

Е. С. БОЧКАРЕВА, В. Г. БУДКЕР, А. С. ГИРШОВИЧ,
член-корреспондент АН СССР Д. Г. КНОРРЕ, Н. М. ТЕПЛОВА

ПОЛУЧЕНИЕ N-АЦИЛФЕНИЛАЛАНИЛ-тРНК С АЛКИЛИРУЮЩИМИ ГРУППАМИ КАК ВОЗМОЖНЫХ «АДРЕСОВАННЫХ» АГЕНТОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ПЕПТИДИЛ-ТРАНСФЕРАЗНОГО ЦЕНТРА РИБОСОМ

Важнейшей задачей в изучении детального механизма биосинтеза белка на рибосоме является выяснение функциональной топографии последней, т. е. установление участия отдельных молекул рибосомальных белков и молекулы рибосомальной РНК в формировании того или иного каталитического центра рибосомы. Одним из таких центров является пептидил-трансферазный центр, ответственный за связывание аминоктил- и пептидил-тРНК и образование пептидной связи.

Для исследования пептидил-трансферазного центра рибосом может быть использован один из наиболее информативных методов биохимического анализа — метод «адресованной» химической модификации (affinity-labeling), применяемый для специфического мечения активного центра ферментов (¹⁻³) и др.), специфичных белков биомембран (^{4,5}), антител (^{6,7}) и пр. Сущность этого метода заключается в использовании субстрата, содержащего химически активную группировку. В этом случае субстрат, образующий специфический комплекс с ферментом, играет роль своеобразного «адреса» для химической модификации тех или иных функциональных групп активного центра фермента. В настоящее время разрабатывается метод «адресованной» химической модификации нуклеиновых кислот, основанный на принципе комплементарности олигонуклеотидного агента, адресованного к определенному участку молекулы нуклеиновой кислоты (⁸).

В приложении к рибосомам метод «адресованной» химической модификации значительно усложняется необходимостью использования «адресованных» агентов полимерной природы, поскольку основные компоненты биосинтеза белка на рибосоме (тРНК, информационная РНК) являются полимераами с молекулярным весом 25 000 и выше.

В настоящем сообщении описано получение двух «адресованных» пептидил-трансферазному центру рибосомы агентов, несущих активную алкилирующую группировку — N-подацетил-С¹⁴-фенилаланил-тРНК (I) и N-хлорамбуцил*-С¹⁴-фенилаланил-тРНК (II). В качестве маркера использован С¹⁴-фенилаланин с удельной радиоактивностью 80 мС/ммоль (ЧССР). тРНК из *E. coli* MRE-600 получена по методу (⁹). Аминоацилирование тРНК С¹⁴-фенилаланином проводили по стандартной методике (¹⁰). Рибосомы из *E. coli* MRE-600 выделяли методом (¹¹). Комплекс аминоктил- и N-ациламиноацил-тРНК с рибосомой получали по Ниренбергу и Ледеру (¹²). Хлорамбуцил любезно предоставлен О. В. Кильдишевой (Институт элементоорганических соединений АН СССР).

I получена обработкой С¹⁴-фенилаланил-тРНК (3—5 мг/мл, 6—10 μ М тРНК^{Фен}) хлорангидридом подоуксусной кислоты (5 ммол.) в 0,02 М вероналовом буфере, pH 7, содержащем 5% диметилформамида, при 0° в течение 30 мин. Выход I, определенный по методу (¹³), составлял 85—90%. Эта методика была нами ранее описана (¹⁴) на примере синтеза N-ацетил-фенилаланин-тРНК из фенилаланил-тРНК и уксусного ангидрида. Замена

* Хлорамбуцил — *n*-ди-(2-хлорэтил)-аминофенилмасляная кислота.

ангидрида на хлорангидрид при получении I обусловлена легкой доступностью последнего. II получена обработкой C^{14} -фенилаланил-тРНК (1 мг/мл, 2 μ М тРНК^{Фен}) N-оксисукцинимидным эфиром хлорамбуцила* (25 ммол.) по методу Лапидота и др. (15) в присутствии 0,1 М NaCl. Выход II, определенный аналогично I, составлял 90–95%. Наличие в препарате I активной алкилирующей группы (85–90%) подтверждено реакцией с цистеином и аминогруппой аминоклетчатки. По данным отщепления хлор-аниона в хлорамбуциле, выдержанном в условиях синтеза II, препарат II содержит 95% активного хлора.

Полученные препараты были проанализированы по следующим двум параметрам: а) уменьшение эффективной концентрации реагентов вследствие «самоалкилирования» тРНК в условиях образования комплекса с рибосомой и б) функциональная активность I и II. Возможность «самоалкилирования» I и II оценивали в стандартных условиях образования комплекса с рибосомой (25°, 0,1 М триэтанолламин, рН 7,4, 0,02 М $Mg(NO_3)_2$, 0,05 М KNO_3 , (12)) в течение 40 мин. для I и 4 час. для II. После выдерживания в этих условиях препараты гидролизировались панкреатической рибонуклеазой** и хроматографировались на ДЭАЭ-целлюлозе. В обоих случаях основная масса радиоактивности (98% для I и 85–90% для II) элюировалась водой (N-ацил- C^{14} -фенилаланиладенозин). Наличие радиоактивности в элюате при промывке колонки 0,1 М и более концентрированным раствором NaCl должно указывать на алкилирование внутренних участков тРНК. Для I «самоалкилирование» в выбранных условиях практически отсутствует (2–3%), для II оно также мало, хотя и более ощутимо (10–15% от внесенной радиоактивности).

Фенилаланилакцепторная активность препаратов тРНК, выдержанных в условиях синтеза I, а также полученных после удаления N-хлорамбуцил- C^{14} -фенилаланина (2 М трис-HCl, рН 8,9, 37°, 1 час**) для II, оказалась идентичной активности нативной тРНК. По гидроксаматному тесту (16) отсутствует иодацетилирование 2'-гидроксильных полирибозофосфатного остова тРНК. Полученные после приведенной обработки и аминокислотированные C^{14} -фенилаланином препараты тРНК давали специфичный комплекс с рибосомой в присутствии полиуридиновой кислоты (матрицы), идентичный по проценту связанной C^{14} -фенилаланил-тРНК необработанным образцам тРНК. Таким образом, в ходе синтеза I и II тРНК полностью сохраняет свою функциональную активность.

Препараты I и II образуют комплекс с рибосомой в стандартных условиях (12). Как и в случае обычно применяемой N-ацетилфенилаланил-тРНК (14, 17), имеет место стимулирующий эффект полиуридиновой кислоты (поли-У, рис. 1), а также ингибирующее влияние неаминоацелированной тРНК. По предварительным данным, в условиях образования комплекса с рибосомой имеет место алкилирование последней.

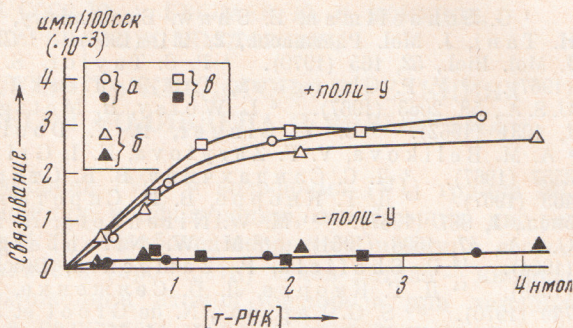


Рис. 1. Образование комплекса N-ацил- C^{14} -фенилаланил-тРНК с рибосомами из *E. coli* MRE-600 в условиях Ниренберга, Ледера (12). а — N-ацетил- C^{14} -фенилаланил-тРНК, б — I; в — II

* N-оксисукцинимидный эфир хлорамбуцила синтезирован М. И. Ривкиным (будет опубликовано позднее).

** Во избежание дополнительного «самоалкилирования» обработку рибонуклеазой и 2 М трис-HCl проводили в присутствии 0,1 М цистеина, активного акцептора алкильных групп.

Таким образом, полученные препараты N-иодацетилфенилаланил-тРНК и N-хлорамбуцилфенилаланил-тРНК, содержащие активные алкилирующие группы, могут быть использованы для решения проблемы функциональной топографии рибосом.

Новосибирский институт органической химии
Сибирского отделения Академии наук СССР

Поступило
17 V 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ G. Schoellman, E. Shaw, *Biochemistry*, **2**, 252 (1963). ² B. Belleau, H. Tani, *J. Mol. Pharmacol.*, **2**, 411 (1966). ³ C. Y. Bruton, B. S. Hartley, *J. Mol. Biol.*, **52**, 165 (1970). ⁴ P. S. Taylor, S. Y. Singer, *Biochemistry*, **6**, 881 (1967). ⁵ Y. P. Changeux, T. R. Podleski, L. Wofsy, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **58**, 2063 (1967). ⁶ L. Wofsy, H. Metzger, S. Y. Singer, *Biochemistry*, **1**, 1031 (1962). ⁷ S. Y. Singer, R. F. Doolittle, *Science*, **153**, 13 (1966). ⁸ A. M. Belikova, V. F. Zarytova, N. I. Grineva, *Tetrahedron Letters*, № 37, 3557 (1967). ⁹ Л. С. Сандахчиев, В. К. Старостина и др., *Молек. биол.*, **1**, 463 (1967). ¹⁰ Д. Г. Кнорре, В. И. Сиротюк, Л. Е. Стефанович, *Молек. биол.*, **1**, 837 (1967). ¹¹ M. W. Nirenberg, H. Matthaei, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **47**, 1598 (1961). ¹² M. W. Nirenberg, P. Leder, *Science*, **145**, 1399 (1964). ¹³ P. Shofield, P. Zamesnik, *Biochim. et biophys. acta*, **155**, 410 (1968). ¹⁴ Д. Г. Кнорре, Л. П. Сенженко, Н. М. Теплова, *Молек. биол.*, **4**, 749 (1970). ¹⁵ S. G. Lapidot, N. de Groot et al., *Biochim. et biophys. acta*, **149**, 532 (1967). ¹⁶ Д. Г. Кнорре, Н. М. Пустошилова и др., *Биохимия*, **30**, 1218 (1965). ¹⁷ J. Lucas-Lenard, F. Lipmann, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **57**, 1050 (1967).