

CYANOGEN BROMIDE FRAGMENTS OF *PENICILLIUM VITALE* CATALASE

*T. L. Levitina, N. M. Gusak, N. V. Rodnin, M. T. Kirilenko,
O. S. Miroshnichenko, S. A. Atepalikhina, L. V. Gudkova, E. A. Kozlov*
Institute of Molecular Biology and Genetics,
A. V. Palladin Institute of Biochemistry,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Summary

Nine fragments containing 387 amino acid residues were isolated from product of cyanogen bromide treatment of *P. vitale* catalase by Sephadex gel-filtration, ion-exchange chromatography, butanol extraction and high-voltage paper electrophoresis. Tryptic, chymotryptic peptides and N-terminal sequence of some *P. vitale* catalase cyanogen bromide fragments were investigated. Complete and partial amino acid sequences of fragments including 61 and 37 amino acid residues, respectively, were determined.

УДК 577.113.4

Ю. В. Пацковский, Т. П. Волощук, А. И. Потопальский

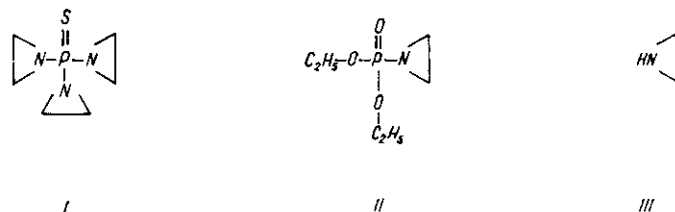
НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ РЕАКЦИИ ПОЛИНУКЛЕОТИДОВ С ТИОФОСФАМИДОМ

В работе проводили изучение направлений алкилирования нуклеиновых кислот противоопухолевым агентом тиофосфамидом, а также этиленимином и моноазиридиндиэтилфосфатом. Показано, что степень алкилирования гомополирибонуклеотидов определяется природой гетероциклических оснований в их составе, что свидетельствует о преимущественном алкилировании остатков азотистых оснований. Методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии выделены продукты алкилирования и показано, что алкилирование рибонуклеозидов в свободном виде и в составе полинуклеотидов производными этиленимина происходит в основном по N7 положению гуанозина, по N1 — аденозина и по N3 — пиримидиновых нуклеозидов. Уменьшение значений рН и ионной силы среды приводит к увеличению скорости алкилирования ДНК.

Введение. Тиофосфамид, или тиотэф,— трифункциональный алкилирующий агент, обладающий противоопухолевым действием [1]. Противоопухолевая активность обнаружена также у ДНК, алкилированной тиотэфом [2]. Предполагается, что биологическая активность тиотэфа, как и других электрофильных алкилирующих агентов, обусловлена его взаимодействием с клеточной ДНК [3]. Однако доказательства, полученные к настоящему времени, достаточно противоречивы и носят, в основном, косвенный характер. На примере реакции алкилирования этиленимином и тиотэфом мононуклеотидов показано, что алкилирование происходит в основном по остаткам фосфорной кислоты [4]. С другой стороны, результаты, полученные авторами работы [5], свидетельствуют об алкилировании метилированных аналогов оснований нуклеиновых кислот тиотэфом в водной среде. Изменение физико-химических свойств ДНК вследствие алкилирования (денатурация, фрагментация, изменение плотности отрицательного заряда, изменение спектральных характеристик) подтверждает возможность модификации нуклеофильных центров в ДНК [2, 6, 7]. Однако при этом неясно, какие нуклеофильные центры в составе нуклеиновых кислот и в каких условиях оказываются предпочтительными в реакции алкилирования — остатки гетероциклических оснований или остатки фосфорной кислоты. В связи с этим мы решили выяснить основные направления алкилирования нуклеозидов и полинуклеотидов производными этиленимина — тиотэфом и моноазиридиндиэтилфосфатом.

Материалы и методы. N,N',N''-триэтиленимид тиофосфорной кислоты (тиотэф, I) синтезирован по методу [8], моноэтиленимид диэтилового эфира фосфорной кислоты

(моноазириндиэтилфосфат, МЭФ, II) — по методу [9]. В работе также использовали этиленимин (ЭИ, III) отечественного производства, перегнанный перед употреблением.



Для алкилирования применяли также ^{35}S -тиотэф (ВО «Изотоп», Ленингр. отд-ние) с удельной активностью 190 ГБк/моль.

В работе использовали препарат ДНК тимуса теленка (НПО «Биолар», Олайне), предварительно очищали от примесей белка и РНК так, чтобы содержание основного вещества было не менее 98%. Молекулярная масса ДНК по данным электрофореза в агарозном геле — не менее $1 \cdot 10^7$, гиперхромный эффект при тепловой денатурации — 33%. Фрагментацию ДНК ультразвуком проводили на дезинтеграторе «MSE» (Англия) в течение 10 мин при 0°C (частота 22 кГц). Фрагменты, полученные при такой обработке, содержат в среднем 400—500 пар нуклеотидов.

В работе использовали также препараты гомополирибонуклеотидов фирмы «Serva» (ФРГ): поли(G), поли(A), поли(U) и поли(C) (кальевые соли) и препараты нуклеозидов фирмы «Reanal» (ВНР) — гуанозин, аденозин, цитидин и уридин.

Для алкилирования в водные растворы полинуклеотидов (1 мг/мл) вносили алкилирующие агенты в концентрации около 20 мМ. Смеси инкубировали 48 ч при температуре 37°C. Непрореагировавшие алкилирующие агенты удаляли экстракцией хлороформом. Оставшуюся смесь упаривали в вакууме водоструйного насоса и подвергали кислотному гидролизу (1 М HCl, 37°C, 48 ч). Аликвоты для анализа нейтрализовали 0,05 М натрий-фосфатным буфером (рН 7,0) и разделяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Для алкилирования нуклеозидов в их водно-этанольные растворы (объемное соотношение вода:спирт 1:1) с концентрацией около 25 мМ вносили алкилирующие агенты в той же концентрации и добавляли хлорную кислоту (1 М) до значений рН 6,0—6,5. Полученные смеси выдерживали 24 ч при температуре 37°C, а затем разделяли методом ВЭЖХ.

Разделение алкилированных нуклеозидов и продуктов гидролиза алкилированных полинуклеотидов проводили на системе ВЭЖХ фирмы «Bio-Rad» (США) с точным УФ-детектором типа «UV monitor model 1306» той же фирмы с использованием метода обращенно-фазовой ВЭЖХ (офВЭЖХ) на колонке Bio-Sil ODS-5S («Bio-Rad») размером 4×150 мм при скорости элюции 0,7 мл/мин и рабочем давлении 588 кПа в градиенте концентрации ацетонитрила (0—20%) на 0,05 М натрий-фосфатном буфере (рН 7,0). Спектры поглощения выделенных продуктов записывали на спектрофотометре «Specord UV VIS» («Karl Zeiss», ГДР), добавляя в растворы HCl или NaOH до значений рН соответственно 1 и 12.

Для определения кинетики включения тиотэфа в ДНК и полинуклеотиды в водные растворы последних (2,5 мМ NaCl, рН около 7,0, кроме отдельно указанных случаев) с концентрацией 1 мг/мл вносили ^{35}S -тиотэф (0,4 мБк, общий объем пробы 75 мкл). Пробы инкубировали при 37°C и через определенные промежутки времени аликвоты (по 10 или 15 мкл) разделяли колоночной хроматографией на сефадексе G-75 («Pharmacia», Швеция). Для этого использовали колонку размером 6×75 мм. Затем пробы элюировали 0,1 М раствором аммоний-бикарбоната (рН 8,0) со скоростью 2 мл/мин. Фракцию полинуклеотида собирали, полноту выхода контролировали спектрофотометрически. Для определения степени алкилирования пробы наносили на фильтры GF/C («Whatman», Англия), подсушивали на воздухе и измеряли радиоактивность в толуольном сцинтилляторе по каналу ^{14}C на счетчике радиоактивности «Intertechnique» (Франция).

Результаты и обсуждение. Для установления основных центров алкилирования нуклеиновых кислот мы изучили кинетику алкилирования тиотэфом различных гомополирибонуклеотидов. При этом исходили из того, что различия между полинуклеотидами касаются только структуры азотистых оснований, и если бы в реакцию вступали в основном межнуклеотидные фосфаты, то разница в степени алкилирова-

ния различных полинуклеотидов была бы незначительной. Однако в эксперименте обнаружено, что алкилирование полинуклеотидов происходит с разной скоростью, причем поли(G) алкилируется намного эффективнее других полинуклеотидов (рис. 1). Учитывая этот факт можно полагать, что в реакцию с тиотэфом вступают в основном остатки гетероциклических оснований и степень их алкилирования будет уменьшаться в ряду гуанин — аденин — цитозин — урацил.

Для того чтобы получить прямые доказательства алкилирования гетероциклических оснований в составе полинуклеотидов, мы провели кислотный гидролиз алкилированных препаратов и изучили их состав. Поскольку N-гликозидные связи в составе рибонуклеотидов и РНК достаточно устойчивы [10], то в результате кислотного гидролиза можно было ожидать об-

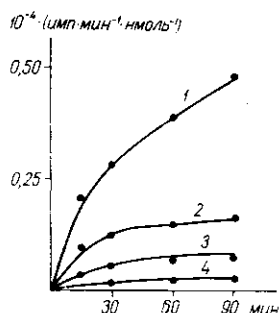


Рис. 1. Кинетика алкилирования полинуклеотидов ^{35}S -тиотэфом: 1 — поли(G); 2 — поли(A); 3 — поли(C); 4 — поли(U).

Fig. 1. Kinetics of the polynucleotides alkylation with ^{35}S -ThioTEPA. 1 — poly(G); 2 — poly(A); 3 — poly(C); 4 — poly(U).

разования пуриновых и пиримидиновых нуклеозидов. Поэтому для идентификации продуктов кислотного гидролиза алкилированных полинуклеотидов нами было проведено алкилирование соответствующих рибонуклеозидов. Для определения направлений алкилирования нуклеозидов мы сравнили УФ-спектры поглощения полученных нами продуктов с известными в литературе, основываясь на том, что спектральные характеристики алкилированных мономеров определяются преимущественно направлением алкилирования и практически не зависят от структуры алкильного радикала [11, 12]. На рис. 2 в качестве примера приведены результаты разделения продуктов алкилирования гуанозина и цитидина ЭИ и МЭФ. В результате изучения алкилирования гуанозина и дезоксигуанозина [13] было показано, что основным центром алкилирования является атом азота в положении 7 гетероцикла. Аналогичный результат мы получили в случае использования производных ЭИ — тиотэфа и МЭФ. Полученные продукты, подобно известным 7-алкилзамещенным производным гуанозина, оказались нестойкими в щелочной среде и разрушались с расщеплением имидазольного кольца, что сопровождалось изменением их спектральных характеристик. По-видимому, такое расщепление имело место уже в процессе алкилирования, поскольку нами выделены продукты, обладающие спектральными характеристиками, присущими алкилпроизводным пиримидинового ряда (рис. 2, а, таблица). Расщепления N-гликозидной связи, судя по отсутствию алкилированных оснований, при алкилировании гуанозина и других нуклеозидов в указанных условиях не наблюдалось. Цитидин, как и уридин, алкилировался преимущественно по N3 положению гетероцикла, аденозин — по N1 (таблица).

Фосфамидные связи алкилирующих агентов I и II относительно нестабильны в водных средах [14], поэтому при алкилировании тиотэфом и МЭФ наряду с ожидаемыми соединениями фосфоаминоэтилирования обнаруживаются продукты аминоэтилирования, аналогичные таковым в реакциях с ЭИ [5]. Соотношение этих продуктов изменяется в зависимости от условий проведения реакции и условий анализа выделенных препаратов из-за дальнейшего расщепления (гидролиза) фосфамидных связей в алкильных радикалах (рис. 2). Сопоставление результатов гидролиза алкилированных ДНК, полинуклеотидов и нуклеозидов выявляет наличие определенных аналогий в алкилировании остатков оснований в их составе. Различие состоит лишь в том, что в составе ДНК некоторые из наиболее реакционноспособных атомов азо-

та оснований принимают участие в образовании водородных связей (N1 пуринов и N3 пиримидинов), благодаря чему в ДНК алкилированию подвергаются в первую очередь N7 и N3 положения пуриновых и, в меньшей степени, N1 пуриновых и N3 пиримидиновых оснований (по мере денатурации алкилированной ДНК).

Характерной особенностью алкилирования ЭИ и его производными является наличие промежуточной стадии — образования относи-

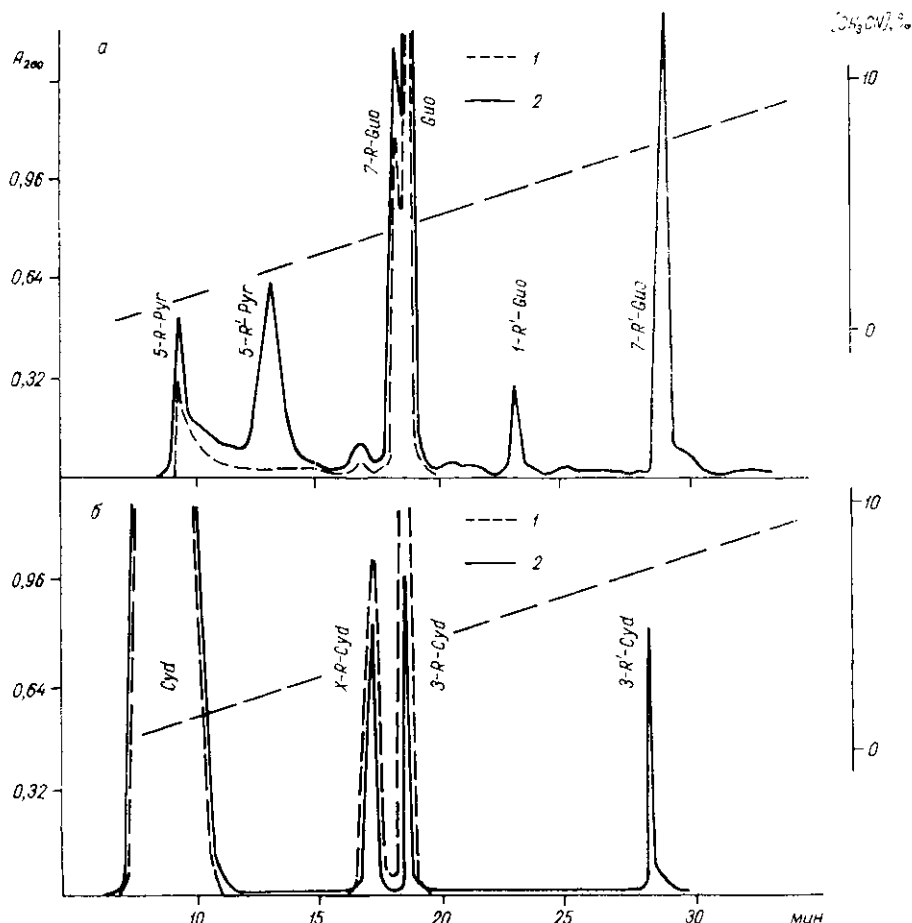


Рис. 2. ОФВЭЖХ продуктов алкилирования гуанозина (а) и цитидина (б) ЭИ (1) и МЭФ (2). Условия приведены в разделе «Материалы и методы»

Fig. 2. Separation of the products of guanosine (a) and cytidine (b) alkylation with ethylene imine (1) and monoaziridine diethyl phosphate (2) using Bio-Sil ODS-5S chromatography, phosphate-buffered (0.05 M) acetonitrile gradient (0-20 %). pH 7, elution rate — 0.7 ml/min., pressure — 80 atm.

тельно стабильного иммониевого катиона — протонированной формы алкилирующего агента [15]. Эта стадия отсутствует для других типов алкилирующих агентов, например для диметилсульфата. Поэтому в реакциях алкилирования, протекающих с участием иммониевого катиона, заметную роль играют электростатические эффекты [6]. Кроме того, имеет значение и величина pH среды. Эффективность алкилирования ДНК увеличивается с уменьшением значения pH (рис. 3, а). Напротив, увеличение ионной силы раствора (добавление в среду NaCl) уменьшает скорость алкилирования из-за конкурирующего влияния анионов среды. Этот эффект особенно заметен, начиная с концентрации NaCl 0,05 М. В растворе 1 М NaCl алкилирование ДНК практически не идет (рис. 3, б). Некоторые авторы указывают на возможность взаимодействия тютэфа с NaCl [14]. Cl-Анион в реакции с иммониевым катионом в определенных условиях действительно может высту-

Спектральные характеристики продуктов алкилирования нуклеозидов ЭИ и диэтилсульфатом (ДЭС)*
Spectral characteristics of products of the nucleosides alkylation with ethyleneimine and diethylsulfate

Направление алкилирования нуклеозида	Алкилирующий агент	рН	Длина волны поглощения, нм	
			λ_{max}	λ_{min}
Аденозин, N1	ДЭС	1	259	235
		12	261 (268, 300)	233
	ЭИ	1	263	236
		12	270 (263, 278, 300)	241
Гуанозин, N1	ДЭС	1	261 (272)	232
		12	258 (270)	239
	ЭИ	1	260 (273)	229
		12	256 (270)	236
Гуанозин, N7	ДЭС	1	258 (277)	238
		12	Разлагается	—
	ЭИ	1	258 (275)	234
		12	Разлагается	—
Гуанозин, N7 (с расщепленным имидазольным циклом)	ДЭС	1	271	—
		12	265	—
	ЭИ	1	272	242
		12	265	248
Цитидин, N3	ДЭС	1	280	247
		12	225, 267	212, 244
	ЭИ	1	281	245
		12	267	245
Уридин, N3	ДЭС	1	262	235
		12	264	237
	ЭИ	1	261	235
		12	262	238

* Данные взяты из работы [12].

пять в роли нуклеофила, приводя к образованию хлорэтиламинов. Так, при десятикратном (по отношению к тиотэфу) избытке NaCl зарегистрировано протекание реакции на 5—7%. При меньших концентрациях NaCl (0,1 М растворы) на скорость реакции тиотэфа с NaCl оказывает влияние рН раствора. Показано, что тиотэф, инкубированный в течение 1 ч при рН 8,0 с 1 М раствором NaCl, не теряет своей активности в реакциях с ДНК, в то время как такое же инкубирование при рН 6,0 приводит к снижению эффективности алкилирования ДНК почти вдвое (учитывалось время протекания реакции на 10%). Можно предположить, что в первом случае присоединения Cl-аниона к тиотэфу почти не происходит (pK_a тиотэфа 7,8), тогда как при рН 6,0 значительное количество иммониевого катиона расходуется на превращение в хлорэтиламины. Этим объясняется тот факт, что алкилирование нуклеиновых кислот производными ЭИ, в отличие от других алкилирующих агентов, в частности диалкилсульфатов, в забуференных растворах с высокой ионной силой протекает значительно медленнее.

Ранее показано, что денатурированная ДНК (дДНК) медленнее, чем нативная, алкилируется иммониевым катионом [16]. Та же зависимость сохраняется и при алкилировании высокомолекулярной дДНК тиотэфом (рис. 3, в, кривые 1 и 2). Однако разница в эффективности алкилирования становится несущественной для ДНК и дДНК, фрагментированных ультразвуком (рис. 3, в, кривые 3, 4). Очевидно, кроме влияния электростатических эффектов, причиной указанного различия может быть изменение конформации ДНК вследствие ее денатурации,

когда расплетенные нити ДНК могут сворачиваться в клубок таким образом, что наиболее гидрофобная часть молекулы — основание — оказывается внутри и поэтому недоступна для алкилирующего агента. Напротив, фрагментация дДНК, с одной стороны, препятствует сворачиванию молекулы, оставляя доступными нуклеофильные центры оснований, с другой — приводит к образованию дополнительных по сравнению с полимерной ДНК концевых фосфатов, способных алкилироваться.

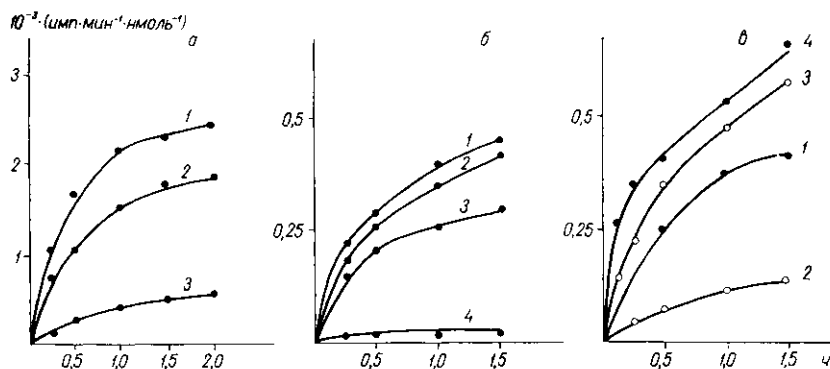


Рис. 3. Кинетика алкилирования ДНК ^{35}S -тиотэфом: а — влияние pH на скорость реакции (1 — pH 5,5; 2—6,0; 3—7,0); б — влияние различных концентраций NaCl на скорость реакции (1—0,01; 2—0,05; 3—0,1; 4—1,0 М NaCl); в — кинетика алкилирования высокомолекулярной ДНК (1, 2) и ДНК, фрагментированной ультразвуком (3, 4); 1, 3 — нативная ДНК, 2, 4 — денатурированная ДНК
 Fig. 3. Kinetics of DNA alkylation with ^{35}S -ThioTEPA: а — the influence of pH on the reaction rate (1 — pH 5,5; 2—6,0; 3—7,0); б — the influence of different NaCl concentrations on the reaction rate (1—0,01; 2—0,05; 3—0,1; 4—1,0 M NaCl); в — kinetics of alkylation of high-molecular DNA (1, 2) and DNA fragmented by ultrasound (3, 4); 1, 3 — native DNA, 2, 4 — denatured DNA.

Таким образом, при алкилировании нуклеиновых кислот ЭИ и его производными модификации подвергаются в основном остатки гетероциклических оснований. Представленные выше результаты противоречат представлению об образовании во время алкилирования триэфиров, т. е. об алкилировании межнуклеотидных фосфатов. Отличительной особенностью алкилирования производными ЭИ является увеличение скорости алкилирования полинуклеотидов в присутствии донора протонов и замедление реакции в присутствии солей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гиллер С. А., Лидак М. Ю., Лукевиц Э. Я. Химия противоопухолевых веществ // Химиотерапия злокачеств. опухолей.— М.: Медицина, 1977.— С. 10—60.
2. Структурно-функциональные особенности модифицированных нуклеиновых кислот / А. Д. Швед, А. И. Потопальский, А. П. Соломко и др. // Молекуляр. биология.— 1980.— Вып. 26.— С. 64—78.
3. Росс У. Биологические алкилирующие вещества.— М.: Медицина, 1964.— 260 с.
4. Строение продуктов модификации нуклеотидов и ДНК этиленимином и тиотэфом / А. М. Серебряный, Г. В. Андриевский, А. Р. Беккер и др. // Биоорг. химия.— 1987.— 13, № 6.— С. 757—764.
5. Масс-спектрометрическое исследование взаимодействия тиофосфамида с основаниями нуклеиновых кислот / Л. Ф. Суходуб, В. С. Шелковский, М. В. Косевич и др. // Докл. АН СССР.— 1985.— 283, № 3.— С. 714—716.
6. Взаимодействие ДНК с противоопухолевым препаратом тиофосфамидом / Т. Л. Пяттигорская, О. Ю. Жилкова, Л. М. Муравьева, Л. Ф. Суходуб // Молекуляр. биология.— 1986.— 20, № 2.— С. 423—429.
7. Степень алкилирования и физико-химические свойства модифицированных тиофосфамидом ДНК / Ю. В. Пацковский, В. Т. Соловьян, А. И. Потопальский, З. Ю. Ткачук // Молекуляр. биология.— 1984.— Вып. 37.— С. 44—50.
8. Лидак М. Ю., Гиллер С. А., Медне А. Я. К синтезу ТиоТЭФА // ТиоТЭФА.— Рига: Изд-во АН ЛатвССР, 1961.— С. 5—8.
9. Гречкин Н. П. Фосфорорганические производные этиленимина. Сообщ. 1. Взаимодействие этиленимина с хлорагидридами диалкилфосфорных кислот // Изв. АН СССР.— 1956.— № 5.— С. 538—543.

10. *Шабарова З. А., Богданов А. А.* Химия нуклеиновых кислот и их компонентов.— М.: Химия, 1978.—584 с.
11. *Singer B.* UV spectral characteristics and acidic dissociation constants of 280 alkyl bases, nucleosides, and nucleotides // Handbook of biochem. and mol. biol.— London: CRC press, 1986.— Vol. 1.— P. 409—447.
12. *Singer B.* The chemical effect of nucleic acid alkylation and their relation to mutagenesis and carcinogenesis // Progr. Nucl. Acid Res. and Mol. Biol.— 1975.— 15.— P. 219—280.
13. *Hemminki K., Ludlum D. V.* Covalent modification of DNA by neoplastic agents // J. Nat. Cancer Inst.— 1984.— 73, N 5.— P. 1021—1028.
14. *Изучение стабильности тиофосфамида в водных и водно-солевых растворах / Т. Л. Пятигорская, О. Ю. Жилкова, Н. М. Архангелова и др. // Хим.-фарм. журн.— 1984.— № 2.— С. 343—349.*
15. *Органическая химия нуклеиновых кислот / Н. К. Кочетков, Э. И. Будовский, Е. Д. Свердлов и др.— М.: Химия, 1970.—720 с.*
16. *Relative reactivities for monofunctional nitrogen mustard alkylation of nucleic acid components / C. C. Price, G. M. Gaucher, P. Koperu et al. // Biochim. et biophys. acta. — 1968.— 166, N 2.— P. 327—359.*

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР,
Киев

Получено 02.02.87

SOME PROPERTIES OF THE REACTION BETWEEN POLYNUCLEOTIDES AND THIOPHOSPHAMIDE

Yu. V. Patshovskiy, T. P. Voloshchuk, A. I. Potopalsky

Institute of Molecular Biology and Genetics,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Summary

The alkylation of ribonucleosides and polynucleotides with ethylene imine, monoaziridine, diethyl phosphate and antitumour agent thiophosphamide has been shown to change usually nucleobases residues. The preferential centres of the alkylation are nitrogen atoms in the positions 7 of guanosine, 1 of adenosine and 3 of pyrimidine nucleosides. The rate of DNA alkylation increases with a decrease of the ionic strength and pH and depends on the conformation and molecular mass of the molecules.

УДК 577.217.5:577.18.02

И. С. Гройман, А. П. Потапов

ИЗУЧЕНИЕ КОРРЕЛЯЦИИ МЕЖДУ ТОЧНОСТЬЮ ТРАНСЛЯЦИИ ПОЛИ(U) И ЭФФЕКТИВНОСТЬЮ ДЕКОДИРОВАНИЯ ПОЛИ(dT) В БЕСКЛЕТОЧНЫХ БЕЛОКСИНТЕЗИРУЮЩИХ СИСТЕМАХ ИЗ ESCHERICHIA COLI

С использованием бесклеточных белоксинтезирующих систем из изогенных штаммов E. coli, различающихся мутациями в рибосомном белке S12, продемонстрировано наличие положительной корреляции между неоднозначностью трансляции поли(U) и эффективностью трансляции ее дезоксирибоаналога поли(dT). Условия, вызывающие ошибки трансляции поли(U) — увеличение концентрации антибиотиков неомицина, канамицина, стрептомицина, ионов магния — стимулируют трансляцию поли(dT). Ряд активностей антибиотиков по стимулированию ошибочной трансляции поли(U) совпадает с рядом их активностей по стимулированию поли(dT)-зависимого синтеза полифенилаланина: неомицин > канамицин > стрептомицин. Более точные рибосомы с мутацией в белке S12 менее активны в трансляции поли(dT). Полученные данные хорошо соответствуют гипотезе о стереоспецифическом отборе кодон-антикодоновых комплексов на рибосоме.

Введение. Гипотеза стереоспецифической стабилизации кодон-антикодоновых комплексов постулирует прямое взаимодействие декодирующего центра рибосомы с сахарофосфатным остовом кодон-антикодонового дуплекса как с единым целым [1, 2]. Один из путей проверки этого