5 [18]. Отношение экзонуклеазной активности к фосфатазной равно 7 : 1; 1 мл раствора экзонуклеазы в 0,05 М Трис-НСl-буфере (рН 8,5) содержал 216 ед. экзонуклеазной активности.

3-Метилдезоксипуридин синтезирован аналогично 3-метилуридину [19].

Нисходящую БХ проводили на бумаге Ватман 2 (W&R, Balston Ltd, Англия) в системах (по объему): пропанол — вода — конц. водный аммиак, 6 : 1 : 3 (А) и бутанол — вода — конц. уксусная кислота, 5 : 3 : 2 (Б).

Распределение радиоактивных веществ на БХ в квадратах по 2 × 2 см устанавливали в толуольном сцинтиллаторе на приборе Mark II.

Реакция дезоксицитидина с N-нитрозо-N-метилмочевиной и нитро-мочевиной. 4,48 мг (0,02 ммоль) дезоксицитидина, 26,8 мг (0,26 ммоль) N-нитрозо-N-метилмочевины и 0,2 мл воды кипятили с обратным холодильником до полного разложения нитрозометилмочевины. Затем смесь разбавляли водой до 1—2 мл и хроматографировали на SE-целлюлозе (колонка 1,8 × 21 см), элюировали водой и после выхода N⁴-карбамоилдезоксцитидина градиентом от 0,01 до 0,025 н. НСl по 150 мл; скорость элюции 50 мл/ч (рис. 1).

Реакцию дезоксицитидина с нитромочевиной проводили аналогично, используя эквивалентное количество нитромочевины.

Реакция ДНК с N-нитрозо-N-метилмочевиной. К раствору 3,77 мг ДНК в 10 мл 0,1 М фосфатного буфера, рН 7,0, добавляли 34,8 мг [¹⁴CO]нитрозометилмочевины (28 моль N-нитрозо-N-метилмочевины на 1 моль фосфора ДНК) и смесь инкубировали 24 ч при 37°. После окончания инкубации продукты распада N-нитрозо-N-метилмочевины удаляли диализом при 4° против 4 × 2000 мл 0,05 М Трис-НСl-буфера, рН 7,5, в течение 36 ч. К модифицированной ДНК добавляли 4 мкг панкреатической ДНКазы, растворенной в 0,8 мл 0,05 М Трис-НСl-буфера (рН 7,5), 1 мг альбумина, растворенного в 1 мл того же буфера, и Mg²⁺ до концентрации 1 · 10⁻³М. Смесь инкубировали 1 ч при 37°, доводили рН до 8,9, добавляли 650 ед. экзонуклеазы А5 и инкубацию при 37° продолжали еще 6 ч. Гидролизат нейтрализовали и полученную смесь нуклеозидов хроматографировали на сефадексе G-10 (колонка 1,8 × 92 см, элюция водой со скоростью 90 мл/ч — рис. 2).

Анализ модифицированной денатурированной ДНК проводили вышеописанным образом, но стадию гидролиза панкреатической ДНКазой в присутствии альбумина опускали и проводили гидролиз экзонуклеазой А5 при рН 8,9 в присутствии Mg²⁺.

Пиримидиновую фракцию продуктов гидролиза ДНК (фракция II, рис. 2) объединяли с фракциями свидетелей N⁴-карбамоилдезоксцитидина и 3-метил-N⁴-карбамоилдезоксцитидина (фракции II и III, рис. 1), упаривали на роторном испарителе при 40° и остаточном давлении 15 мм рт. ст. до 2—3 мл и хроматографировали на SE-целлюлозе в тех же условиях, что и при хроматографии продуктов реакции дезоксицитидина с N-нитрозо-N-метилмочевиной. Полученные вновь фракции N⁴-карбамоилдезоксцитидина и 3-метил-N⁴-карбамоилдезоксцитидина рехроматографировали на бумаге в системе А.

После измерения радиоактивности хроматограммы пятно свидетеля элюировали водой и подвергали повторной хроматографии в системах А и Б с последующим измерением распределения радиоактивности на бумаге.

ЛИТЕРАТУРА

1. Singer B. (1975) in Progress in Nuclear Acid Research and Molecular Biology (Cohn W. E., ed.), vol. 15, p. 219—284.
2. Craddock V. M. (1975) Chem. Biol. Inter., 10, 323—332.
3. Франкфурт О. С. (1976) Клеточные механизмы химиотерапии опухолей, с. 146, «Медицина», М.
4. Wheeler G. P., Bowdon B. J., Struck R. F. (1975) Cancer Res., 35, 2974—2984.
5. Серебряный А. М., Смотряева М. А., Круглякова К. Е., Костяловский Р. Г. (1969) Докл. АН СССР, 185, 847—849.
6. Connors T. A., Hare I. (1974) Brit. J. Cancer, 30, 477—483.
7. Cheng Ch. I., Fujimura Sh., Grunberger D., Weinstein I. B. (1972) Cancer Res., 32, 22—28.
8. Serebryanyi A. M., Mnatsakanyan R. M. (1972) FEBS Lett., 28, 191—194.
9. Серебряный А. М., Мнацакян Р. М. (1971) Докл. АН СССР, 199, 657—660.
10. Shooter K. V., Howse R., Shah S. A., Lawley P. D. (1974) Biochem. J., 137, 303—312.
11. Lawley P. D., Orr D. I., Shah S. A. (1971/72) Chem. Biol. Inter., 4, 431—434.
12. Veleminsky J., Osterman-Golkar S., Ehrenberg L. (1970) Mutation Res., 10, 169—174.
13. Pegg A. E. (1973) Chem. Biol. Inter., 6, 393—406.
14. Zubay G., Doty P. (1956) J. Amer. Chem. Soc., 78, 6207—6217.
15. Kay E. R. M., Simmons N. S., Dounce A. L. (1952) J. Amer. Chem. Soc., 74, 1724—1728.
16. Арндт Ф. (1949) в сб. Синтез органических препаратов (под ред. Б. А. Казанского), т. 2, с. 373—376, Изд-во иностр. лит., М.
17. Marx J., Marx-Holl L. (1954) Chem. Ber., 87, 1499—1501.
18. Tatarskaya R. I., Lvova T. N., Abrosimova-Amelyanchik N. M., Korenyako A. I., Bayev A. A. (1970) Eur. J. Biochem., 15, 442—449.
19. Miles H. T. (1956) Biochim. et biophys. acta, 22, 247—253.

Поступила в редакцию
29.IX.1976

CARBAMOYLATION OF DNA BASES USING N-METHYL-N-NITROSOUREA

■SREBRYANYI A. M., RANDALU K. H. A.

*Institute of Chemical Physics, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow*

A study was made of the reaction between deoxycytidine and N-methyl-N-nitroso-urea, whereby the following products of deoxycytidine carbamylation were isolated: N⁴-carbamoyldeoxycytidine and 3-methyl-N⁴-carbamoyldeoxycytidine. N-Methyl-N-nitroso-urea was shown to modify deoxycytidine portions either in native or denatured DNA giving rise to the same products.