

И. А. РАПОПОРТ

## АЛКИЛИРОВАНИЕ ГЕННОЙ МОЛЕКУЛЫ

(Представлено академиком Л. А. Орбели 15 XII 1947)

Нами даны многочисленные примеры следующих четырех основных типов химических реакций, определяющих возникновение частых генных изменений: конденсации, окисления, ацилирования и алкилирования. Как конденсационные процессы можно трактовать взаимодействие молекулярных единиц наследственности с эфирами карбаминной кислоты, пятью карбонильными соединениями (<sup>10</sup>, <sup>11</sup>) и т. д. Существует несколько химических реактивов, точно воспроизводящих качественные и количественные особенности действия X-лучей, а коротковолновая энергия влияет на гены главным образом как окислитель. Мутационное действие кетена и дикетена иллюстрирует последствие введения кислотных остатков — уксусной и ацетоуксусной кислот (<sup>12</sup>). Из обычных алкилирующих химических реагентов мутации вызывают диэтилсульфат, диметилсульфат (<sup>13</sup>) и несколько других. Хотя в ряде случаев нельзя исключить взаимодействие мутагенных раздражителей с тимонуклеиновыми компонентами генов и хромосом, все же совершенно ясно, что определяющая черта химических генных мутаций в том, что они укладываются в диапазон основных необратимых химических изменений белковых молекул.

С точки зрения теории иная структура генов вряд ли вероятна. Ведь ферменты, промежуточное звено, соединяющее ядро с протоплазмой и единицы аппарата наследственности с эмбриогенезом, — в основном белковые тела, а между тем они в определенном смысле являются генными продуктами. Трудно представить, чтобы белки в меньшей степени детерминировали специфику генов, чем своеобразие ферментов.

Конечно, в эксперименте всегда отдавалось предпочтение реактивам, не разрушающим полностью белковый компонент гена, а лишь специфически перестраивающим его до состояния нового аллеломорфа, не исключающего возможность получить обратную мутацию, более редкую, правда, чем индуцированное рецессивное видимое или летальное изменение. Что мутагенные соединения обладают своеобразным, по-своему необратимым, но в то же время «мягким» действием, видно по способности многих из них вызывать специфические отклонения в иммуно-химических свойствах белков и токсинов. Иммуно-химические реакции, которым уделялось значительное внимание при выборе и оценке мутагенных реактивов, трудно недооценить. Они полностью сохраняют свое традиционное положение тончайших показателей специфики не только при реакции нормальных антигена и антитела, но и химически измененного антигена с нормальным антителом и наоборот.

Новый алкилирующий мутационный реактив, испытанный нами, — диазометан\* — выделяется по своему поведению в иммунологических реакциях. Он не только токсичен, но вызывает аллергические реакции у человека. Воздействие диазометаном на морских свинок ведет к сенсibilизации (<sup>9</sup>). Все проявления аллергии, несомненно, связаны с активностью диазометана в отношении белков и со специфическими

\* Выражаю благодарность Г. Н. Кошелевой и Г. И. Самохвалову, оказавшим содействие при получении диазометана.

отклонениями в строении антигенов. Сенсибилизация у людей иногда принимает коварный характер: после довольно продолжительного соприкосновения с диазометаном наступает состояние исключительно повышенной чувствительности к нему, когда при очень низких концентрациях диазометана вдруг развиваются приступы астмы, и дальнейшая работа с этим соединением становится невозможной. Имеются намеки на то, что при наличии метилированных белков в сыворотке животных, вызванном другими способами (нитрозометилуретан), увеличивается чувствительность к диазометану. Метилирование антигенов при помощи диазометана весьма резко изменяет их специфические свойства (8).

Хотя нам не удалось обнаружить специфические морфозы, обычно сопутствующие инактивации эмбриональных энзиматических продуктов, но в литературе имеются указания об инактивации диазометаном

Таблица 1

Частота летальных мутаций в половой хромосоме

С е р и я	Число хромосом	Число мутаций	% леталей
Куколки . . . . .	378	14	3,7
Имаго . . . . .	1216	18	1,5
Контроль . . . . .	898	2	0,2

зимазы, карбоксилазы (1) и папаина (2). В первых двух случаях метилируются главным образом карбоксильные группы в молекуле ферментов. Процесс инактивации ферментов не принадлежит к очень быстрым. После продолжительного соприкосновения папаина с диазометаном активность папаина сокращается только на одну

четверть, а для отравления зимазы необходимо взаимодействие в течение нескольких суток.

Мутационный эффект диазометана устанавливался по стандартной генетической методике для *Drosophila melanogaster*, по способу С1В. Поэтому во всех опытах анализировалось только потомство самцов, подвергнутых воздействию. Объектами были три линии: yellow<sup>3P</sup>, Нальчикская (в предварительных опытах 1940 г.) и инбридированная Флоридская. Эксперименты ставились при комнатной температуре, а дальнейшее развитие происходило при 25—27° С.

Насекомые соприкасались с диазометаном на стадиях куколки и имаго. В обоих случаях газ — диазометан был смешан с парами серного эфира. После 10—15 мин. наступала гибель мух, а куколки и крупные личинки выдерживали до 30—35 мин. В этих экспериментах было трудно установить, в чем действительная причина смерти насекомых — в токсическом ли эффекте диазометана или в том, что действие эфира перешло за границы анестезии. Однако в других опытах, где насекомые подвергались воздействию диазометана также в момент его возникновения, но без примеси эфира, взрослые насекомые не выдерживали более 10 мин. Сначала наступало более быстрое их движение, затем они падали на дно пробирок (иногда с поднятыми крылышками), однако при отсутствии эфира не наступала полная неподвижность — они продолжали шевелить крылышками, антеннами и ножками. Они погибали через 6—12 час. после окончания воздействия. Куколки выдерживали в 2—3 раза более жесткую обработку.

Сводные результаты опытов с сублетальными (определяющими гибель не менее трех четвертей материала) концентрациями диазометана в смеси с серным эфиром показаны в табл. 1.

Различия статистически вполне достоверны. Для теоретической оценки следовало бы сравнивать мутационный эффект диазометана не в течение 10—30 мин., а в течение 250—300 час., как это делается для контроля. Мутационный индекс диазометана увеличился бы в соответ-

ствующей мере. Однако воздействие столь высокими дозами практически невозможно вследствие чувствительности нервной, локомоторной и энзиматической систем.

Одна или две реакции с алкилирующими реактивами еще не дают бесспорного доказательства того, что мы имеем дело с процессом алкилирования, а не своеобразным влиянием только диэтилсульфата или diazometana. Последнее соображение заставило испытать еще несколько алкилирующих соединений, среди них и близкие к diazometanu.

Изучение эффекта diaзоуксусного эфира и нитрозометилуретана объясняется не только их способностью к метилированию, подобно diazometanu, но тем, что они представляют результаты присоединения или замещения определенных атомов в молекуле diazometana. Таким образом, в подобных экспериментах собирается материал и по проблеме мутационной активности замещенных и незамещенных мутагенных реактивов. Накопленные до сих пор данные по этому вопросу (на других рядах соединений) позволяют утверждать, что все замещения в молекуле сильно мутагенного соединения, снижающие его химическую активность, параллельно понижают и мутационный эффект. Особенно четко проявляется эта за-

кономерность при замещении на такие радикалы, которые преобладают в генах, протоплазме и белках вообще. Формулировка этой зависимости отнюдь не маловажна, так как с других точек зрения гораздо более вероятно, что мутационный эффект совсем не дело непосредственно химической активности мутагенного вещества, а скорее особых медиаторов, образующихся в клетке при его участии. Нам не удалось пока найти подтверждения подобных взглядов в отношении активных химических реактивов, хотя они могут быть и справедливы для иных соединений. Во всяком случае, по имеющимся материалам, при взаимодействии между сильными мутагенными веществами и генами мутации возникают от непосредственного соприкосновения тех и других без промежуточных звеньев и стадий этого процесса в протоплазме. Наоборот, прохождение через протоплазму нейтрализует часть мутагенного соединения. Результаты исследования активности diaзоуксусного эфира и нитрозометилуретана, применявшихся в сублетальных концентрациях (с гибелью 75—90% яиц и личинок, развившихся в среде с этими веществами) показаны в табл. 2.

Можно убедиться в способности нитрозометилуретана и diaзоуксусного эфира при длительной экспозиции увеличивать частоту летальных мутаций от 6 до 8 раз, а diazometan за несравненно более короткое время увеличивает частоту мутаций в 18 раз, что, по видимому, еще ниже возможного «потолка» мутаций под его влиянием.

Трифтористый бор, как и другие неорганические фториды, вызывает морфоз — меланические включения, но на мутации почти не действует. Между тем диэтилтрифторборат, применявшийся в растворе (в этилацетате из-за быстрого гидролиза), увеличивает количество мутаций приблизительно в 7 раз. Любопытно, что у многих насекомых, соприкасавшихся с фторборным эфиром, были меланические включения.

Остается рассмотреть вопрос о реакциях diazometana с составными частями белков и нуклеиновых кислот. Герциг и Ландштейнер (4)

Таблица 2

Частота летальных мутаций под влиянием трех алкилирующих реактивов

Название реактива	Число хромосом	Число леталей	% леталей
Нитрозометилуретан	307	5	1,6
Диазоуксусный эфир	569	7	1,2
Трифторборный эфир	579	9	1,5
Контроль, см. табл. 1			

описали реакции с фенилаланином, лейцином, тирозином и глутаминовой кислотой. Чаще всего, по их мнению, аминокислоты взаимодействуют с диазометаном по карбоксильной и гидроксильной группам, и несравненно реже с аминогруппами. И по другим авторам (6), в водном растворе аминокислот преимущественно образуются метиловые эфиры. После воздействия диазометана на фиброин щелоча изменяется реакция белка по отношению к азотистой кислоте (14). В фиброине появляется много метоксильных групп, в первую очередь за счет реакции с гидроксильными радикалами тирозина, а также карбоксильными группами. Отметим, что метилирование при помощи диазометана иногда сопровождается рацемизацией аминокислот и белков, что не безразлично, разумеется, для нормального течения генных синтезов, если при опыте в генном белке появились метоксильные группы. Имеются данные также и о метилировании пиримидиновых оснований нуклеиновых кислот (3). Сравнительно легко метилируются урацил, метилурацил и тимин; с большим трудом — цитозин. Преимущественно реакции по карбоксильным и гидроксильным группам представляют большой интерес при исследовании специфики мутаций различных генных локусов в зависимости от преобладания тех или иных аминокислот в их структуре. Тщательная локализация и сопоставление наследственных изменений под влиянием формальдегида (как реагента на диаминокислоты и триптофан) и диазометана (как реагента на дикарбоксильные аминокислоты, тирозин и т. д.) обещают бросить свет на эти новые вопросы.

Мы не располагаем решающими экспериментальными данными о сравнительной роли белков и тимонуклеиновой кислоты в механизме мутации при метилировании. Уже было показано химическое изменение пиримидиновых оснований, из числа входящих в тимонуклеиновую кислоту, и можно предвидеть изменения пуриновых оснований или дезоксирибозы, так как, в частности, близкие к ней углеводы вступают в реакцию с диазометаном с очень большой легкостью. Однако, с другой стороны, ключ к специфике генных белков — в их исключительном разнообразии, не идущем ни в какое сравнение с тимонуклеиновой кислотой. Этот факт, вместе с существованием многих других химических мутагенных продуктов, почти не реагирующих с нуклеиновыми кислотами, говорит в пользу гипотезы, что и в этом случае решающее звено мутации зависит от генных белков.

Мы не смогли решить вопрос о влиянии диазометана на вторичные амины в генных белках. По данным Ландштейнера, при жестком воздействии удается метилирование аминогрупп некоторых антигенов. Лабрутто (7) и Иррера (5) описали реакции диазометана с иминами небелковых веществ. Следовательно, имеются теоретические предпосылки для появления разрывов хромосомных нитей, транслокаций, инверсий и других хромосомных перестроек, так как непрерывность хромосомной нити, повидимому, определяется именно связями кетонного типа.

Институт цитологии, гистологии и эмбриологии  
Академии Наук СССР

Поступило  
12 XII 1947

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> F. Axmacher, *Klin. Wochenschr.*, **13**, 776 (1934). <sup>2</sup> T. Bersin u. W. Logemann, *Z. physiol. Chemie*, **220**, 209 (1933). <sup>3</sup> F. A. Case and A. I. Hill, *J. Amer. Chem. Soc.*, **52**, 1536 (1930). <sup>4</sup> I. Herzig u. K. Landsteiner, *Bioch. Z.*, **105**, 111 (1920). <sup>5</sup> L. Irrera, *Gazz. Chim. Ital.*, **65**, 461 (1935). <sup>6</sup> R. Kuhn u. W. Brydowna, *Ber. Deutsch. Chem. Ges.*, **70**, 1333 (1937). <sup>7</sup> G. Labruzzo, *Gazz. Chim. Ital.*, **63**, 266 (1933). <sup>8</sup> K. Landsteiner, *Z. immun. Forsch.*, **26**, 122 (1917). <sup>9</sup> K. Landsteiner and A. A. Di Somma, *J. Exp. Med.*, **68**, 505 (1937). <sup>10</sup> И. А. Рапопорт, *ДАН*, **54**, 65 (1946). <sup>11</sup> Он же, *Бюлл. экп. биол. и мед.*, **23**, 193 (1947). <sup>12</sup> Он же, *ДАН*, **58**, 119 (1947). <sup>13</sup> Он же, *Докл. ВАСХНИЛ*, № 10, 12 (1947). <sup>14</sup> H. A. Rutherford, W. I. Patterson and M. Harris, *Am. Dyestuff Reports*, **29**, 583 (1940).