

И. А. РАПОПОРТ

## АЦЕТИЛИРОВАНИЕ ГЕННЫХ БЕЛКОВ И МУТАЦИИ

(Представлено академиком Л. А. Орбели 17 III 1947)

В более ранних сообщениях мы показали, что образование метиленовых и оксиметильных соединений при реакциях между генными белками и формальдегидом, а также реакция между этиловым эфиром карбаминовой кислоты и белками генной молекулы являются причиной появления очень большого количества мутаций. Исследование кетена, ацетилирующего реагента, было предпринято на основе тех же соображений: 1) его способности проникать в клетку и 2) определенных реакций кетена с аминокислотами и протеинами. При исследовании дифенилкетена была установлена его способность вызывать специфические модификации<sup>(17)</sup>, т. е. влиять на определенные формообразовательные процессы. Влияние кетена на высших живогных изучили Камерон и Нейбергер<sup>(2)</sup> при помощи патолого-анатомических методов.

В химии белков и иммунохимии ацетилированию также уделялось весьма значительное внимание. Кетен энергично ацетилирует алифатические и ароматические соединения, в составе которых имеются аминогруппы<sup>(19)</sup>. Особенности кетена были много раз использованы при исследовании структуры белков. Например, Герриотт и Нортроп<sup>(10)</sup> устанавливали при помощи ацетилирования аминогруппы и гидроксильные группы пепсина. В отношении инсулина соответствующий анализ произведен Штерном и Уайтом<sup>(20)</sup>. При определении количества заблокированных аминогрупп применяется метод Ван-Слайка. Специфические особенности белков, входящих в состав основных компонентов иммунологических реакций — как антигенов, так и антител, также изменяются после ацетилирования. Сначала<sup>(21)</sup> была достигнута детоксикация дезинтерийного антигена, затем изучалось влияние кетена на токсины дифтерии<sup>(7)</sup> и столбняка<sup>(9)</sup>. При помощи ацетилирования можно добиться понижения и, наконец, устранения токсичности, но тогда исчезают такие качества токсинов, как способность вырабатывать антитела и связываться с антитоксинами. Следовательно, ацетилирование не позволяет превратить токсин в стабилизированный анатоксин, в то время как при помощи формальдегида уже осуществилось достижение этой цели. Потеря токсичности наступает в результате воздействия кетена на антиген, а не вследствие активности каких-нибудь промежуточных продуктов. Динамика процесса детоксикации свидетельствует, что существует зависимость между количеством заблокированных аминогрупп токсина и степенью ослабления яда. В серологических исследованиях доказано также, что ацетилирование влияет на способность антител к анафилактическим реакциям<sup>(6,8)</sup> и на способность антител осаждать соответствующие антигены<sup>(3)</sup>.

Изучено влияние кетена на вирус табачной мозаики<sup>(18,14)</sup>. После продолжительного ацетилирования наступает инактивация вирусов. То обстоятельство, что при изучении влияния кетена и формальде-

гида на вирусы не были найдены мутации, не доказывает неспособности этих соединений вызывать мутации у высших растений и у животных. Если допустить, что генетическая структура вирусов и фагов является гаплоидной — а в пользу такого предположения можно привести некоторые данные, — то у субмикроскопических объектов можно выделить только те редкие изменения, которые соответствуют видимым мутациям у высших организмов. Гораздо более распространенная категория летальных мутаций — общий и весьма удобный мутационный индикатор совершенно неприменим в генетике вирусов.

Во всех описанных ниже опытах была использована Флоридская линия *Drosophila melanogaster*. Определение частоты летальных мутаций в половой хромосоме производилось по генетической методике, описанной в предыдущих сообщениях. Развитие насекомых происходило при температуре 25,5—26°C. Действие кетена изучалось в четырех больших экспериментах, отличавшихся по стадии развития и по другим условиям.

1. Самое большое число мутаций возникло в опытах, при которых оплодотворенные яйца в возрасте 3—15 часов после откладки помещались в пробирки с водой, через которые непрерывно пропускался кетен. В пробирках с 20—25 см<sup>3</sup> воды находилось 80—100 яиц и неболь-

Таблица 1

	Число хромосом	Число летальных и семилетальных мутаций	% мутаций
Опыт . . . . .	1031	16	1,5
Контроль . . . . .	617	—	—

шое количество питательной среды, от которой их было трудно очистить. Количество кетена, поступившего в пробирки, колебалось от 0,07 до 0,25 моля в 1 час. Яйца выдерживают непрерывное трехчасовое воздействие самой большой из приведенных концентраций кетена, и, повидимому, возможно еще более длительное воздействие.

Специфические морфозы после ацетилирования не обнаружены. У 5—10% взрослых насекомых имеются темные пятна на хитине, очень похожие на модификацию, которую вызывает формальдегид. Мутационный эффект кетена, повидимому, не связан с каким-либо порогом, так как значительное повышение количества мутаций наблюдается уже после 10—15-минутного воздействия (0,07 М/ч.). В табл. 1 приведены сводные результаты небольших экспериментов, продолжительность которых колебалась от 30 до 95 минут жесткого воздействия.

В некоторых экспериментах с продолжительной экспозицией возникало большее количество мутаций, но мы не приводим их. Целесообразно произвести расчет активности кетена на основе продолжительности воздействия. Хотя в контроле мутации не возникли, но мы примем 1:600 как частоту спонтанных мутаций. В опыте частота составляет 1:60. Таким образом, воздействие в течение 1 часа (среднее время) увеличивает число мутаций в 10 раз. Так как полный цикл развития составляет 288 часов (12 суток), то непрерывная умеренная обработка кетеном была бы в состоянии увеличить число мутаций в 2880 раз.

2. Воздействие на взрослых насекомых не увеличивает числа мутаций, так как кетен вызывает быструю гибель мух. Кетен (0,07 М/ч.) пропускался через банку емкостью около 1 л, на дне которой нахо-

дились неплотно закрытые пробирки. Через 15 минут, проведенных в атмосфере кетена, мухи падали на дно, а через 20—25 минут погибали. Куколки выдерживают гораздо более жесткое воздействие.

3. Более эффективна обработка яиц, которые находятся на поверхности агарной среды в атмосфере кетена. Среди 275 хромосом в подобном опыте было 3 независимых возникновения летальных мутаций (включая пучок из шести) при помещении пробирок с яйцами в банку, через которую пропускался кетен (0,07 М/ч.) в течение 20—40 минут. Сравнение всех серий экспериментов показывает, что наилучшие результаты получены в первой.

Под влиянием дикетена, вводимого в питательную среду, не удалось установить достоверного увеличения мутаций (анализ около 500 хромосом), но в эфирном растворе дикетен вызывает около 2% леталей. Отрицательные результаты дал анализ 464 хромосом в потомстве насекомых, подвергнутых влиянию дифенилкетена в водной среде. Однако в последнем эксперименте возникла одна видимая мутация — rudimentary.

Можно предполагать, что при ацетилировании белковых компонентов генной молекулы, как и при ацетилировании белков, антигенов, антител и вирусов, в реакцию вступают прежде всего свободные аминогруппы. При ацетилировании дифтерийного токсина (16) резко уменьшается количество свободных аминогрупп диаминокислоты — лизина. При более продолжительном воздействии кетена связываются гидроксильные группы тирозина. При реакции дифенилкетена с различными аминами (19) также показано, что быстрота присоединения увеличивается параллельно возрастанию основности аминов. При сравнении быстроты ацетилирования аминогрупп и сульфгидрильных групп кристаллического альбумина установлено, что реакция с первыми протекает несравненно быстрее (5). Реакция с тирозином в белке вируса табачной мозаики проходит легче, чем с триптофаном. Повидимому, последовательность ацетилирования различных аминокислот в структуре гена и хромосомы подчиняется тем же закономерностям. О специфике ацетилированных белков свидетельствует тот факт, что они в значительной степени сохраняют способность к связыванию формальдегида (15).

Мутации генов, вероятно, могут наступать в результате изменения не единственного химического радикала, а нескольких. Многие гены отличаются по своей структуре. Поэтому, вероятно, повторяются отношения, обнаруженные при исследовании инактивации различных биологических продуктов. Ацетилирование аминогрупп многих токсинов, гонадотропного, лактогенного и других гормонов (12, 13) вызывает их инактивацию, но инактивация пепсина и инсулина зависит от связывания гидроксильных, а не аминных групп.

Какой механизм определяет возникновение мутации после ацетилирования тех или иных составных частей генной молекулы? Необратимость вызванных кетеном химических изменений играет очень большую роль. Разумеется, далеко не все реакции в генных белках являются необратимыми. В результате гидролиза восстанавливается нормальная химическая структура гена. Но даже обратимые изменения могут быть причиной мутаций, если происходят в период репродукции гена. Все описанные успешные эксперименты совпали именно с быстрыми делениями клеток, а следовательно, энергичными репродукционными процессами в генах. Как среди необратимых, так и обратимых процессов большое значение имеют изменение гидратационной способности и рацемизация.

Способность казеина к гидратации резко падает по мере ацетилирования (15). Между прочим Шеберль и Крумей показали, что N-ацетильные соединения более устойчивы к гидролизу, чем O-ацетиль-

ные соединения. По этой причине ацетилирование лизина, вероятно, более необратимое изменение, чем ацетилирование тирозина. *L*-триптофан и *L*-фенилаланин претерпевают рацемизацию после ацетилирования кетеном, особенно в кислой среде (<sup>11</sup>). *L*-лейцин и *L*-глутаминовая кислота и некоторые дипептиды рацемизируются под влиянием кетена (<sup>1</sup>). О значении рацемизации можно судить по тому факту, что реакции стереоизомерных соединений являются специфическими и сыворотки, связывающие один из стереоизомерных антигенов, не действуют на другой. Следовательно, при процессе генной репродукции для белковых рацематов затрудняется воспроизведение копий нормальных белковых компонентов.

В заключение необходимо указать на некоторые особенности кинетики мутационного процесса при ацетилировании. Ацетилирование 40% аминокрупп столбнячного токсина (<sup>9</sup>) снижает титр яда, но не затрагивает антигенных свойств. Ацетилирование 60% аминокрупп вызывает потерю антигенных особенностей. Инактивация вируса табачной мозаики создает такую же картину перелома. Блокирование 70% аминокрупп и 20—40% фенольных и индольных групп почти не влияет на активность, но дальнейший процесс вызывает инактивацию (<sup>14</sup>). По Голди (<sup>7</sup>) подобные явления зависят от последовательных стадий процесса: сначала блокируется матрица и „легко уязвимый“ поверхностный слой аминокрупп“ и лишь затем наступает очередь более специфических компонентов, определяющих характер антигенов.

Хотя мы пока не располагаем достаточными экспериментальными данными, чтобы утверждать о мономолекулярном характере мутаций под влиянием кетена, однако, мутационный эффект даже очень слабых доз не внушает сомнения. Может быть, причина заключается в том, что гены отличаются более простым строением не только по сравнению с вирусами, но и с антигенами. Отсутствие „порога“ свидетельствует, что кетен при взаимодействии с геном не встречается с белковой предохранительной матрицей или способен легко ее преодолеть благодаря своей реакционной способности.

Детальное количественное сравнение спектров мутационной изменчивости кетена и формальдегида установит и различия между ними, однако, активность обоих соединений в основном зависит от специфических реакций с аминокгруппами белков.

Приношу благодарность А. П. Сколдинову и Н. В. Смирновой за любезное содействие в экспериментах по ацетилированию.

Институт цитологии,  
гистологии и эмбриологии  
Академии Наук СССР

Поступило  
17 III 1947

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> W. M. Cahill and J. F. Burton, *J. Biol. Chem.*, **132**, 161 (1940). <sup>2</sup> G. R. Cameron and A. Neuburger, *J. Path. Bact.*, **45**, 653 (1937). <sup>3</sup> B. F. Chow and W. F. Goebel, *J. Exp. Med.*, **62**, 179 (1935). <sup>4</sup> *Idem*, *ibid.*, **66**, 204 (1937). <sup>5</sup> H. L. Fraenkel-Conrat, *J. Biol. Chem.*, **152**, 385 (1944). <sup>6</sup> H. Goldie, C. R. Soc. Biol., **125**, 861 (1937). <sup>7</sup> *Idem*, *ibid.*, **126**, 974; **126**, 977 (1937). <sup>8</sup> H. A. Goldie et G. Sandor, *ibid.*, **126**, 291, 295 (1937). <sup>9</sup> *Idem*, *ibid.*, **129**, 454 (1938). <sup>10</sup> R. M. Herriott and J. H. Northrop, *J. Gen. Physiol.*, **18**, 35 (1934). <sup>11</sup> R. W. Jackson and W. M. Cahill, *J. Biol. Chem.*, **126**, 37 (1938). <sup>12</sup> C. H. Li, M. E. Simpson and H. E. Evans, *Science*, **90**, 140 (1939). <sup>13</sup> *Idem*, *J. Biol. Chem.*, **131**, 259 (1939). <sup>14</sup> G. L. Miller and W. M. Stanley, *ibid.*, **141**, 905 (1941). <sup>15</sup> H. Nitschmann and H. Lauenner, *Helv. Chim. Acta*, **29**, 184 (1946). <sup>16</sup> A. M. Pappenheimer, *J. Biol. Chem.*, **125**, 201 (1938). <sup>17</sup> И. А. Рапопорт, *ДАН*, **54**, 65 (1946). <sup>18</sup> G. Schramm u. H. Müller, *Z. physiol. Chem.*, **266**, 43 (1940). <sup>19</sup> H. Staudinger, *Die Ketene*, Stuttgart, 1912. <sup>20</sup> K. G. Stern and A. White, *J. Biol. Chem.*, **122**, 371 (1937). <sup>21</sup> J. T. Tamura and M. J. Boyd, *Science*, **83**, 61 (1936).