



УДК 547.963.32

ИССЛЕДОВАНИЕ РЕАКЦИЙ НИТРОЗОМЕТИЛМОЧЕВИНЫ
С ГОМОПОЛИНУКЛЕОТИДАМИ

Серебряный А. М., Тутлите В. С., Славенас И. Ю.

Институт химической физики Академии наук СССР, Москва,
Институт ботаники Академии наук Литовской ССР, Вильнюс

Исследовано взаимодействие полицитидиловой, полиуридилловой и полиадениловой кислот с N-нитрозо-N-метилмочевинной. Показано, что основными типами реакций являются метилирование и карбамоилирование фосфатных групп полимера. Среди продуктов модификации гомополинуклеотидов по нуклеозидному фрагменту молекулы идентифицированы: 3-метилуридин (основной продукт), N⁴-карбамоилцитидин, 3-метил-N⁴-карбамоилцитидин, 3-метилцитидин (для полицитидиловой кислоты), 3-метилуридин (для полиуридилловой кислоты) и 1-, 3-, 7-метиладенозинны и 6-метиламинопуринрибозид (для полиадениловой кислоты). Высказано предположение, что при действии нитрозометилмочевинны на полиуридилловую и полицитидиловую кислоты возможно также образование 3-карбамоилпроизводных.

В настоящее время уникальные биохимические свойства N-нитрозо-N-алкилмочевин хорошо известны. Они являются мощными канцерогенами и мутагенами [1, 2]. В работах [3, 4] было показано, что соединения этого класса обладают противоопухолевой активностью, и в настоящее время N-нитрозо-N-метилмочевина (НММ) находит применение в клинической практике при лечении некоторых форм рака.

Реакции нитрозоалкилмочевин с нуклеиновыми кислотами как *in vivo*, так и *in vitro* не раз были объектами исследования. Подробно изучена их способность алкилировать РНК и ДНК. При метилировании нуклеиновых кислот нитрозометилмочевинной обнаружены те же продукты, что и при метилировании другими агентами, например метилметансульфонатом (обзор см. в работе [5]). В отличие от сульфоната нитрозометилмочевина реагирует не по S_N 2-, а по S_N 1-механизму, и действительной алкилирующей частицей в этом случае является метилкарбокатион, образующийся при гидролитическом распаде нитрозометилмочевинны [6]. Именно эта особенность механизма действия нитрозометилмочевинны, по мнению Лавли, и определяет специфичность ее биологического действия, обуславливая повышенный выход O⁶-метилгуанина, O⁴-метилтимина и триэфиров фосфатных групп [7, 8].

Предложено принципиально другое объяснение специфичности мутагенного действия нитрозоалкилмочевин, основанное на их способности осуществлять реакцию карбамоилирования, невозможную для сульфонатов [9]. При изучении реакции [¹⁴CO]НММ с ДНК был обнаружен перенос радиоактивной метки на ДНК [10], однако направление карбамоилирования установлено не было. Позднее из продуктов гидролиза карбамоилированной РНК удалось выделить N⁴-карбамоилцитидин [11]. Подробное изучение реакции нитрозоалкилмочевин с нуклеозидами по-

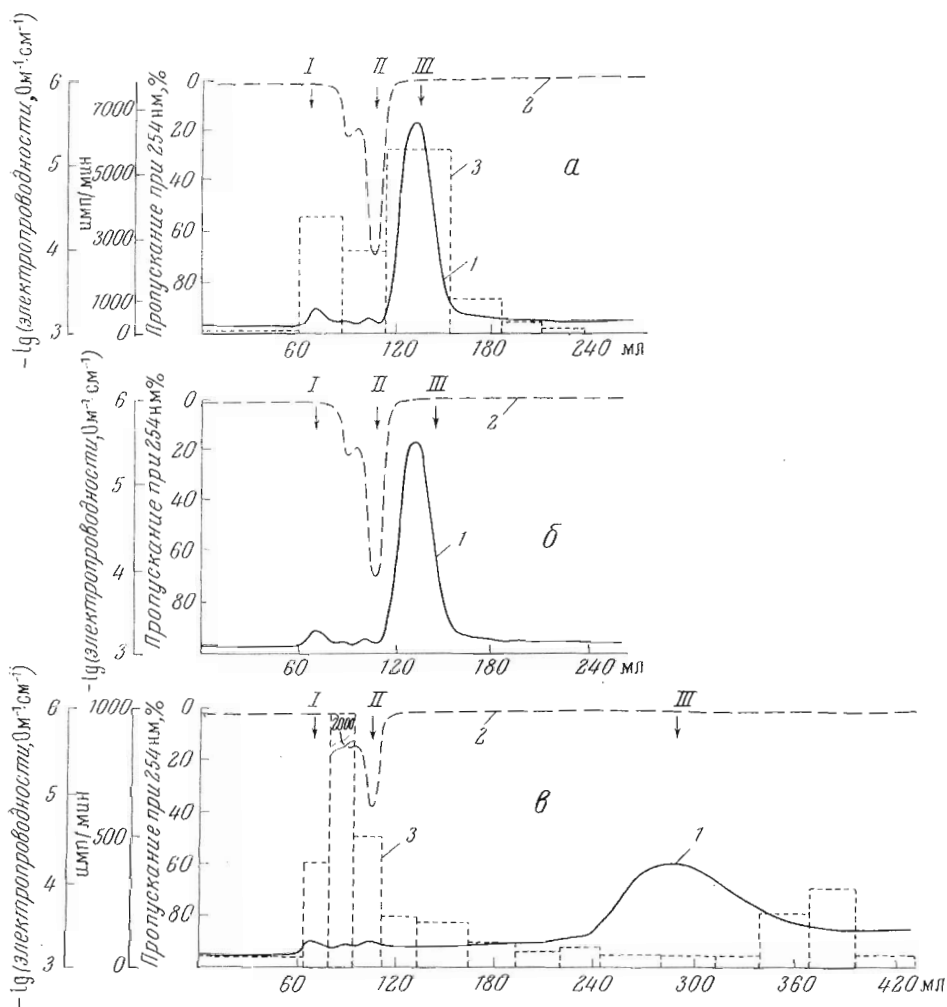


Рис. 1. Хроматография продуктов гидролиза экзонуклеазой А5 и щелочной фосфатазой, модифицированных с помощью ^{14}C О]НММ poly(C) (*a*), poly(U) (*б*) и poly(A) (*в*) на сефадексе G-10 (колонка $1,8 \times 90$ см, элюция водой со скоростью 60 мл/ч). 1 — пропускание, 2 — электропроводность, 3 — радиоактивность (величина, отложенная по оси ординат, соответствует радиоактивности, содержащейся во всей фракции). I — фермент, II — соли, III — фракция нуклеозидов. На рис. 1, б суммарная радиоактивность во фракциях фермента и солей 5500 имп/мин, радиоактивность во фракции нуклеозидов 5000 имп/мин

того, при модификации адениловой и уридилловой кислот нитромочевинной [16, 17] для первой были обнаружены два продукта карбамоилирования, а для уридилловой кислоты были получены шесть карбамоилированных производных. Так как основание и рибоза в уридилловой кислоте могут предоставить максимально пять мест для введения карбамоильной группы (N^3 , O^2 , O^4 , $2'$ - и $3'$ -O-), возможно, что некоторые из описанных в работах [16, 17] веществ образовались в результате присоединения изоциановой кислоты к фосфатной группе.

Свойства модифицированных гомополинуклеотидов согласуются с предположением, что основным направлением карбамоилирования является присоединение изоциановой кислоты к межнуклеотидной фосфатной группе полимера (уравнение 1). Во-первых, степень карбамоилирования полимера не зависит от природы основания в нем (табл. 1) и равна 7—10 мо-

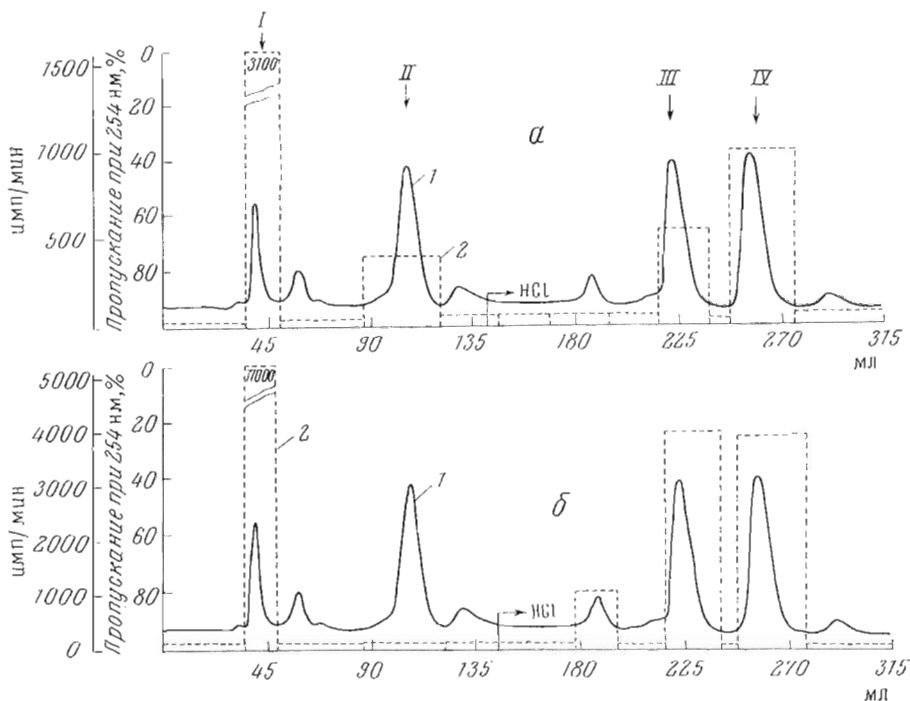


Рис. 2. Хроматография нуклеозидной фракции продуктов ферментативного гидролиза poly(C), модифицированной $[^{14}\text{C}]\text{HMM}$ (а) и $[^{14}\text{C}]\text{HMM}$ (б) на колонке с SE-целлюлозой (обменная емкость 0,22 мг-экв/г, $1,8 \times 18$ см, элюция водой 0,05 н. HCl со скоростью 45 мл/ч). I — пропускание, 2 — радиоактивность (величина, отложенная по оси ординат, соответствует радиоактивности, содержащейся во всей фракции). I — смесь «X» и 3-MeUrd, II — N^4 -карбамоилцитидин, III — 3-метил- N^4 -карбамоилцитидин, IV — Cyd, 3-MeCyd и предполагаемый 2'-O-карбамоилцитидин

лярным %*. Во-вторых, в нейтральной и щелочной среде (т. е. в условиях, когда карбамоилированные основания стабильны) карбамоилированный полимер постепенно гидролизует и, как показывает качественная проба с семикарбазидом [18], при гидролизе отщепляется цианат-ион, а часть радиоактивности выделяется в виде $^{14}\text{CO}_2$. Такое поведение модифицированного полинуклеотида вполне соответствует тому, что мы могли бы предположить для него по аналогии со свойствами карбамоилфосфата [19]. В-третьих, после ферментативного гидролиза полинуклеотидов, модифицированных $[^{14}\text{C}]\text{HMM}$, в условиях, обеспечивающих стабильность карбамоилированных нуклеозидов, в нуклеозидной фракции продуктов гидролиза остается лишь небольшая часть радиоактивности, содержащейся в модифицированном гомополинуклеотиде. Приведенные факты, на наш взгляд, убедительно показывают способность нитрозометилмочевинны карбамоилировать межнуклеотидную фосфатную группу в полинуклеотидах.

Как указывалось выше [7, 8], метилирование полинуклеотидов нитрозометилмочевинной протекает по двум направлениям: с образованием алкилированных оснований и триэфиров фосфорной кислоты. Из наших данных следует, что последнее направление реакции преобладает: после ферментативного гидролиза метилированных гомополинуклеотидов, модифицированных $[^{14}\text{C}]\text{HMM}$, большая часть ^{14}C -метки оказывается не связанной с нуклеозидами и при хроматографии на сефадексе G-10 выходит во фракции солей, по-видимому, в виде метилфосфата.

* Под молярным % понимается отношение числа молей продукта реакции к числу молей исходного вещества, умноженное на 100.

Для установления строения карбамоилированных (или метилированных) оснований в модифицированном полинуклеотиде полимер гидролизовали экзонуклеазой А5 и щелочной фосфатазой при рН 9. Образовавшиеся нуклеозиды отделяли от солей и ферментов хроматографией на сефадексе G-10 (рис. 1) и анализировали.

Наиболее удобным методом обнаружения карбамоилированных нуклеозидов в присутствии большого количества исходного нуклеозида оказался метод ионообменной хроматографии на SE-целлюлозе. Носителями и одновременно свидетелями при хроматографии были продукты, образующиеся при действии «холодной» нитрозометилмочевины на цитидин и аденозин. Строение их было установлено ранее [13]. При каждом хроматографическом разделении продуктов гидролиза модифицированного гомополинуклеотида использовали свежеприготовленную смесь свидетелей. Результаты хроматографии продуктов гидролиза модифицированной poly(C) и распределение ^{14}CO - и $^{14}\text{CH}_3$ -метки во фракциях приведены на рис. 2.

Видно, что в обоих случаях (рис. 2, а, б) большая часть метки обнаруживается в первой фракции (пик I). Рехроматографией этих фракций на бумаге было показано, что основными их компонентами в обоих случаях являются продукты, подвижность которых на бумаге совпадает с подвижностью продуктов гидролиза меченой нитрозометилмочевины. Детально строение их мы не выясняли; было установлено лишь, что основной их компонент устойчив к гидролизу в 0,1 н. HCl при 100° в течение часа. Однако из общих соображений следует, что этими продуктами могут быть соли циановой и карбаминовой кислот, мочевины [20], циануровая кислота, обозначенные далее как смесь «X».

Используемая в работе методика предусматривает удаление непрореагировавшей нитрозометилмочевины и продуктов ее гидролиза хроматографией на сефадексе G-25 сразу на первой стадии анализа. Появление некоторых из этих веществ на более поздней стадии анализа означает, что даже в таких мягких условиях, как ферментативный гидролиз при рН 9 и 37°, имеет место распад модифицированных звеньев, например карбамилфосфатных или каких-то других нестабильных звеньев неизвестного строения. В пользу последнего предположения говорит факт появления на некоторых хроматограммах радиоактивного вещества (^{14}CO -метка) с R_f 0,37 (система Б), отличающимся от R_f других продуктов реакции. Возможные предположения о строении этого вещества будут изложены ниже.

Часть $^{14}\text{CH}_3$ -метки, обнаруживающейся в первом пике (рис. 2, б), принадлежит 3-метилуридину. Выход его оказался равным 0,19 молярных % и превышал выход любого другого метилированного продукта этой реакции (табл. 2). Полученный результат вполне соответствует результатам исследования реакции нитрозометилмочевины с цитидином [12], но противоречит данным Лавли и Шаха [15], которые нашли, что среди метилированных продуктов гидролиза poly(C), модифицированной нитрозометилмочевинной, доля 3-метилуридина равна 1%, т. е. существенно меньше найденной нами. Ясно, что 3-метилуридин не возникает за счет метилирования уридиновых звеньев, могущих присутствовать в poly(C), так как при реакции с poly(C) его возникает больше, чем при действии нитрозометилмочевины на poly(U).

Чтобы исключить предположение об образовании 3-метилуридина в результате гидролиза 3-метилцитидина во время анализа, провели реакцию цитидина с $^{14}\text{CH}_3$ ПММ по методике работы [12]. Одну часть реакционной массы сразу хроматографировали на SE-целлюлозе, другую подвергли обработке ферментами так, как обрабатывается модифицированная poly(C), после чего ее также хроматографировали на SE-целлюлозе. При этом существенных различий в профиле элюции и распределении радиоактивности по фракциям в опытах обнаружено не было. Этот результат показывает,

**Продукты модификации полицитидиловой кислоты
по основаниям**

Продукт	Выход *, молярные %
3-Метилуридин	0,19
N ⁴ -Карбамоилцитидин	0,03
3-Метил-N ⁴ -карбамоилцитидин	0,08
3-Метилцитидин	0,10
Неизвестный продукт, предположительно 2-О-карбамоилцитидин	0,09

* Рассчитано по величине радиоактивности, элюированной с колонки с SE-целлюлозой.

что преобладание 3-метилуридина в смеси продуктов гидролиза модифицированной poly(C) не есть следствие дезаминирования 3-метилцитидина во время гидролиза полимера. Вероятно, 3-метилуридин образуется в результате гидролиза 3-метил-N⁴-карбамоилцитидиновых звеньев [13].

Как видно из рис. 2, остальная часть ¹⁴CO-метки, содержащейся в модифицированной poly(C), обнаруживается в пиках N⁴-карбамоилцитидина, 3-метил-N⁴-карбамоилцитидина и цитидина (пики II, III и IV соответственно). Последующая рехроматография на бумаге подтверждает идентичность радиоактивных веществ, содержащихся в этих фракциях, соответствующим свидетелям. Эти результаты доказывают способность нитрозометилмочевины карбамоилировать основания в poly(C).

Выходы модифицированных нуклеозидов — продуктов реакции poly(C) с нитрозометилмочевинной суммированы в табл. 2.

Для понимания природы ¹⁴CO-меченого вещества, хроматографически идентичного цитидину, существенно, что аналогичное соединение приблизительно в том же количестве обнаружено среди продуктов гидролиза poly(A), модифицированной [¹⁴CO] НММ (рис. 3, б). В этом случае радиоактивное вещество хроматографически идентично аденозину (см. ниже).

Наиболее правдоподобным объяснением появления этих продуктов может служить предположение, что нитрозометилмочевина карбамоилирует 2'-оксигруппу в полинуклеотиде, тем более что для N-нитрозо-N,N'-диметилмочевины эта возможность предполагалась и раньше [13]. Мы полагаем поэтому, что вещество, элюируемое с SE-целлюлозы вместе с цитидином, является 2'-О-карбамоилцитидином. По-видимому, наличия 2'-О-карбамоильной группы недостаточно, чтобы сделать различными хроматографические свойства 2'-О-карбамоилцитидина и цитидина в использованных системах.

Аналогичным образом было проанализировано распределение ¹⁴CO-метки в модифицированной poly(A) (рис. 3, б). В противоположность цитозину аденин в цепи гомополинуклеотида карбамоилируется незначительно (рис. 3, б). При хроматографии на SE-целлюлозе продуктов гидролиза модифицированной poly(A) основная часть ¹⁴CO-радиоактивности обнаруживается во фракциях, соответствующих свободному объему колонки (смесь «X», пик I) и аденозину (по-видимому, 2'-О-карбамоиладенозин, пик II, см. выше).

Строение метилированных оснований в модифицированной poly(A) было установлено с помощью гидролиза 70%-ной хлорной кислотой и последующей хроматографии на дауэксе 50 W × 4 по Лавли и Шаху [15], а также гидролизом экзонуклеазой A5 и щелочной фосфатазой до нуклеозидов с последующей хроматографией на SE-целлюлозе (рис. 3, а) и бумаге. Оба метода дали в основном совпадающие результаты. При этом обнаружены 1-метиладенин, 7-метиладенин, 3-метиладенин и 6-метил-

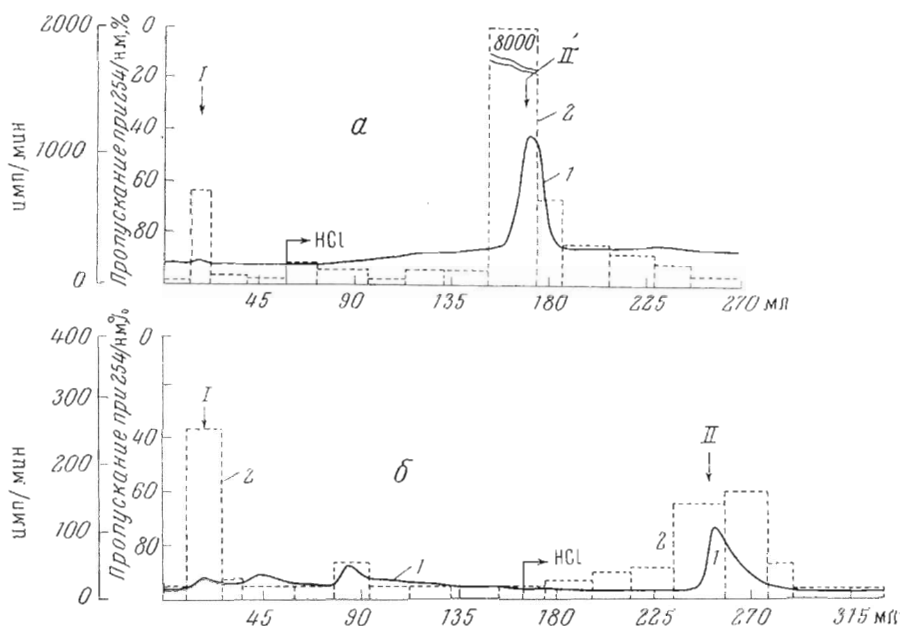


Рис. 3. Хроматография нуклеозидов — продуктов ферментативного гидролиза poly(A), модифицированной $[^{14}\text{CH}_3]\text{HMM}$ (а) и $[^{14}\text{CO}]\text{HMM}$ (б) на колонке с SE-целлюлозой (а — обменная емкость 0,17 мг-экв/г, $1,8 \times 40$ см; б — обменная емкость 0,22 мг-экв/г, $1,8 \times 18$ см. (В обоих случаях элюция водой и 0,05 н. HCl со скоростью 45 мл/ч.) I — пропускание, 2 — радиоактивность (величина, отложенная на оси ординат, соответствует радиоактивности, содержащейся во всей фракции). I — смесь «X», II — Ado, MeAdo и предполагаемый 2'-O-карбамоиладенозин

аминопурины. Однако, по нашим данным, при хроматографии на дауэксе доля радиоактивности, содержащаяся во фракциях метилированных оснований, составляет лишь 23% общей радиоактивности, обнаруживаемой в элюате (Лавли и Шах приводят величину 75% [15]); остальная часть радиоактивности почти не сорбируется колонкой и выходит с ее свободным объемом, по-видимому, в виде метилфосфата [21].

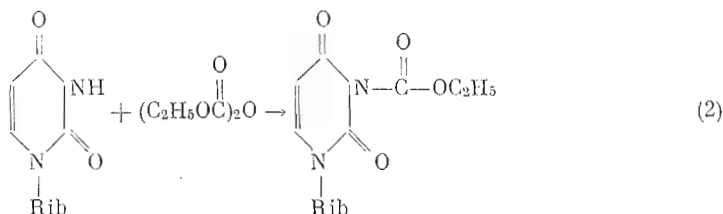
Продукты гидролиза модифицированной poly(U) были проанализированы с помощью хроматографии на сефадексе G-10 (рис. 1, б) с последующей хроматографией на бумаге. Степень метилирования poly(U) по нуклеозидной части полимера, рассчитанная по величине радиоактивности, элюируемой с сефадекса с нуклеозидной фракцией продуктов гидролиза, равна 0,20 молярных %. Среди этих продуктов идентифицирован 3-метилуридин, выход которого равен 0,05 молярных %, что полностью подтверждает данные Лавли и Шаха [15].

Как уже говорилось, при изучении продуктов реакции уридина и тимидина с нитрозометилмочевинной были обнаружены только продукты метилирования [13]. В наших исследованиях после ферментативного гидролиза poly(U), модифицированной с помощью $[^{14}\text{CO}]\text{HMM}$, и отделения ферментов и солей фракция уридина содержала радиоактивные примеси (рис. 1, б, пик III). Изучение природы радиоактивных продуктов методом БХ показало, что основная их часть по хроматографической подвижности идентична продуктам гидролиза нитрозометилмочевинной, а остальная часть (в системе Б) хроматографически идентична уридину. Этот факт по аналогии с карбамоилированием poly(A) и poly(C) мы объяснили образованием 2'-карбамоилпроизводного poly(U).

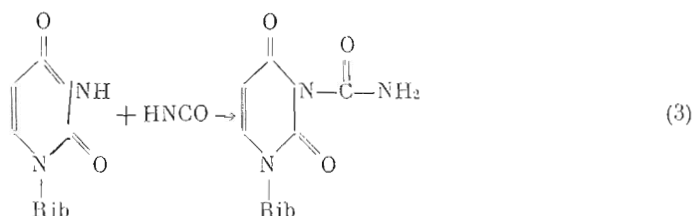
Чрезвычайно интересен вопрос о природе продукта «X», обнаруживаемого в этом случае. Поскольку количество вещества «X» среди продуктов ферментативного гидролиза карбамоилированных poly(C) и poly(U)

(около $2 \cdot 10^{-3}$ моль/моль нуклеотида) существенно больше, чем среди продуктов гидролиза карбамоилированной poly(A) ($0,7 \cdot 10^{-3}$ моль/моль нуклеотида), можно утверждать, что в составе модифицированных poly(U) и poly(C) имеется карбамоилированное звено, которое во время ферментативного гидролиза в щелочной среде гидролизуется с образованием продуктов «X». Строение этого звена можно предположить исходя из следующих соображений.

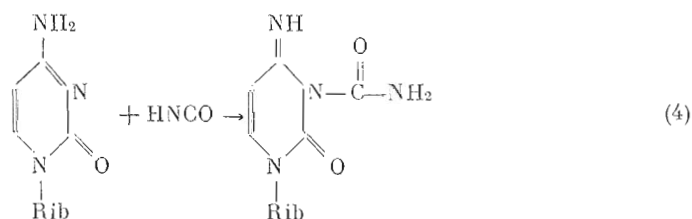
При исследовании реакций уридина и тимидина с диэтилпирокарбонатом было показано, что в результате реакции образуются нестойкие в щелочной среде 3-производные [22]:



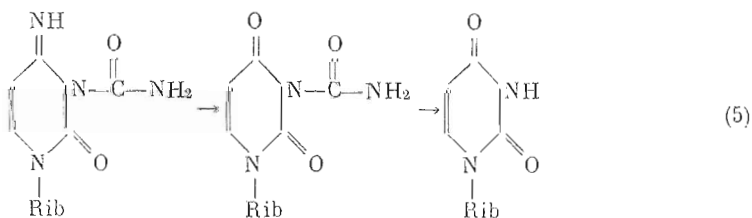
Возможно, что аналогично присоединяется и изоциановая кислота, образующаяся при распаде нитрозометилмочевины:



Подобно 3-карбозтоксипроизводным, 3-карбамоилпроизводные, по-видимому, нестабильны в щелочной среде и распадаются на уридин и продукт «X». Вполне вероятно, что неизвестный радиоактивный продукт гидролиза [^{14}C O] poly(C) (пик I, рис. 2, а) является 3-карбамоилцитидином:



Это соединение, гидролизуясь, может образовать вначале 3-карбамоилуридин, а затем уридин:



Вполне вероятно, что общий продукт карбамоилирования уридиловой и цитидиловой кислоты нитрозометилмочевиной, описанный А. Е. Бедняком [17], является именно 3-карбамоилуридиловой кислотой.

Таким образом, проведенное исследование убедительно доказало способность нитрозометилмочевины карбамоилировать полинуклеотиды с образованием карбамоилфосфатных звеньев (до 99% от общего выхода карбамоилированных продуктов, ср. табл. 1 и 2).

Биологические последствия образования этих, а также и 2'-О-карбамоилированных звеньев сейчас предсказать трудно. Однако недавно было показано, что модификация дезоксирибонуклеопротеида нитрозометилмочевинной или изоцианатом калия приводит к потере его стабильности и диссоциации на ДНК и белок [23]. Несомненно, что одной из основных причин диссоциации является карбамоилирование фосфатных групп.

Из исследованных оснований в наибольшей степени модифицируется цитозин, и хотя основной продукт модификации цитидина, 3-метилуридин, не несет карбамоильной группы, образование его несомненно обусловлено одновременным протеканием реакций метилирования и карбамоилирования.

Генетические последствия замены цитидина на 3-метилуридин трудно переоценить, ибо в отличие от цитидина 3-метилуридин не способен образовывать канонические уотсон-криковские пары. То же самое относится и к N⁴-карбамоилцитидину и 3-метилцитидину. Известно, что образованием O⁶-метилгуаниновых и 3-метилцитидиновых звеньев, неспособных к комплементарному взаимодействию, объясняется возникновение биологических эффектов при действии алкилирующих веществ. Мы считаем, что при корреляции этих эффектов и химических изменений, вызываемых действием нитрозалкилмочевин, необходимо учитывать также реакцию карбамоилирования.

Экспериментальная часть

В работе использовали poly(C) СКТБ БАВ (Новосибирск); нуклеозиды, poly(A) и poly(U) фирмы «Reanal» (Венгрия). 1-Метиладенозин и 1-метиладенин синтезировали согласно работе [24], N⁶-метиладенин — по [25], 3-метилуридин — по [26], НММ, [¹⁴CH₃] НММ и [¹⁴CO] НММ — согласно работе [27] из хлоргидрата метиламина и мочевины (соответственно из ¹⁴CH₃NH₂HCl и ¹⁴CO(NH₂)₂ (фирмы «Изотоп», СССР). Удельную радиоактивность НММ определяли следующим образом: навеску нитрозометилмочевины (0,2—0,5 мг) растворяли в 5 мл ацетона, 0,3 мл полученного раствора смешивали с 10 мл толуольного сцинтиллятора и просчитывали. Эффективность счета ~ 90%. Уд. рад. [¹⁴CO] НММ 100—150 мКимоль, [¹⁴CH₃] НММ ~ 350 мКимоль.

Экзонуклеаза А5 (КФ 3.1.4.1) выделена нами из *Act. coelicolor* А5 [28]. Использована щелочная фосфатаза из кишок цыплят фирмы «Reanal» (Венгрия).

Хроматографию проводили на SE-целлюлозе с обменной емкостью 0,22 и 0,17 мг-экв/г фирмы «Serva» (ФРГ) и на бумаге ватман 1 и 2 (Англия). Гель-фильтрацию проводили на сефадексе G-25 и G-10 фирмы «Pharmacia» (Швеция). Системы растворителей для нисходящей ВХ *n*-бутанол — вода, 86 : 14 (А), *n*-пропанол — вода — конц. аммиак, 6 : 1 : 3 (Б), метанол — конц. HCl — вода, 7 : 2 : 1 (В), *n*-бутанол, насыщенный водой, — конц. аммиак, 100 : 1 (Г).

Для измерения содержания радиоактивных веществ во фракциях к аликвоте раствора добавляли диоксановый сцинтиллятор и просчитывали. Эффективность счета нейтральных водных растворов — 65%, фракций, содержащих HCl, — 50%. Бумажные хроматограммы просчитывали в толуольном сцинтилляторе.

Радиоактивность измеряли на сцинтилляционном счетчике Марк II фирмы «Nuclear Chicago» (США). Для обнаружения веществ в элюате с колонок и регистрации электропроводности использовали проточный денситометр марки РЭЛПС (ЦКБ АМН СССР), λ 254 нм.

УФ-спектры снимали на спектрофотометре СФД-2. Значения молярных коэффициентов экстинкции взяты из работы [29].

Определение концентрации гомополинуклеотидов. К 0,5 мл раствора poly(C) добавляли 1 мл 3 н. HCl, выдерживали 1 мин при 60° и затем 24 ч при комнатной температуре [30]. Концентрацию образовавшейся цитидиловой кислоты определяли спектрофотометрически. Аналогично определяли концентрацию poly(U). Чтобы установить концентрацию poly(A), ее гидролизовали 1 н. HCl при 100° в течение 1 ч и затем спектрофотометрически определяли концентрацию аденина. Концентрацию всех гомополинуклеотидов выражали в молях нуклеотида.

Реакция гомополинуклеотидов с нитрозометилмочевинной. К 5 мл раствора poly(C) в 0,1 М фосфатном буфере, pH 7,0 ($9,4 \cdot 10^{-6}$ моль нуклеотидов) добавляли 36,4 мг ($3,53 \cdot 10^{-4}$ моль) [^{14}CO]НММ или [$^{14}\text{CH}_3$]НММ и инкубировали 24 ч при 37°. Затем смесь фильтровали на колонке с сефадексом G-25 ($2,4 \times 49$ см), элюировали poly(C) водой, упаривали на роторном испарителе при 40° и 15 мм рт. ст. до ~ 2 мл и определяли ее радиоактивность.

Реакцию poly(U) и poly(A) с НММ проводили аналогично, за исключением того, что в реакцию брали $1,1 \cdot 10^{-5}$ и $7,4 \cdot 10^{-6}$ моль нуклеотидов и $3,53 \cdot 10^{-4}$ и $1,8 \cdot 10^{-4}$ моль нитрозометилмочевинны соответственно.

Гидролиз гомополинуклеотидов. К ~ 2 мл раствора модифицированного гомополинуклеотида прибавляли равный объем 0,1 М трис-HCl буфера (pH 9), Mg^{2+} до концентрации 10^{-3} М и 700—760 единиц экзонуклеазы А5, смесь инкубировали 2 ч при 37°, добавляли 10 мг щелочной фосфатазы и продолжали инкубацию еще 1 ч. Затем инкубационную массу центрифугировали (3000 об/мин) от твердой фракции, внесенной вместе с щелочной фосфатазой, и супернатант наносили на колонку с сефадексом G-10 ($1,8 \times 90$ см). Полученные вещества элюировали водой (рис. 1). Для определения количества CO_2 , выделяющегося во время гидролиза, через раствор продували аргон, который затем проходил через ловушку с 0,1 н. NaOH. По количеству радиоактивности, обнаруженной в NaOH после гидролиза, рассчитывали количество выделившегося $^{14}\text{CO}_2$.

Идентификация изоциановой кислоты. К 2 мл раствора модифицированной poly(U), полученным по вышеописанной методике, в результате действия [^{14}CO]НММ на poly(U) ($5,6 \cdot 10^{-6}$ моль, 26 700 имп/мин) прибавляли 0,1 мг хлоргидрата семикарбазида и смесь инкубировали при комнатной температуре. Выделяющийся $^{14}\text{CO}_2$ улавливали щелочью. Через 24 ч к реакционной массе добавляли твердый гидразиндикарбамид до образования суспензии, смесь перенесли в холодильник, а выделяющийся $^{14}\text{CO}_2$ продолжали улавливать той же порцией щелочи. Через 18 ч массу продували аргоном, осадок отфильтровывали через миллипорный фильтр, промывали насыщенным раствором гидразиндикарбамида и высушивали. Фильтрат собирали.

Радиоактивность в фильтрате 15 600 имп/мин, в щелочи — 8900, на фильтре — 3400 имп/мин.

Хроматографию нуклеозидов на SE-целлюлозе проводили так, как было описано ранее [12].

Свидетели получали при реакции цитидина или аденозина с НММ при 100° по [12] и реакционную массу наносили на колонку с SE-целлюлозой с обменной емкостью 0,17 мг-экв/г. При промывке колонки водой исходный нуклеозид оставался сорбированным на колонке, а карбамоилированные нуклеозиды элюировались. Полученный раствор после концентрирования использовался как свидетель.

Авторы выражают искреннюю благодарность Т. Н. Львовой за помощь в выделении фермента и Л. А. Нейману за помощь в измерениях радиоактивности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Druckrey H., Preusman R., Schmäche D., Müller M. (1961) *Naturwissenschaften*, **48**, 165.
2. Рапопорт И. А. (1962) Докл. АН СССР, **146**, 1418—1421.
3. Эмануэль Н. М., Вермель Е. М., Рапопорт И. А., Кругляк С. А., Дрoвова Л. М., Островская Л. А. (1965) Докл. АН СССР, **163**, 483—486.
4. Вермель А. Е., Корман Н. П., Магагина Г. Е., Раевский И. Г. (1974) *Вопр. онкологии*, **20**, 8—13.
5. Васильева С. В., Серебряный А. М., Рапопорт И. А. (1973) *Генетика*, **9**, 80—84.
6. Kirmse W., Wächtershäuser G. (1967) *Libigs Ann. Chem.*, **707**, 44—56.
7. Shooter K. V., Howse R., Shah S. A., Lawley P. D. (1974) *Biochem. J.*, **137**, 303—312.
8. Lawley P. D., Orr D. J., Shah S. A., Farmer P. V., Jarman M. (1973) *Biochem. J.*, **135**, 193—201.
9. Серебряный А. М. (1972) в сб. Молекулярные механизмы генетических процессов (под ред. Н. П. Дубинина), с. 135—138, «Наука», М.
10. Серебряный А. М., Смотряева М. А., Круглякова К. Е., Костяновский Р. Г. (1969) Докл. АН СССР, **185**, 847—850.
11. Серебряный А. М., Тутлите В. С., Славенас И. Ю., Костяновский Р. Г. (1973) *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, 1189.
12. Serebryanyi A. M., Mnatsakanyan R. M. (1972) *FEBS Lett.*, **28**, 191—194.
13. Мнацакян Р. М. (1973) Канд. дис. «Исследование реакций нитрозоалкилмочевин с нуклеозидами», М.
14. Андросов В. В., Левашов В. С. (1974) Докл. АН СССР, **219**, 1475—1477.
15. Lawley P. D., Shah S. A. (1972) *Biochem. J.*, **128**, 117—132.
16. Бедняк А. Е., Гуськов В. Ф. (1973) Докл. АН СССР, **212**, 1451—1454.
17. Гуськов В. Ф., Бедняк А. Е. (1974) *Генетика*, **10**, 115—121.
18. Welcher F. J. (1948) *Organic analytical reagents*, vol. 2, p. 454, D. Van Nostrand Co., N. Y.
19. Allen Ch. M., Jr., Jones M. E. (1964) *Biochemistry*, **3**, 1238—1247.
20. Jones A. S., Warren I. H. (1970) *Tetrahedron*, **26**, 791—794.
21. O'Connor P. I., Margison G. P., Craig A. W. (1975) *Biochem. J.*, **145**, 475—482.
22. Vineze A., Henderson R. E. L., McDonald I. I., Leonard N. I. (1973) *J. Amer. Chem. Soc.*, **95**, 2677—2682.
23. Цейтлин П. И., Круглякова К. Е., Зоз Н. Н., Серебряный А. М., Горин А. И., Смотряева М. А., Рандалу К. Х., Аткиоюнайте В. К., Богданова В. С. (1975) Докл. АН СССР, **222**, 232—235.
24. Jones I. W., Robins R. K. (1963) *J. Amer. Chem. Soc.*, **85**, 193—201.
25. Brookes P., Lawley P. D. (1960) *J. Chem. Soc.*, 539—545.
26. Miles H. T. (1956) *Biochim. et biophys. acta*, **22**, 247—253.
27. Арндт Ф. (1949) в сб. Синтез органических препаратов (под ред. Б. А. Казанского), т. 2, с. 373—376, «Иностранная литература», М.
28. Tatarsskaja R. I., Lvova T. N., Abrossimova-Ameljanchik N. M., Korenjako A. I., Bayev A. A. (1970) *Eur. J. Biochem.*, **15**, 442—449.
29. Калишин Ф. Л., Лобов В. П., Жидков В. А. (1971) Справочник по биохимии, «Наукова думка», Киев.
30. Brown D. M., Phillips J. H. (1965) *J. Mol. Biol.*, **11**, 663—671.

Поступила в редакцию
31.X.1975

После переработки
26.I.1976

REACTION OF NITROSOMETHYLUREA WITH HOMOPOLYNUCLEOTIDES

SREBRYANY A. M., TUTLYTE V. S., SLAVENAS J. J.

*Institute of Chemical Physics, Academy of Sciences of
the USSR, Moscow; Institute of Botany, Academy
of Sciences of Lit.SSR, Vilnius*

The reaction of poly(C), poly(A) and poly(U) with N-nitroso-N-methylurea has been investigated. A degree of methylation was found to increase on passing from poly(U) to poly(A) and poly(C), whereas carbamylation of a polymer was independent of a particular base. It is suggested that the latter reaction proceeds primarily as carbamylation of phosphate groups. Among the reaction products were identified: 3-methyluridine (main constituent), 3-methylcytidine, N⁴-carbamylycytidine, and 3-methyl-N⁴-carbamylycytidine with poly(C); 3-methyluridine with poly(U), and 1-, 3-, 7-methyladenosine and 6-methylaminopurine riboside in the case of poly(A). The possibility of 3-carbamylyuridine and cytidine derivatives formation on nitrosomethylurea treatment is discussed.