

М. Г. ОГАНЕСЯН

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ МУТАГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ ФОРМАЛЬДЕГИДА

Сравнительно недавно формальдегид имел ограниченное применение, главным образом в медицинской практике. Однако с развитием полимерной химии круг лиц, имеющих дело с формальдегидом, сильно расширился. Если учесть еще, что формальдегид достаточно широко применяется и в сельском хозяйстве в качестве фунгицида, то важность оценки действия формальдегида на живые системы станет очевидной.

Задача настоящей работы — обобщить результаты, полученные в этом направлении широким кругом исследователей.

Впервые о мутагенном действии формальдегида сообщил Рапопорт [5]. Эти результаты вскоре были подтверждены Капланом [36], Ауэрбах [15] и другими (обзор этих ранних работ см. [16]). Позже мутагенное действие формальдегида было показано на ячмене и пшенице [1, 27], на грибах [24], кишечной палочке [4], на вирусе полиомиелита [2], клещевого энцефалита [3].

Уже в ранних работах указанных авторов были сделаны попытки объяснить механизм действия формальдегида. Данные Рапопорта, Каплана и Ауэрбаха о том, что мутации у дрозофилы индуцируются лишь при добавлении формальдегида в корм личинок, можно было объяснить двояко:

1. Формальдегид действует через промежуточный продукт, который образуется при реакции его с некоторыми компонентами пищи.
2. Такой продукт образуется не в результате реакции с компонентами пищи, а в теле личинки.

Для выбора между этими возможностями Ауэрбах обработала дрозофилу парами формальдегида [15]. Мутаций при этом не было обнаружено. Отсюда был сделан вывод, что формальдегид, по-видимому, образует какие-то мутагенные продукты с компонентами самой пищи.

Для выяснения природы продукта, с которым формальдегид образует мутагенное соединение, необходимо рассмотреть с какими биологическими веществами реагирует он.

Установлено, что из биологически важных молекул формальдегид реагирует с аминокислотами [46], белками, образуя ковалентные перекрестные сшивки [22, 26, 48] (обзор более ранних работ см. [7]), с липидами [35], азотистыми основаниями, входящими в состав ДНК и РНК [9, 58] с двунитчатой [17, 29, 30, 32] и однонитчатой ДНК [53] с РНК разной природы [8, 29, 41, 58].

Наибольший интерес с рассматриваемой точки зрения представляет реакция формальдегида с нуклеиновыми кислотами и их компонентами.

Формальдегид реагирует с аминогруппами азотистых оснований, прежде всего аденина [А]. Реакция может протекать с образованием мо-

нометилольного производного $\begin{matrix} \text{H} \\ | \\ \text{---N---CH}_2\text{OH} \end{matrix}$ с замещением водорода в 4 или в 9 положении. В условиях биологического эксперимента — скорее в положении 4 [9, 39]. Кроме этого лабильного продукта, образуется стабильное производное из двух алкилированных адениновых остатков $\begin{matrix} \text{H} & & \text{H} \\ | & & | \\ \text{A---N---CH}_2\text{---N---A} \end{matrix}$ [9, 61]. По-видимому, такое метил-бис-производное

может образоваться и при реакции формальдегида с ДНК, о чем свидетельствуют результаты опытов Фрайфельдера и Дэвисона о получении перекрестных сшивок в молекулах ДНК фага Т7 после обработки формальдегидом [30]. Предполагалось, что реакция может протекать лишь с аминогруппами, невовлеченными в водородную связь [19, 25, 59]. Этим именно объяснялось наличие реакции формальдегида с азотистыми основаниями, одноцепочечной ДНК и РНК и отсутствие реакции с нативной двуспиральной ДНК [8, 17, 29, 32, 41, 47, 49, 53, 58]. При этом прореагировавшая с формальдегидом аминогруппа теряет способность к образованию водородных связей. Это было показано в экспериментах по денатурации и ренатурации ДНК. Оказалось, что после обработки формальдегидом денатурированная теплом ДНК не ренатурируется [32]. Такой же эффект наблюдается в случае локальной денатурации ДНК [17]. Отсутствие у формальдегид-обработанных нуклеотидов способности образовывать водородные связи не только тормозит редупликацию ДНК, но и может сделать невозможной транскрипцию и трансляцию генетической информации с этой матрицы ДНК. Действительно, Пеннистон с сотрудниками показали, что при обработке формальдегидом аденилового триплета, способного считывать полиуридилловый посредник, считывающая способность последнего будет утеряна [45].

Однако в более поздних работах показано, что формальдегид может реагировать и с нативными молекулами ДНК; при этом он сам вызывает локальную или обширную (в зависимости от концентрации) денатурацию ДНК, а затем реагирует с «раскрывшимися» (освобожденные от водородных связей) аминогруппами нуклеотидных остатков ДНК. Первые результаты в пользу этой точки зрения были представлены в работе Кёгоку с соавторами [38]. Оказалось, что после обработки ДНК формальдегидом отмечается изменение вторичной структуры ДНК (из тимуса теленка) и рибосомальной РНК (дрожжевая), которые были сходны с изменениями, отмечаемыми при термической обработке ДНК [38]. Позже было показано, что формальдегид действительно является сильным денатурирующим агентом, и была разработана теория процесса денатурации [6].

Какова же роль перечисленных реакций в формальдегид-индуцированном мутагенезе? Большой интерес к вопросу вызвал к жизни несколько гипотез, объясняющих действие формальдегида.

Согласно Нилей, формальдегид действует через торможение синте-

за метионина, что в свою очередь приводит к подавлению цитоплазматического и ядерного синтеза [42], но этот механизм скорее может объяснить летальное действие формальдегида.

Однако даже для инактивирующего действия формальдегида этот механизм не единственный [21, 43]. Инактивация, помимо реакции с белковыми компонентами, может быть обусловлена и реакцией формальдегида с нуклеиновыми кислотами. Может ли быть причиной инактивации обратимая реакция формальдегида с ДНК. Для проверки этого был проведен следующий эксперимент. Обработывался фаг Т1 формальдегидом и определялась степень инактивации фага немедленно и после того, как обработанный фаг выдерживался в среде, связывающей формальдегид. При этом исходили из того факта, что продукт реакции формальдегида с ДНК лабилен, и при хранении доля жизнеспособных фаговых частиц должна увеличиваться (такое увеличение действительно отмечалось в эксперименте [34]). Зауербир доказал это положение с использованием феномена реактивации на системе фаг Т1-кишечная палочка [50]. Позже, с использованием инактивирующих сред, Диген показал обратимый характер этой реакции инактивации [23], о чем свидетельствуют и результаты по тепловой реактивации обработанных формальдегидом фагов [33]. Скорее всего во всех указанных случаях образуется лабильное монометилальное производное адениновых остатков ДНК.

Что касается механизмов мутагенного действия формальдегида, то существуют представления, что формальдегид переходит в клетках в соединение перекисного типа ($\text{HO}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{OH}$), которое, собственно, и является мутагеном [56, 57]. Обнаружив мутагенное действие смеси перекиси водорода с формальдегидом, Дикей с соавторами придает большое значение этим соединениям в спонтанном мутагенезе [24], так как выяснилось, что формальдегид может образоваться естественно в клетках при метаболизме метионина и саркозина [44, 40]. Вестергаард значительную долю спонтанных мутантов относит за счет именно перекисей и формальдегида [60].

Еще в ранних работах было отмечено, что формальдегид индуцирует хромосомные разрывы, а позже оказалось, что большинство хромосомных разрывов относится к типу потенциальных разрывов [55]. Хромосомные разрывы и делеции [54] скорее всего связаны с перекрестными сшивками, которые образует формальдегид в молекуле ДНК. Если такие сшивки возникают между двумя участками молекулы ДНК, то этот участок может при акте редупликации ДНК «утеряться». Фреско выдвинул гипотезу, что такая «утеря» может осуществиться путем образования петли в молекуле ДНК [31]. Эту гипотетическую петлю Фреско вскоре удалось наблюдать в единичной молекуле ДНК под электронным микроскопом [18].

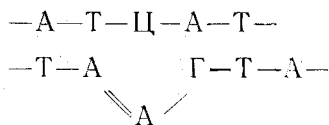
Однако формальдегид вызывает не только хромосомные aberrации, но и точковые мутации, которые, очевидно, должны протекать по другому механизму. После ряда попыток Алдерсон выяснил в основных чертах механизм образования точковых мутаций. По данным Алдерсона, форм-

альдегид реагирует с адениновыми остатками, образуя монометилольное производное. Два монометилольных производных, конденсируясь, образуют адениновый димер ($\overline{AA}$), где два остатка аденина соединены друг с другом через метиленовый мостик. Такой димер может включиться в молекулу ДНК в момент ее редупликации. Чтобы димер $\overline{AA}$ мог включиться во вновь синтезируемую нить ДНК, необходимо наличие последовательности ТЦ (тимин-цитозин) в исходной комплементарной нити. В этом случае один остаток А нормально образует пару с Т, а второй остаток А из димера образует пару с Ц. Такая пара (АЦ) «ошибочна» и может образоваться лишь в том случае, если в таутомерный сдвиг будут вовлечены атомы водорода в А или в Ц. Если такая пара уже образовалась, то при следующем акте редупликации второй А из димера $\overline{AA}$ образует пару (АТ) с обычным своим партнером тиминном. Таким образом, исходная нуклеотидная последовательность ТЦ будет заменена последовательностью ТТ, т. е. произойдет мутационная замена оснований типа простых замен (транзиция).

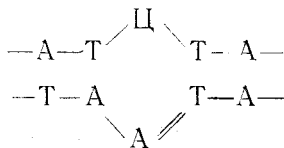
Следует сказать, что возможно образование не только димера $\overline{AA}$, но и полимера поли-А, содержащего три и больше адениновых остатков. Однако шансы на включение такого полимера во вновь синтезируемую нить ДНК уменьшаются с увеличением длины цепочки полимера, так как для включения тримера $\overline{AAA}$ требуется последовательность ТТЦ, (или те же основания в другом сочетании), а для тетрамера $\overline{AAAA}$ — последовательность ТТТЦ и т. д.

Подобные сочетания значительно менее вероятны, чем сочетание ТЦ, необходимое для включения димера $\overline{AA}$.

Образование «ошибочных» пар АЦ не является обязательным условием включения димера $\overline{AA}$ в молекулу ДНК. Такое включение может также осуществиться за счет «выталкивания» одного из адениновых остатков (димера $\overline{AA}$) из цепи ДНК в петлю Фреско:



В петлю могут «выталкиваться» как А, так и Ц, чтобы избежать образования «ошибочной» пары АЦ:



Очевидно, что в первом случае после второго акта редупликации произойдет вставка лишнего нуклеотида Т, и тогда последовательность нуклеотидов в исходной нити станет А—Т—Т—Ц—А—Т—, т. е. произойдет мутация типа «сдвига рамки считывания».

Во втором случае произойдет простая замена оснований (транзигция), как в случае ошибочного образования пары АЦ [10, 11, 12, 13, 14].

Ко всем этим заключениям Алдерсон пришел лишь на основании собственных генетических экспериментов. Однако вскоре в химических экспериментах действительно удалось выделить димеры $\overline{AA}$, как продукт реакции формальдегида с РНК или нуклеотидами [9, 61]. Позже результаты Алдерсона получили подтверждение и в экспериментах Кишина [37].

Следует добавить, что разные авторы, исходя из того, что формальдегид реагирует только с «раскрытыми» аминоклруппами ДНК, пытались различными способами освободить последние от водородных связей для реакции с формальдегидом. С этой целью, например, применялись ультрафиолетовые лучи для разрыва водородных связей ДНК фагов [51] и бактерий [4]. И действительно, в этих экспериментах отмечалось увеличение эффективности действия формальдегида.

При воздействии на клеточные формы жизни формальдегид может реагировать с РНК (РНК всегда имеется в клетке) и образовать димер $\overline{AA}$. Рано или поздно эта РНК будет разрушена полинуклеотид-фосфоплазой до рибонуклеотидов. Затем рибонуклеотиды редуцируют до дезоксирибонуклеотидов, которые могут включиться в молекулы вновь синтезируемых ДНК [52]. Этим объясняется, большая эффективность формальдегида в отношении активно-метаболизирующих клеток по сравнению с покоящимися клетками [20].

Что касается вирусов (бактериальных, растительных и животных), то в случае, если они имеют хромосому из однокитчатой ДНК или РНК, формальдегид реагирует непосредственно с нуклеиновыми кислотами. В случае же вирусов с хромосомой из двукитчатой нуклеиновой кислоты, действие формальдегида либо опосредовано, либо тем или иным способом (в том числе и действием формальдегида в соответствующих концентрациях) необходимо разорвать водородные связи, чтобы «раскрыть» аминоклруппы для непосредственной реакции с формальдегидом.

Таким образом, формальдегид прямо или опосредовано может действовать на живые системы, вызывая либо их инактивацию, либо приводя к мутациям типа делеций, транзигций и «сдвига рамки считывания».

Институт экспериментальной биологии

АН АрмССР

Поступило 9.X 1968 г.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Авакян В. А., Амирбекян В. А. Биологический журнал Армении, XXI, 56, 1968.
2. Гендон Ю. З., Черное В. И. Генетика, 6, 37, 1965.
3. Засухин Г. Д., Завада Л. Генетика микроорганизмов. М., Медгиз, 200, 1963.
4. Панфилова З. И., Воронина Е. Н., Послявина А. С., Горюхова Н. М., Салганик Р. И. Генетика, 2, 49, 1966.
5. Рапопорт И. А. ДАН СССР, 54, 65, 1946.

6. Трифонсв Э. Н., Лазуркин Ю. С., Франк-Каменецкий М. Д. Тр. конф. Института Атомной энергии им. И. В. Курчатова, 83, 1966.
7. Уокер Д. Ф. Формальдегид, М., изд. И. Л., 1957.
8. Фролова Л. Ю., Куханова, М. К. Тезисы докладов на I Всесоюзном биохимическом съезде. Изд. АН СССР, М.—Л., вып. II, 87, 1963.
9. Фельдман М. Л. Биохимия, 27, 378, 1962.
10. Alderson T. Nature 185, 905, 1960.
11. Alderson T. Nature 485, 187, 1960.
12. Alderson T. Ann Human genet. 174, 25, 1961.
13. Alderson T. Genetics Today 1, 65, 1963.
14. Alderson T. Mutation Res. 1, 77, 1964.
15. Auerbach Ch. Science, № 2860, 110, 419, 1949.
16. Auerbach Ch. Cold Spring Harbor Sympos. Quant Biol. XVI, 199, 1951.
17. Baldwin R. L., Shooter E. M. J. Mol. Biol. 7, 511, 1963.
18. Beer M. and Thomas C. A. J. Mol. Biol. 1, 289, 1961.
19. Berns K. I. and Thomas C. A. Jr J. Mol. Biol. 3, 289, 1961.
20. Brock N. W. J. Bacteriology 85, 1028, 1963.
21. Brown F., Cartwright B., Stewart D. L. J. Gen. Microbiol. 31, 179, 1963.
22. Card S. Ann. N. Y. Acad. Science art 4, 638, 1960.
23. Degen L. Zentr. Bacteriol. Parasitenk. Abt. I, Orig 199 (I), 113, 1966.
24. Dickey H., Cleland H., Zatz C. Proc. Nat. Acad. Sci. Wash. 35, 581, 1949.
25. Doty P., Bocdtker H., Fresco L. R., Haselkorn R. and Zitt M. Proc. Nat. Acad. Sci. Wash 45, 482, 1959.
26. Drake M. P. Dissert. Abstr 12, pt. 1, 4518, 1963.
27. Favrett E. A. and Rodriguez A. A. 3, 305, 1957.
28. Dickey H., Cleland H., Zatz C. Proc. Nat. Acad. Sci. Wash. 35, 581, 1949.
29. Francel-Conrat H. Biochim. Biophys. Acta 15, 307, 1954.
30. Freifelder D. Davison P. E. J. Biophys. 3, 49, 1963.
31. Fresco L. M., Alberts B. M. Proc. Nat. Acad. Sci. Wash. 46, 311, 1960.
32. Grosman L., Levin S. S., Allison W. S. J. Mol. Biol. 3, 47, 1961.
33. Harmegnies Y., Havari M., Mutsaers W. Ann. Inst. Pasteur 100, 214, 1961.
34. Heicken K., Spicher G. Zentralblatt Bacteriol. I Orig., 11, 175, 1959.
35. Heslinga F. J. M., Deierkauf F. A. J. Histochem and Cytochem, 6, 704, 1962.
36. Kaplan W. D. Science, 108, 43, 1948.
37. Khishin A. F. E. Mutation Res. 1, 202, 1964.
38. Kyogoku Y., Tsuboi M., Shimanouchi T., Watanabe I., J. Mol. Biol. 3, 741, 1961.
39. Lewin S. J. Chem. Soc., 1462, 1962.
40. Mackenzie C. G. and du Vigneaud V. Federation Proc. 8, 223, 1949.
41. Marciello R., Zubay G. Biochem Biophys. Res. Comm 14, 272, 1964.
42. Neely W. B. J. Bacteriology 86, 445, 1963.
43. Ozaki, Yoshikatsu, Melnick S. L. J. Immunol. 90, 429, 1963.
44. Paritsky D. and Werkman C. H. Arch. Biochem. 25, 288, 1950.
45. Peniston Y. T., Steuard M., Tucker M. D. Biochem. Biophys. Res. Comm. 15, 358, 1964.
46. Polonovski M., Ladislav R. Exptl. Med. and Surg., 1, 68, 1954.
47. Pulman B. and Pulman A. J. Chim. Phys. 904, 1961.
48. Saidel L. L., Zeitze S., Elfring W. H. Biochem. Biophys. Res. Comm 15, 409, 1964.
49. Sarkar W. K. and Dounce. Biochim. Biophys. Acta 49, 160, 1961.
50. Sauerbier W. Nature, 4747, 327, 1960.
51. Sauerbier W. Nature, 4747, 329, 1960.
52. Sekiguchi M., Cohen S. S. J. Biol. Chem. 238, 349, 1963.
53. Sinsheimer R. L. J. Mol. Biol, 1, 37, 1959.
54. Slizynska H. Proc. Roy. Soc., Edinburgh B, 66, 288, 1957.

-
55. Slizynska H. Genetical Res. 4, 248, 1963.
 56. Sobels F. H. Amer. Naturalist 88, 109, 1954.
 57. Sobels F. H. Nature, 4517, 979, 1956.
 58. Stachelin M. Experientia 15, 413, 1959.
 59. Stollar D. and Grossman L. J. Molec. Biology 1, 31, 1962.
 60. Westergaard M. Experientia, 13, 224, 1957.
 61. Woodhouse D. L. Nature, 4800, 336, 1961.