

Л. П. ГАВРИЛОВА, В. Э. КОТЕЛЯНСКИЙ

«НЕЭНЗИМАТИЧЕСКАЯ» ТРАНСЛЯЦИЯ ОЛИГОУРИДИЛАТОВ РАЗЛИЧНОЙ ДЛИНЫ

(Представлено академиком А. С. Спириным 14 XI 1974)

Было показано, что в определенных условиях в бесклеточной системе рибосомы *Escherichia coli* в присутствии полиуридиловой кислоты (полиУ) и фенилаланил-тРНК могут синтезировать олиго- и полифенилаланиновые пептиды без участия белковых факторов элонгации (EF-T и EF-G) и ГТФ (¹⁻⁶). Было сделано заключение, что в данном случае полиУ-зависимое «неэнзиматическое» связывание фенилаланил-тРНК с рибосомой и последующая транспептидация, катализируемая самой рибосомой, дополняются спонтанной, или «неэнзиматической», транслокацией, и в целом это создает «неэнзиматическую» трансляцию полиУ.

Однако до сих пор в литературе не было прямых доказательств того, что вышеуказанный синтез олиго- и полифенилаланина в рибосомах без факторов элонгации и ГТФ действительно сопровождается реальной транслокацией. Транслокация должна включать в себя переход пептидил-тРНК из А-участка рибосомы в Р-участок и сопряженное перемещение матричного полинуклеотида на один триплет (⁷). Можно рассмотреть две мыслимые альтернативы этого нормального механизма. 1. Так как используемый матричный полинуклеотид (полиУ) является гомополимером, то не исключено «проскальзывание» антикодона тРНК (фенилаланиновой тРНК) вдоль матрицы, и тогда после образования пептидной связи пептидил-тРНК переходит из А-участка в Р-участок (транслоцируется), но матричный полинуклеотид может не перемещаться. 2. После образования пептидной связи новообразованная пептидил-тРНК может вообще «вывалиться» из А-участка рибосомы в окружающую среду, а затем вновь связаться с рибосомой, но на этот раз по ее Р-участку; тогда тоже не произойдет никакого перемещения матричного полинуклеотида. В обоих случаях длина полипептидов не будет соответствовать длине матричного полинуклеотида, и лишь при нормальном механизме транслокации число аминокислотных остатков в синтезируемом пептиде не должно превышать числа троек нуклеотидов в матричном полинуклеотиде.

В настоящей работе впервые изучена связь между длиной матричных олигоуридилатов и величиной олигофенилаланинов, синтезируемых в «неэнзиматической» системе трансляции.

Рибосомы получали из бактерий *E. coli* MRE-600, как описано ранее (⁸). Рибосомные 30 S и 50 S субчастицы выделяли путем зонального центрифугирования в сахарозном градиенте в присутствии 0,5 M NH₄Cl с 0,001 M MgCl₂ (⁹). В экспериментах по «неэнзиматической» трансляции реакционную смесь готовили на буфере, состоящем из 0,01 M трис-HCl, 0,013 M MgCl₂, 0,10 M KCl и 10⁻⁴ M пара-хлормеркурибензоата, рН₂₀₀ 7,1. В пробе объемом 0,05 мл содержалось 13 мкг 30 S субчастиц, 26 мкг 50 S субчастиц, 20 мкг матричных олигонуклеотидов (pU)_n и 60 мкг аминокислотированной тРНК. Набор олигонуклеотидов (олигоуридилатов) различной длины был приготовлен и любезно предоставлен нам С. К. Василенко (Новосибирский государственный университет). В качестве аминокислотированной тРНК использовали препарат тотальной тРНК *E. coli* MRE-600,

ферментативно ацилированной ^{14}C -фенилаланином (513 С/моль, «Амершешем», Англия). Удельная активность ^{14}C -фенилаланил-тРНК была 850 пмоля ^{14}C -фенилаланина на 1 мг тРНК. Инкубацию реакционной смеси проводили в течение 5 час. при 25° , после чего определяли радиоактивность нерастворимого в горячей трихлоруксусной кислоте полифенилаланина (^{3, 5}). Разделение и анализ олигофенилаланинов проводили с помощью хроматографии на бумаге, как описано ранее (³). На рис. 1 пока-

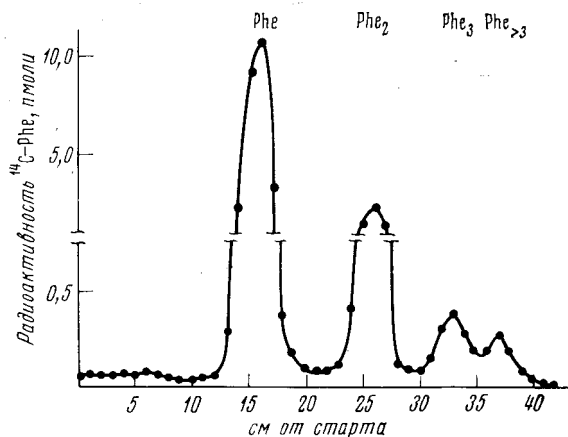


Рис. 1. Распределение радиоактивных продуктов «неэнзиматической» трансляции $(\text{pU})_{12}$ при хроматографии на бумаге. Хроматографию проводили в растворителе *n*-бутанол (насыщенный аммиаком) — этилацетат (40 : 10) в течение 12 час. при 20°

зано типичное разделение олигофенилаланинов. Результаты опытов по «неэнзиматической» трансляции олигоуридилатов $(\text{pU})_n$ в присутствии 10^{-4} M пара-хлормеркурибензоата приведены в табл. 1.

Из табл. 1 видно, что при использовании тринуклеотида в качестве матрицы существенного синтеза пептидов в рибосомах не наблюдается. Гексануклеотид $(\text{pU})_6$, добавленный в «неэнзиматическую» систему трансляции, приводит к значительному синтезу дифенилаланина, но трифенилаланина не образуется. Трифенилаланин появляется в небольших количествах при использовании $(\text{pU})_8$ и уже в существенных количествах — при использовании $(\text{pU})_{\geq 9}$ в качестве матрицы. Синтез длинных полифенилала-

Таблица 1

Продукты «неэнзиматической» трансляции олигоуридилатов различной длины

Матричный олигонуклеотид	ТХУ-растворимые пептиды: радиоактивность ^{14}C -Phe, пмол.		ТХУ-нерастворимые пептиды: радиоактивность ^{14}C -Phe, пмол.
	Phe ₂	Phe ₃	
Нет	0	0	0
$(\text{pU})_3$	0,50	0	0,03
$(\text{pU})_6$	5,71	0,05	0,04
$(\text{pU})_8$	5,42	0,31	0,07
$(\text{pU})_9$	5,35	0,67	0,10
$(\text{pU})_{10}$	6,02	0,96	0,10
$(\text{pU})_{11}$	5,65	0,96	0,15
$(\text{pU})_{12}$	5,81	1,13	0,20
$(\text{pU})_{14-15}$	5,90	1,83	2,17
$(\text{pU})_{20}$	3,73	1,85	5,89
ПолиУ	3,74	1,21	14,25

нинов ($Phe > 4$), нерастворимых в горячей трихлоруксусной кислоте, наблюдается при использовании $(pU)_{\geq 14-15}$ и практически отсутствует с более короткими матрицами. Таким образом, в бесклеточной системе «неэнзиматической» трансляции, активируемой пара-хлормеркурибензоатом, величина синтезируемых олигофенилаланинов соответствует длине используемых олигоуридилатов.

Наиболее важным результатом представленных данных является тот факт, что при использовании гексануклеотида $(pU)_6$ в качестве матрицы дипептид образуется по крайней мере в 85% активных рибосом системы (как можно легко рассчитать из сопоставления всех колонок таблицы), но трипептид не образуется вовсе. Это однозначно говорит о том, что переход дипептидил-тРНК из А-участка в Р-участок рибосомы не может совершиться без нормальной транслокации, сопряженной с перемещением матричного олигонуклеотида, даже за 5 час. инкубации системы. Следовательно, уже этот результат исключает как механизм «проскальзывания» антикодона тРНК вдоль матрицы при перемещении из А-участка в Р-участок в рибосоме, так и механизм перехода из А-участка в Р-участок через среду.

Полным подтверждением нормального механизма транслокации в рассматриваемой системе являются результаты опытов с олигонуклеотидами $(pU)_9$, $(pU)_{10}$ и $(pU)_{11}$: именно здесь, во всех случаях, где имеется всего три кодирующих триплета нуклеотидов, наблюдается существование трипептидов и не наблюдается пептидов большей длины. (Образование некоторого количества трипептидов в случае $(pU)_8$ не противоречит вышесказанному, так как 3'-концевая двойка нуклеотидов без 2'(3')-фосфата тоже может, хотя и гораздо менее эффективно, чем триплет, связывать аминоксил-тРНК в А-участке рибосомы (8).)

Наконец, существенное образование пептидов с длиной более 4 остатков, нерастворимых в трихлоруксусной кислоте, можно наблюдать только с матрицами, содержащими более 4 триплетов нуклеотидов — $(pU)_{14-15}$, $(pU)_{20}$ и далее.

Таким образом, в системе «неэнзиматической» трансляции полиУ, так же как и в полной «энзиматической» бесклеточной системе, переход новообразованной пептидил-тРНК из А-участка рибосомы в Р-участок (транслокация тРНК) происходит строго сопряженно с перемещением матричного полинуклеотида на один триплет (транслокация матрицы), т. е. реализуется нормальный рибосомный механизм транслокации.

Авторы приносят глубокую благодарность А. С. Спирину за постоянное внимание и за детальное обсуждение результатов работы и рукописи. Особую благодарность авторы приносят С. К. Василенко за предоставление всего необходимого набора матричных олигонуклеотидов и Д. Г. Кнорре за содействие в проведении работы.

Институт белка
Академии наук СССР
Пущино-на-Оке

Поступило
14 XI 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ S. Pestka, J. Biol. Chem., v. 243, 2810 (1968). ² S. Pestka, J. Biol. Chem., v. 244, 1533 (1969). ³ Л. П. Гаврилова, В. В. Смолянинов, Мол. биол., т. 5, 883 (1974). ⁴ L. P. Gavrilova, A. S. Spirin, FEBS Letters, v. 17, 324 (1974). ⁵ Л. П. Гаврилова, А. С. Спиринов, Мол. биол., т. 6, 311 (1972). ⁶ Л. П. Гаврилова, А. С. Спиринов, Журн. эволюцион. биохим. физиол., т. 9, 3 (1973). ⁷ А. С. Спиринов, Л. П. Гаврилова, Рибосома, «Наука», 1971. ⁸ M. Nirenberg, P. Leder, Science, v. 145, 1399 (1964).