



## ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 575.224:577.113.4

ДЕЙСТВИЕ О-МЕТИЛГИДРОКСИЛАМИНА  
НА ТРАНСФОРМИРУЮЩУЮ ДНК *BACILLUS SUBTILIS*.  
КОРРЕЛЯЦИЯ ХИМИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ С ГЕНЕТИЧЕСКИМИ  
ПОСЛЕДСТВИЯМИ*Перулов Д. А., Мачковский В. В., Яковлев Д. Ю.\*,  
Будовский Э. И.\***Ленинградский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова  
Академии наук СССР, Гатчина, Ленинградской области;**\* Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина Академии наук СССР,  
Москва*

Действие гидроксилламина и его аналогов на неметаболирующие системы вызывает преимущественно транзиции C→U(T) \*, обусловленные модификацией цитозина в матричных полинуклеотидах [1]. В присутствии ионов тяжелых металлов гидроксилламин и N-метилгидроксилламин легко распадаются с образованием радикалов [2, 3], действие которых приводит к неспецифической инактивации генетического материала [4]. O-Метилгидроксилламин является гораздо более стабильным соединением и вследствие этого более эффективным мутагеном [1].

При действии O-метилгидроксилламина на неметаболирующие системы остатки цитозина в составе матричных полинуклеотидов превращаются в остатки N<sup>4</sup>-метоксицитозина (mo<sup>4</sup>Cyt) и 6-метоксиамино-5,6-дигидро-N<sup>4</sup>-метоксицитозина (mo<sup>4,6</sup>hCyt). Изменение условий реакции влияет не только на общую скорость модификации цитозина, но и на соотношение mo<sup>4</sup>Cyt/mo<sup>4,6</sup>hCyt [5].

Недавно нами было показано, что действие 1 M O-метилгидроксилламина (50° C, pH 4,5 и 6,0) на трансформирующую ДНК *Bacillus subtilis* вызывает эффективный мутагенез при практически полном отсутствии специфической инактивации [6, 7]. В настоящем сообщении приведены результаты определения количества mo<sup>4</sup>Cyt и mo<sup>4,6</sup>hCyt, возникающих в трансформирующей ДНК при действии O-метилгидроксилламина, и полученные результаты сопоставлены с генетическими последствиями действия этого мутагена.

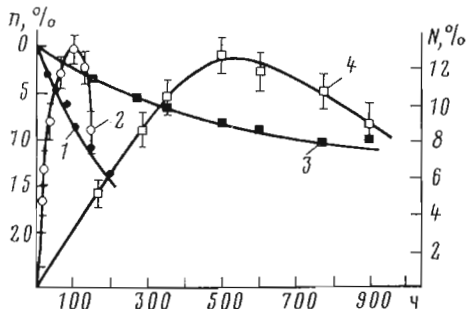
Для работы была использована ДНК *B. subtilis*, меченная <sup>14</sup>C по цитозину и тимину (2000 имп/мгн на 1 мкг ДНК). Модифицированную ДНК подвергали гидролизу до нуклеозидов с помощью панкреатической ДНКазы и нуклеазы А5, содержащей фосфатазу. Смесь нуклеозидов разделяли ВЭЖХ на Ultrasphere C8 (будет опубликовано отдельно) и определяли радиоактивность в пиках, соответствующих Thd, Cyt, mo<sup>4</sup>Cyt и mo<sup>4,6</sup>hCyt. Трансформирующую активность ДНК определяли по маркеру *TrpB3*, а образование мутаций в триптофановом опероне — по Фризу [8].

Как уже отмечалось, инактивация, наблюдающаяся при модификации ДНК NH<sub>2</sub>OMe, обусловлена как при pH 4,5, так и при pH 6,0 практически только спонтанными процессами, но не действием реагента. Количество мутаций, возникающих при действии O-метилгидроксилламина, в обоих

\* Поскольку реакции с производными гидроксилламина относятся в равной степени к рибо- и дезоксирибонуклеозидам, ниже в обозначениях звеньев ДНК опущено сокращение d.

случаях проходит через максимум (см. рисунок), который наблюдается при инактивации трансформирующей активности примерно на порядок, а степень модификации цитозина при обоих значениях pH составляет 8–10%. Следует подчеркнуть, что при действии гидроксилamina в сходных условиях скорость инактивации на несколько порядков больше, в связи с чем и не удается обнаружить максимума на кривых мутагенеза [8, 9].

Соотношение продуктов модификации  $mo^4Cyt/mo^{4,6}hCyt$  при pH 4,5 составляет  $\sim 2,1$  и практически не меняется на протяжении 200 ч реакции. При pH 6,0 это соотношение растет от 1 до 1,6 (при 200 и 900 ч инкубации ДНК с O-метилгидроксилaminом соответственно). Это изменение обусловлено заметным уменьшением скорости образования  $mo^{1,6}hCyt$  после 300 ч инкубации.



Зависимость степени модификации ( $n$ ) цитозинных звеньев в трансформирующей ДНК (1, 3) и относительного количества ( $N$ ) индолзависимых мутантов (2, 4) от продолжительности действия 1 М  $NH_2OMe$  при  $50^\circ C$  и pH 4,5 (1, 2) и 6,0 (3, 4)

В составе ДНК вследствие экранирования плоскостью оснований соседними основаниями общие константы скорости модификации цитозина при действии O-метилгидроксилamina ( $1,5 \cdot 10^{-5} \text{ мин}^{-1}$  при pH 4,5 и  $2,5 \cdot 10^{-6} \text{ мин}^{-1}$  при pH 6,0) примерно в 250 раз меньше, чем в мономере.

При использовании метода Фриза регистрируется возникновение мутаций к ауксотрофии по индолу за счет мутаций в любом из трех генов — *trpC* (индолглицерофосфатсинтетазы), *trpD* (фосфорибозилтрансфераза) и *trpF* (фосфорибозилантранилаизомераза) в триптофановом опероне, входящих в состав одной группы сцепления с маркером *TrpV3*

[8]. В результате спонтанных процессов во время модификации происходит размыкание сцепленных маркеров. Это приводит к снижению вероятности одновременной интеграции в хромосому реципиента участка ДНК, несущего селектирующий маркер (*TrpV*), и предмутационного повреждение, индуцированного действием O-метилгидроксилamina в генах *trpC*, *trpD* или *trpF* [9], что и объясняет наличие максимума на кривых мутагенеза.

Ранее было показано, что  $mo^4Cyt$  обладает двойственной функциональной специфичностью, т. е. имитирует при матричном синтезе как цитозин, так и урацил (тимин) [10, 11]. Поэтому превращение  $Cyt \rightarrow mo^4Cyt$  в матричном полинуклеотиде является наиболее вероятной причиной транзаций  $Cyt \rightarrow Ura(Thy)$ , индуцированных действием O-метилгидроксилamina. Сопоставление влияния pH на скорость инактивации, эффективность мутагенеза, общую скорость модификации цитозина и соотношение  $mo^4Cyt/mo^{4,6}hCyt$  привело к заключению, что  $mo^{4,6}hCyt$  не обладает функциональной активностью и его образование в матрице блокирует репликацию, но может индуцировать репарацию или рекомбинацию [1].

Как видно из рисунка, максимумы на мутационных кривых при действии 1 М O-метилгидроксилamina на трансформирующую ДНК наблюдаются при  $\sim 10\%$  модификации цитозина, т. е. когда модифицировано одно из  $\sim 50$  оснований в цепи, причем от половины до одной трети модифицированных звеньев представлены  $mo^{4,6}hCyt$ . Отсутствие заметного влияния такой модификации на трансформирующую активность ДНК дает основание предположить, что  $mo^{4,6}hCyt$  в трансформирующей ДНК либо устраняется какой-либо репарирующей системой (до и/или после интеграции модифицированной ДНК в хромосому реципиента), либо, как и  $mo^4Cyt$ , не блокирует репликацию у *B. subtilis*.

1. *Budowsky E. I.* In: Progr. in nucl. acid res. and mol. biol., v. 16/Ed. Cohn W. E. N. Y.—London: Acad. Press, 1976, p. 125–188.
2. *Freese E., Bautz-Freese E.* Biochemistry, 1965, v. 4, № 11, p. 2419–2424.
3. *Janion C., Shugar D.* Acta biochim. polon., 1971, v. 18, № 4, p. 403–416.
4. *Bautz-Freese E., Freese E.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1964, v. 52, № 5, p. 1289–1297.
5. *Budowsky E. I., Sverdlov E. D., Shibaeva R. P., Monastyrskaya G. S., Kochetkov N. K.* Biochim. et biophys. acta, 1971, v. 246, № 2, p. 300–319.
6. *Бреслер С. Е., Будовский Э. И., Мачковский В. В., Перумов Д. А.* Докл. АН СССР, 1981, т. 257, № 2, с. 480–482.
7. *Бреслер С. Е., Мачковский В. В., Перумов Д. А., Будовский Э. И.* Генетика, 1983, т. 19, № 9, с. 1397–1403.
8. *Freese E., Strack H. B.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1962, v. 48, № 10, p. 1796–1803.
9. *Bresler S. E., Kalinin V. L., Perumov D. A.* Biopolymers, 1964, v. 2, № 1, p. 135–146.
10. *Budowsky E. I., Sverdlov E. D., Spasokukotskaya T. N.* FEBS Lett., 1971, v. 17, № 2, p. 336–338.
11. *Banks G. R., Brown D. M., Streeter D. G., Grossman L. J.* Mod. Biol, 1971, v. 60, № 3, p. 425–439.

Поступило в редакцию  
11.VI.1984

**ACTION OF O-METHYLHYDROXYLAMINE ON *BACILLUS SUBTILIS*  
TRANSFORMING DNA. CORRELATION OF CHEMICAL ALTERATIONS  
WITH GENETIC CONSEQUENCES**

PERUMOV D. A., MACHKOVSKY V. V., YAKOVLEV D. Yu.\*,  
BUDOWSKY E. I.\*

*B. P. Konstantinov Leningrad Institute of Nuclear Physics, Academy  
of Sciences of the USSR, Leningrad;*

*\*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences  
of the USSR, Moscow*

The action of methoxyamine (MA) on *B. subtilis* transforming DNA (50° C, pH 4,5 and 6,0, 1 M MA) was studied. The rate of cytosine residues modification in DNA is 250 times less than in monomer (rate constants for DNA are  $1,5 \cdot 10^{-1} \text{ min}^{-1}$  at pH 4,5, and  $2,5 \cdot 10^{-6} \text{ min}^{-1}$  in the first 300 hours of treatment at pH 6,0). At pH 4,5 the rates of cytosine (I) conversion into N<sup>4</sup>-methoxycytosine (II) and into 6-methoxyamino-5,6-dihydro-N<sup>4</sup>-methoxycytosine (III) are constant (II/III ratio is about 2,1). At pH 6,0 the II/III ratio smoothly increases from 1,0 to 1,6 (200 and 900 hours of treatment) due to a decrease in the product III accumulation rate.

The frequency of MA-induced mutations shows a bell-shaped dependence on time with maxima (~10%) at 80 (pH 4,5) and 500 (pH 6,0) hours of treatment. In both cases ~10% of cytosine residues are modified. These results suggest that either compound III is efficiently removed from the transforming DNA, or its presence does not arrest the DNA replication.