



УДК 577.113.4

АМИНОКИСЛОТЫ КАК КАТАЛИЗАТОРЫ РЕАКЦИИ СВЯЗЫВАНИЯ  
ФОРМАЛЬДЕГИДА С АДЕНИНОВЫМ ОСТАТКОМ В СОСТАВЕ  
ПОЛИАДЕНИЛОВОЙ КИСЛОТЫ*Волков В. С., Иванова Г. А., Поверенный А. М.,  
Свердлов Е. Д.\***Научно-исследовательский институт медицинской радиологии  
Академии медицинских наук, Обнинск Калужской обл.;**\* Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина Академии наук СССР,  
Москва*

Исследовано связывание формальдегида с poly(A), poly(G) и poly(C) в присутствии аминокислот (Gly, Leu, Lys) в сравнении с обработкой одним формальдегидом. Найдено, что в случае poly(A) аминокислоты выполняют функцию катализатора реакции N-гидроксиэтилирования по экзоаминогруппе.

Ранее мы показали, что обработка нуклеиновых кислот формальдегидом в присутствии амина приводит к существенному изменению характера протекающих реакций в сравнении с действием самого формальдегида. Например, увеличивается скорость реакций модификации нуклеотидов и значительно возрастает скорость расплетания двухтяжевой ДНК [1, 2], происходит деградация полинуклеотидной цепи вследствие специфического расщепления N-гликозидной связи по адениновым звеньям [3, 4]. Кроме того, обработка ДНК формальдегидом и аминокислотами оказывает ингибирующее действие на ее матричную активность в РНК-полимеразной системе, которое в количественном и качественном отношении отличается от ингибирующего действия одного формальдегида. Например, после обработки HCHO и Gly в основном ингибируется инициация синтеза рибонуклеиновых кислот, начинающихся с адениновых нуклеотидов [5].

С целью изучения реакций модификации ДНК, приводящих к специфическому ингибированию ее матричной активности, в данной работе мы исследовали связывание  $[^{14}\text{C}]\text{HCHO}$  и  $[^3\text{H}]\text{аминокислоты}$  по методу двойной метки с poly(A), poly(G) и poly(C) при обработке последних смесью формальдегида и аминокислоты или одним формальдегидом.

При действии на poly(A) смеси  $[^{14}\text{C}]\text{HCHO}$  и  $[^3\text{H}]\text{Gly}$  мы обнаружили, что кривая связывания  $[^3\text{H}]\text{Gly}$  имеет максимум, тогда как включение  $[^{14}\text{C}]\text{HCHO}$  и соотношения связываемых реагентов HCHO/Gly в течение модификации прогрессивно растут (рис. 1). Ход кривых 1 и 2 на рис. 1 характерен для кинетики последовательно идущих реакций. В этой связи течение наблюдаемой модификации poly(A) при действии HCHO-Gly можно представить следующей схемой: в начале реакции быстро образуется и накапливается продукт, в состав которого входят остатки формальдегида и глицина (этот продукт условно обозначен poly(A)-HCHO-Gly), последующее элиминирование глицина из которого приводит к другому продукту модификации, содержащему только остатки формальдегида (обозначен poly(A)-HCHO).

Образование двух структурно разных модификаций, лабильных в отсутствие свободных HCHO и Gly, подтверждается кинетикой их разложения. С этой целью poly(A) обрабатывали смесью  $[^{14}\text{C}]\text{HCHO}$  и  $[^3\text{H}]\text{Gly}$  при 20° С, затем свободные реагенты отделяли от полинуклеотида гelfильтрацией и следили за ходом элиминирования радиоактивной метки из полученного таким образом образца при 50° С. Независимо от времени предварительной инкубации poly(A) со смесью HCHO-Gly (5—270 мин)

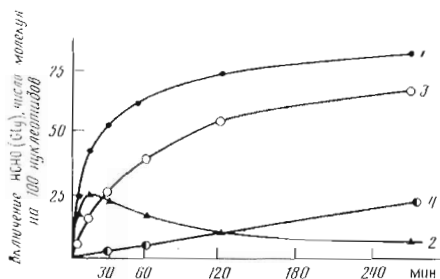


Рис. 1

Рис. 1. Включение  $[^{14}\text{C}]\text{НСНО}$  (1) и  $[^3\text{H}]\text{Gly}$  (2) при их одновременном действии на  $\text{poly}(\text{A})$  в «прямой» реакции и остаточное содержание  $[^{14}\text{C}]\text{НСНО}$  после элиминирования глицина (3). Кривая 4 — включение  $[^{14}\text{C}]\text{НСНО}$  при реакции  $\text{poly}(\text{A})$  с одним  $[^{14}\text{C}]\text{НСНО}$  или со смесью  $[^{14}\text{C}]\text{НСНО}$  — саркозин (обработка аналогична получению кривой 3). Условия реакций и измерений — см. «Экспер. часть»

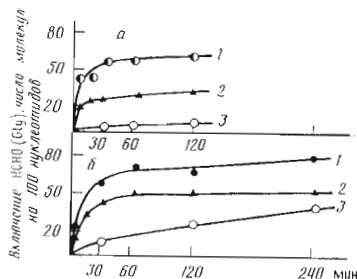


Рис. 2

Рис. 2. Кинетика включения  $[^{14}\text{C}]\text{НСНО}$  (1, 3) и  $[^3\text{H}]\text{Gly}$  (2) в  $\text{poly}(\text{G})$  (а) и  $\text{poly}(\text{C})$  (б) в «прямой» реакции при действии на полинуклеотиды смеси  $[^{14}\text{C}]\text{НСНО}$ - $[^3\text{H}]\text{Gly}$  (1, 2) и одного  $[^{14}\text{C}]\text{НСНО}$  (3). Условия реакций — см. «Экспер. часть»

вначале наблюдается быстрое элиминирование всего включенного  $[^3\text{H}]\text{Gly}$  и примерно эквимольного количества  $[^{14}\text{C}]\text{НСНО}$  (менее 10 мин,  $50^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH}$  6,0), что свидетельствует о полном распаде за это время продукта модификации  $\text{poly}(\text{A})\text{-НСНО-Gly}$ . В последующем выщепление остаточного  $[^{14}\text{C}]\text{НСНО}$  идет много медленнее (время полувыщепления  $\sim 30$  мин,  $50^\circ\text{C}$ ). Включение медленно элиминируемого  $[^{14}\text{C}]\text{НСНО}$  быстро растет (кривая 3, рис. 1). Кривая 4 на этом же рисунке отражает кинетику включения формальдегида в  $\text{poly}(\text{A})$  при аналогичной обработке, но в отсутствие глицина. Кривая 3 опережает ход кривой 4 так, что в первые 30 мин превышение почти 10-кратно.

Определенные нами константы скорости элиминирования  $[^{14}\text{C}]\text{НСНО}$  из продукта модификации  $\text{poly}(\text{A})\text{-НСНО}$ , полученного обработкой  $\text{poly}(\text{A})$  одним формальдегидом, и из продукта  $\text{poly}(\text{A})\text{-НСНО}$ , полученного действием на  $\text{poly}(\text{A})$  смеси  $\text{НСНО-Gly}$ , который остается после элиминирования глицина, соответственно равны  $(2,70 \pm 0,1) \cdot 10^{-4}$  и  $(2,65 \pm 0,1) \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$  ( $50^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH}$  6,0). Равенство констант означает, что оба продукта модификации  $\text{poly}(\text{A})\text{-НСНО}$  по строению идентичны, а следовательно, кривые 3 и 4 на рис. 1 отражают кинетику образования одного и того же продукта модификации. Этим продуктом, по-видимому, является экзо-N-гидрокси метилированная  $\text{poly}(\text{A})$ . Действительно, согласно данным [6—9], при реакции нуклеиновых кислот с формальдегидом образуются лабильные N-гидрокси метильные производные по имино- и аминогруппам азотистых оснований. Тогда при действии формальдегида на  $\text{poly}(\text{A})$  должна идти реакция гидрокси метилирования по экзоаминогруппе аденинового остатка. В таком случае обработка  $\text{poly}(\text{A})$  формальдегидом в присутствии глицина приводит к значительному ускорению реакции экзо-N-гидрокси метилирования; следовательно, глицин в данном случае выполняет необычную функцию катализатора этой реакции.

В качестве катализаторов реакции экзо-N-гидрокси метилирования  $\text{poly}(\text{A})$  были проверены некоторые другие аминокислоты. Оказалось, что в присутствии лизина и лейцина скорость связывания формальдегида увеличивается, хотя активность этих аминокислот как катализаторов здесь менее выражена. С другой стороны, в присутствии вторичного амина N-метилглицина (саркозина) скорость связывания формальдегида с  $\text{poly}(\text{A})$  практически не изменяется (данные не приводятся).

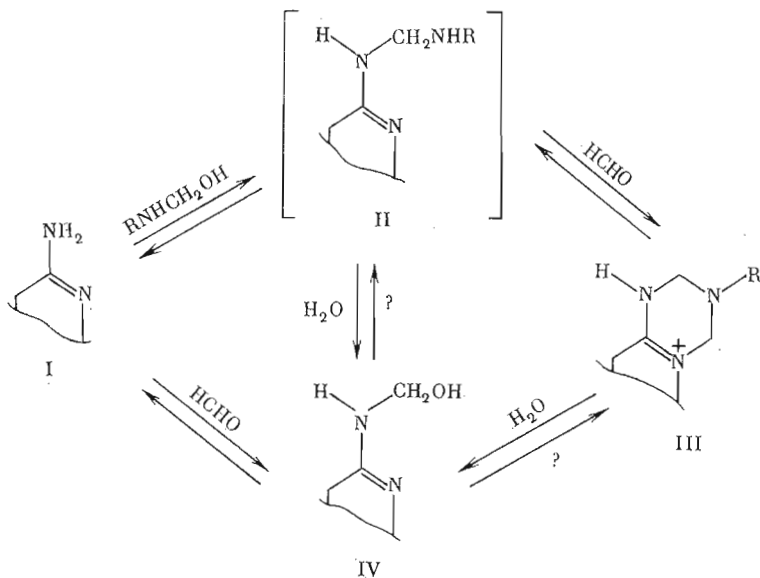
При изучении модификации  $\text{poly}(\text{G})$  и  $\text{poly}(\text{C})$  активность глицина и лейцина как катализаторов реакции N-гидрокси метилирования нами не обнаружена. Как и в случае  $\text{poly}(\text{A})$ , в присутствии глицина связывание формальдегида с  $\text{poly}(\text{G})$  и  $\text{poly}(\text{C})$  значительно выше, чем при действии одного формальдегида (рис. 2, ср. кривые 1 и 3). Однако в отличие от  $\text{poly}(\text{A})$  здесь включение глицина (кривые 2) идет параллельно

включенно формальдегида так, что в течение модификации соотношение связывающихся с полинуклеотидом [ $^{14}\text{C}$ ]НСНО и [ $^3\text{H}$ ]Gly практически не изменяется. При этом молярное отношение НСНО/Gly для модифицированной poly(G) близко к 2 : 1, а для poly(C) составляет 1,4 — 1,5. Обе модификации после удаления избытка реагентов регенерируют исходный полинуклеотид.

Кинетика элиминирования радиоактивной метки из этих продуктов изучена аналогично рассмотренной для poly(A). Оказалось, что скорости отщепления [ $^{14}\text{C}$ ]НСНО и [ $^3\text{H}$ ]Gly из poly(G)-НСНО-Gly одинаковы, элиминирование НСНО и Gly идет в соотношении 2 : 1 и после полного исчезновения [ $^3\text{H}$ ]Gly ( $\sim 2$  сут при 20° С, pH 6,0) связанный с полинуклеотидом [ $^{14}\text{C}$ ]НСНО также не регистрируется. Это свидетельствует о том, что полученный продукт poly(G)-НСНО-Gly представляет собой структурно однородную модификацию, практически не содержащую N-гидрокси-метилированных оснований. В случае продукта модификации poly(C)-НСНО-Gly, так же как и для poly(A)-НСНО-Gly, вначале идет элиминирование всего [ $^3\text{H}$ ]Gly и только части [ $^{14}\text{C}$ ]НСНО (более 1 моль/моль), а затем более медленное выщепление остаточного [ $^{14}\text{C}$ ]НСНО. Здесь важно, что после полного отщепления [ $^3\text{H}$ ]Gly ( $\sim 10$  мин, 50° С, pH 6,0) количество остающегося связанным с poly(C) формальдегида в 2 раза меньше, чем было получено для контрольных образцов при аналогичной обработке, но при модификации poly(C) одним формальдегидом (данные не приведены). Таким образом, обработка poly(G) и poly(C) смесью НСНО-Gly приводит преимущественно к продуктам модификации, строение которых обусловлено одновременным связыванием формальдегида и глицина. Образование же продуктов модификации за счет присоединения самого формальдегида в этих случаях значительно или полностью подавлено.

Ускорение реакций модификации нуклеиновых кислот при добавлении к формальдегиду алифатического первичного амина в литературе [1, 2, 10, 11] логично объясняется конденсацией нуклеиновых оснований с так называемыми монометилольными производными  $\text{RNHCH}_2\text{OH}$ , приводящей к образованию новых продуктов реакции за счет аминометилирования по имино- или аминогруппам нуклеинового компонента. Наряду с этим в работе [11] обсуждалась возможность ускорения модификации в такой системе за счет реакции N-гидрокси-метилирования, катализируемой присутствующим амином по механизму кислотно-основного или нуклеофильного катализа, но эта идея была отвергнута самими авторами. Действительно, ход модификации в случае poly(G) и poly(C) не противоречит выказанному ранее предположению о преимущественном образовании продуктов аминометилирования (вероятно, оснований Манниха) при их обработке смесью формальдегида и амина. Напротив, при модификации poly(A) помимо образования последних наблюдается значительное ускорение реакции гидроксиметилирования по экзоциклической аминогруппе. Следует отметить, что, как показало проведенное нами предварительное изучение модификации мономерных компонентов нуклеиновых кислот, описанный феномен проявляется не только в случае poly(A), но вообще характерен для 9-N-замещенных аденинов при действии на них смеси формальдегида и первичного амина. По-видимому, проявление каталитической активности амином здесь обусловлено нуклеофильным катализом через промежуточные лабильные соединения. Какова их структура?

Ответ на поставленный вопрос непосредственно связан с установлением строения продуктов аминометилирования нуклеиновых кислот в условиях реакции Манниха. Хотя в настоящее время структура таких продуктов окончательно не установлена, в случае формальдегида и первичных аминов основное направление модификации нуклеиновых оснований, по-видимому, связано с образованием N,N'-циклоаддуктов. Так, наиболее вероятно, что при модификации цитидина образуется 3,4-N'-циклоаддукт (III) [12] (схема). Аналогичный 1,6-N'-циклоаддукт типа (III) показан для реакции аденина с формальдегидом и метил амином [13].



Также выделен 1,2-N-циклоаддукт 9-метилгуанина [14]. Весьма вероятно, что N,N'-циклоаддукты образуются при модификации нуклеиновых оснований в составе полинуклеотидной цепи. Аргументом в пользу такого предположения служит соотношение HCHO/Gly 2 : 1, полученное нами для продукта модификации poly(G)-HCHO-Gly. Циклоаддукты (III) устойчивы в безводных растворителях, но в присутствии воды гидролизуются до исходного (I), формальдегида и амина [13]. Хотя пути превращения циклоаддукта (III) в исходное соединение (I) не выяснены, можно предположить, что одним из продуктов гидролитического расщепления циклоаддукта (III) будет гидроксиметильное производное (IV). Если это так, то первоначально образующийся высоколабильный продукт модификации poly(A)-HCHO-Gly уже в условиях реакции может превращаться в N-гидроксиметилированную poly(A) (типа IV). Альтернативный путь реакций, приводящих к продукту (IV) непосредственно через промежуточное соединение (II), менее вероятен, так как в присутствии вторичного амина N-метилглицина, для которого невозможна структура (III), скорость образования poly(A)-HCHO такая же, как и при действии одного формальдегида. Однако конкретный механизм рассматриваемых реакций нуждается в дальнейшем изучении.

Представленные данные об аминокислотном катализе реакции N-гидроксиметилирования poly(A) позволяют понять, почему модификация ДНК при действии смеси формальдегида и первичного амина в сравнении с обработкой одним формальдегидом приводит к большему и специфическому понижению уровня матричной активности в РНК-полимеразной системе [5]. Можно полагать, что описанная каталитическая реакция играет важную роль в проявлении эффектов, наблюдаемых при обработке ДНК и РНК формальдегидом в присутствии аминокислотных соединений, а также при действии формальдегида на целые клетки. В пользу последнего служат данные работы [9].

### Экспериментальная часть

В работе использовали poly(A), poly(G) и poly(C) (Serva, ФРГ), формальдегид (Merck, ФРГ), аминокислоты (ICN Pharmaceuticals, США), радиоактивные препараты В/О «Изотоп» (СССР).

*Модификацию полинуклеотидов* в концентрации 0,5–2 мг/мл проводили обработкой [<sup>14</sup>C]HCHO или смесью [<sup>14</sup>C]HCHO с [<sup>3</sup>H]аминокислотой (везде концентрации HCHO и аминокислоты 0,3 и 0,1 М соответственно) при 20° С в 0,1 М Na-фосфатном буфере и 0,4 М NaCl при pH 6,0. Во всех опытах радиоактивный препарат разбавляли холодными образцами так, чтобы удельная активность [<sup>3</sup>H]аминокислоты в 5–10 раз превышала удельную активность [<sup>14</sup>C]HCHO.

Не связавшиеся с полинуклеотидом реагенты удаляли низкоскоростным центрифугированием через слой сефадекса G-50 (Pharmacia, Швеция) по модифицированному методу [15]. Повышение ионной силы раствора добавлением NaCl создавали с целью количественного элюирования полинуклеотида (в отсутствие соли потери нуклеотида составляли 50% и более). Однократное центрифугирование пробы, не содержащей полинуклеотида, приводило к снижению концентраций формальдегида и аминокислоты в  $1 \cdot 10^4$  и  $3 \cdot 10^3$  раз соответственно. При изучении кинетики «прямых» реакций модификации центрифугирование аликвоты проводили дважды при общем времени обработки 5 мин. За кинетикой элиминирования радиоактивной метки из приготовленного таким образом образца следили при выдерживании последнего в течение требуемого времени при 20 или 50° С, используя однократное центрифугирование.

Концентрацию нуклеотидов в элюате после центрифугирования определяли спектрофотометрически после гидролиза полинуклеотида в 5% HClO<sub>4</sub> (100° С, 20 мин). Радиоактивность измеряли в растворе диоксанового сцинтиллятора на жидкостном сцинтилляционном счетчике LKB RackBeta 1217 по программе счета двойной метки <sup>3</sup>H и <sup>14</sup>C. Используемые концентрации полинуклеотидов и уровень удельной активности [<sup>14</sup>C]НСНО и [<sup>3</sup>H]аминокислоты давали возможность определить присутствие одной молекулы формальдегида или аминокислоты на 1000 нуклеотидов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Siomin Yu. A., Simonov V. V., Poverenny A. M.* // Biochim. et biophys. acta. 1973. V. 331. P. 27—32.
2. *Семин Ю. А., Симонов В. В., Поверенный А. М.* // Докл. АН СССР. 1973. Т. 208. № 6. С. 1480—1483.
3. *Семин Ю. А., Коломыйцева Е. Н., Поверенный А. М.* // Биоорган. химия. 1975. Т. 1. № 3. С. 317—327.
4. *Sverdlov E. D., Monastyrskaya G. S., Poverenny A. M., Siomin Yu. A., Kolomitseva E. N.* // FEBS Lett. 1979. V. 108. № 2. P. 427—429.
5. *Протасова И. А., Адлер В. В., Поверенный А. М.* // Биохимия. 1982. Т. 12. Вып. 11. С. 1778—1784.
6. *McGhee J. D., von Hippel P. H.* // Biochemistry. 1975. V. 14. № 6. P. 1281—1296.
7. *McGhee J. D., von Hippel P. H.* // Biochemistry. 1975. V. 14. № 6. P. 1297—1303.
8. *McGhee J. D., von Hippel P. H.* // Biochemistry. 1977. V. 16. № 15. P. 3267—3276.
9. *Beland F. A., Fullerton N. F., Heflich R. H.* // J. Chromatogr. 1984. V. 308. P. 121—131.
10. *Хулордава К. Г., Косаганов Ю. Н., Лазуркин Ю. С.* // Молекуляр. биология. 1978. Т. 12. Вып. 6. С. 1390—1407.
11. *Шепелев Б. А., Косаганов Ю. Н., Лазуркин Ю. С.* // Биоорган. химия. 1982. Т. 8. № 5. С. 686—693.
12. *Волков В. С., Поверенный А. М., Свердлов Е. Д.* // Молекуляр. биология. 1983. Т. 17. Вып. 6. С. 1318—1327.
13. *Волков В. С., Поверенный А. М., Свердлов Е. Д.* // Молекуляр. биология. 1985. Т. 19. Вып. 3. С. 693—702.
14. *Волков В. С., Поверенный А. М., Свердлов Е. Д.* // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 2. С. 204—212.
15. *Neal N. W., Florini J. R.* // Anal. Biochem. 1973. V. 55. № 1. P. 328—330.

Поступила в редакцию  
16.VII.1986

#### AMINO ACIDS AS CATALYSTS IN BINDING REACTION OF FORMALDEHYDE WITH ADENINE RESIDUES OF POLYADENILIC ACID

VOLKOV V. S., IVANOVA G. A., POVERENNY A. M., SVERDLOV E. D.\*

*Institute of Medical Radiology, Academy of Medical Sciences of the USSR, Obninsk, Kaluga Region;*

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

Binding of formaldehyde and amino acids (Gly, Lys and Leu) with poly(A), poly(G), and poly(C) has been investigated in comparison with treatment with formaldehyde alone. It was found that in the case of poly(A) amino acids were found to catalyze the N-hydroxymethylation reaction on exocyclic amino groups of adenine. For example, at 20° C and pH 6,0 the rate of this reaction increased about 10 fold in the presence of glycine.