

Б. П. ГОТТИХ, А. А. КРАЕВСКИЙ, Т. Л. ЦИЛЕВИЧ,  
М. К. КУХАНОВА, А. Д. ТРЕБОГАНОВ

## ПРИНЦИПАЛЬНАЯ ВОЗМОЖНОСТЬ НЕФЕРМЕНТАТИВНОГО АМИНОАЦИЛИРОВАНИЯ ТРАНСПОРТНЫХ РИБОНУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

(Представлено академиком В. А. Энгельгардтом 26 VII 1974)

Вопросу механизма аминоацилирования транспортных РНК (тРНК) в процессе биосинтеза белков посвящено значительное количество работ (<sup>1</sup>). Этот вопрос интересен не только сам по себе, так как присоединение аминокислот к специфическим для них тРНК имеет весьма существенное значение для последующего синтеза белковых молекул в рибосомах (<sup>2</sup>), но и с точки зрения поиска условий и агентов, которые бы позволили осуществить прямой химический синтез аминоацил-тРНК. Возможен и альтернативный подход: исследование проблемы неферментативного аминоацилирования тРНК может дать информацию, позволяющую допустить или предсказать тот или иной химический механизм ферментативного синтеза аминоацил-тРНК, осуществляемого аминоацил-тРНК-синтетазами (КФ.6.1.1).

Химический синтез аминоацил-тРНК давал бы возможность получить «гибридные» молекулы, в которых аминокислоты связаны с неспецифическими для них тРНК в любых желаемых комбинациях. Интерес к такого рода соединениям вполне понятен и отдельные «гибриды», полученные в результате модификации ферментативного синтеза рибонуклеотидов тРНК (<sup>2</sup>), либо ферментативного аминоацилирования тРНК в гетерологичных системах (<sup>3</sup>), были использованы в ряде работ для решения некоторых ключевых вопросов биосинтеза белка (<sup>2, 4</sup>).

Попытки химического синтеза аминоацил-тРНК длительное время не приводили к успеху, что объясняется химической полифункциональностью тРНК. Наиболее перспективным оказался метод, основанный на активации аминокислот в форме имидазолидов. В найденных очень мягких условиях реакции удавалось избежать аминоацилирования оснований и фосфатных остатков (<sup>5, 6</sup>). Однако полной селективности аминоацилирования по акцепторному концу тРНК достигнуть не удалось. И хотя в образующейся смеси продуктов аминоацилирования тРНК посредством различного рода доказательств можно считать установленным наличие определенного количества искомым аминоацил-тРНК (<sup>7-9</sup>), до настоящего времени не имелось данных, подтверждающих принципиальную возможность получить биологически активные аминоацил-тРНК путем прямого химического синтеза.

В то же время весьма серьезными были опасения, не нарушается ли необратимо в условиях химического эксперимента конформация тРНК. Приходилось также считаться и с предположением о том, что конформация тРНК каким-то образом может изменяться при взаимодействии ее с аминоацил-тРНК-синтетазой во время энзиматического аминоацилирования. При допущении такой возможности попытки химического аминоацилирования были практически обречены на провал, ибо они приводили бы к синтезу соединений, биологически не активных.

Для испытания биологической активности получаемых в результате химического синтеза аминоацил-тРНК мы использовали в качестве теста

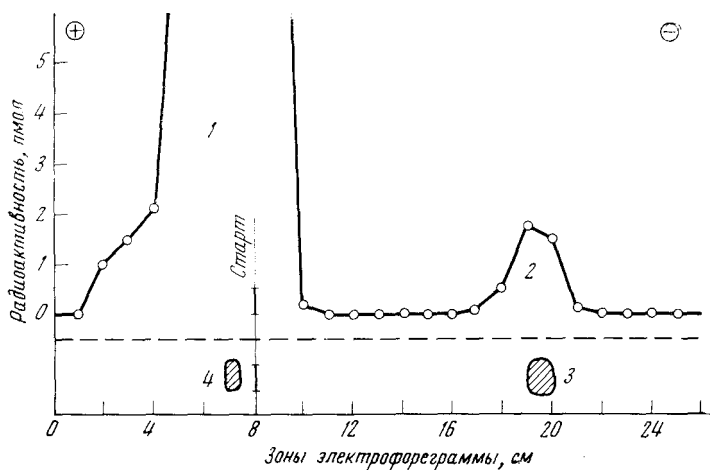


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов рибонуклеазного гидролиза Ac-[<sup>14</sup>C]Met-тРНК. 1 — зона радиоактивности нуклеотидов и олигонуклеотидов (неспецифическое присоединение аминокислоты), 2 — Ac-[<sup>14</sup>C]Met-аденозин, 3 — синтезированный AcMet-аденозин, 4 — Ac-[<sup>14</sup>C]-метионин

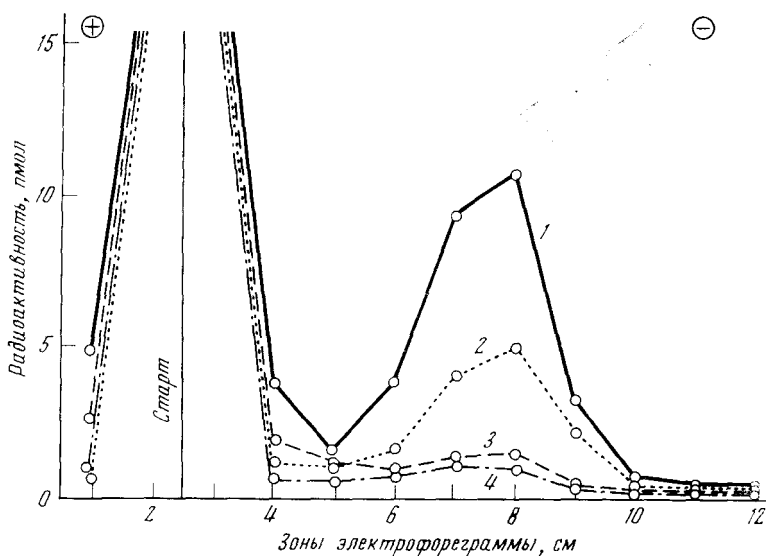


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов взаимодействия Ac-[<sup>14</sup>C]-Met-тРНК с пурамином в рибосомах (этилацетатный экстракт). 1 — полная система с удвоенным количеством исходной Ac-[<sup>14</sup>C]Met-тРНК, 2 — полная система, 3 — полная система + хлорамфеникол, 4 — полная система без пурамицина (цифровой материал приведен в табл. 1)

хорошо известную реакцию ациламиноацил-тРНК с пурамином, осуществляемую рибосомами в безматричной системе *in vitro* (<sup>10</sup>). Суммарную тРНК из пекарских дрожжей обрабатывали имидазолдом трифторацетата *L*-метионина (уд. радиоактивность 59 мС/ммоль, Amarcham, Англия), полученным из 0,5 мС исходного препарата по (<sup>11</sup>). Условия конденсации имидазолида трифторацетата метионина (2,5 часа, 20°, водная среда) описаны ранее (<sup>8</sup>, <sup>12</sup>); в реакцию вводили 9,3 мкмол. аминокислоты и 1 мкмол. тРНК. Выход метионил-тРНК составил 114% (за 100% взят расчет — один аминокислотный остаток на одну молекулу тРНК), что составило  $2,7 \cdot 10^5$  имп/мин на 1 о. е.<sub>260</sub>. Затем смесь продуктов реакции после от-

Реакция ацетил-[<sup>14</sup>C]-аминоацил-тРНК (Ac-AA-тРНК) с пурамицином в рибосомах

Ac-AA-тРНК		Примеси на электрофореграмме (стартовая зона), имп/мин	Зона Ac-AA-пурамицина на электрофореграмме, имп/мин	Контроль, имп/мин		Перенос на пурамицин в опыте, % от взятой метки	Специфичность аминоацилирования (по сравнению с природной AcPhe-тРНК), %
AA в препарате	Внесено в опыт, имп/мин			полная система + хлорамфеникол	полная система — пурамицин и — этанол		
L—Met	1,1·10 <sup>6</sup>	85400	7920	750	612	0,67	6,5—7
	1,2·10 <sup>6</sup>	43000	7650	1839	862	0,57	5,7—6
	664·10 <sup>3</sup>	22000	4355	—	—	0,60	6—6,5
L—Phe *	46·10 <sup>3</sup>	—	3310	470	70	7,2	100
	37·10 <sup>3</sup>	—	3680	—	—	9,9	100

\* Контрольный образец Ac-[<sup>14</sup>C]Phe-тРНК, полученный ферментативно.

деления от непрореагировавшей аминокислоты ацетилировали ацетил-N-оксисукцинимидом (<sup>13</sup>). В этих условиях ацетилируются только аминокислотные остатки. В полученных препаратах определяли специфичность аминоацилирования по акцепторному концу тРНК. Для этого аликвоту препарата гидролизвали в воде в присутствии избытка очищенной панкреатической рибонуклеазы (30 мин., 20°). Продукты реакции подвергали электрофорезу на бумаге Ватман № 1 в 6% уксусной кислоте, 800 в, 1,5 часа, плотность тока 22 в/см. Зону, соответствующую 2'(3')-O-ацетилметионил-аденозину (подвижность по глицину 0,85, что предварительно найдено с использованием специально синтезированного свидетеля) просчитывали на радиоактивность (рис. 1).

Полученная в результате такого определения специфичность аминоацилирования по акцепторному концу тРНК составляла 3—4% (например, 3040 имп/мин от суммарной радиоактивности 89720 имп/мин). Эти данные значительно ниже ранее сообщенных нами (<sup>9—11</sup>) и определенных другим методом. Различие в специфичности реакции можно объяснить несколькими причинами, но главным образом тем, что ввиду трудности работы с ограниченными количествами радиоактивных аминокислот условия реакции не были оптимальными. Следует также добавить, что прежде мы не имели опыта работы с имидазolidом метионина, но для наших экспериментов были вынуждены использовать именно метионин в связи с высокой пептидонорной активностью ацилметиониновых производных в рибосомах (<sup>10</sup>).

Пептидонорная активность синтезированных препаратов (перенос остатка ацетилметионина из AcMet-тРНК на пурамицин) проверялась в безматричной системе с рибосомами *E. coli* MRE-600 известным способом (<sup>10, 14</sup>). Рибосомы очищали по (<sup>15</sup>). Инкубационная смесь содержала в объеме 0,22 мл: 0,06 M трис-HCl буфер, pH 7,6 (0°), 0,38 M KCl, 0,019 M MgCl<sub>2</sub>, 0,001 M пурамицина, 10 о.е.<sub>260</sub> рибосом и Ac-[<sup>14</sup>C]-аминоацил-тРНК в количестве, указанном в табл. 1.

Реакцию начинали добавлением 0,1 мл этанола и инкубировали 1 час при 20°. К реакционной смеси добавляли 0,4 мл 1 M KOH, оставляли на 2 часа при 37°, продукты реакции экстрагировали 5 мл этилацетата, органический слой высушивали Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, концентрировали до объема около 0,2 мл и подвергали электрофорезу на бумаге Ватман № 1 в 6% AcOH (pH 2,5) 1,5 часа, 800 в, плотность тока 22 в/см. Электрофореграмму просчитывали в толуольном сцинтилляторе на счетчике SL-30 (Интертекник, Франция). При изучении ингибирования реакции образования ацетил-аминоацилпурамицина хлорамфениколом, концентрация последнего в инкубационной массе составляла 0,001 M.

Обработку инкубационной смеси 1N КОН дополнительно к обычно принятой очистке проводили для более тщательного отделения продуктов реакции от примесей, возникающих в результате неспецифических реакций, главным образом из-за нуклеазных деградаций. В качестве контроля использовали полученную ферментативно AcPhe-тРНК. Зона, соответствующая ацетиламиноацил-пуромидину, на электрофореграммах определялась с помощью синтетических свидетелей (рис. 2).

Как видно из рис. 2 и табл. 1, на электрофореграммах найдено вещество, соответствующее по подвижности ацетилметионил-пуромидину. В то же время в присутствии антибиотика хлорамфеникола, ингибирующего перенос пептида на пуромидин (<sup>10</sup>), количество этого вещества резко уменьшилось. Еще более значительное уменьшение радиоактивного материала в зоне ацетилметионил-пуромидина показано в контроле, когда в инкубационной смеси отсутствовали пуромидин и этанол. Все это говорит, что в опытах тестировалось катализируемое рибосомами образование ацетилметионил-пуромидина. Таким образом, испытанный препарат AcMet-тРНК обладал пептидонорной активностью в бесклеточной системе с рибосомами в условиях реакции без матрицы. По этому тесту специфичность реакции аминоацилирования по акцепторному концу тРНК составляла 5—7%.

Результаты данной работы доказывают принципиальную осуществимость прямого химического аминоацилирования тРНК и получения таким образом желаемых «гибридов» аминокислот с тРНК независимо от их аминокислотной специфичности. Конечно, предлагаемый нами путь требует еще значительного усовершенствования не только на стадии проведения химической реакции, но и (что весьма существенно) на этапе разделения получаемой смеси продуктов и выделения аминоацил-тРНК с сохранением биологической активности последней. Кроме того, возможность использования имидазолов аминокислот для аминоацилирования тРНК является еще одним аргументом в пользу гипотезы о химическом механизме ферментативного синтеза аминоацил-тРНК (<sup>16</sup>), при постулировании которой авторы исходили, в частности, из данных многочисленных экспериментов с имидазолидами аминокислот.

Институт молекулярной биологии  
Академии наук СССР  
Москва

Поступило  
21 VII 1974

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> Л. Л. Киселев, В сб.: Молекулярные основы биосинтеза белков, «Наука», 1971.  
<sup>2</sup> Ф. Шанвиль, Молекулярная биология, проблемы и перспективы, «Наука», 1964, стр. 117. <sup>3</sup> J. Bonnet, J.-P. Ebel, FEBS Letters, v. 39, 259 (1974). <sup>4</sup> D. Kern, R. Giege, J.-P. Ebel, Europ. J. Biochem., v. 31, 148 (1972). <sup>5</sup> А. А. Краевский, П. П. Пурыгин и др., Изв. АН СССР, сер. хим., 1968, 378. <sup>6</sup> В. Р. Gottikh, А. А. Kravetsky et al., Tetrahedron, v. 26, 4419 (1970). <sup>7</sup> Б. П. Готтих, А. А. Краевский и др., Молекулярная биология, т. 1, № 5, 767 (1967). <sup>8</sup> Б. П. Готтих, А. А. Краевский и др., Изв. АН СССР, сер. хим., 1970, 113. <sup>9</sup> Т. Л. Цилевич, А. А. Краевский, Б. П. Готтих, Изв. АН СССР, сер. хим., 1971, 811. <sup>10</sup> R. E. Monro, J. Cerna, K. A. Marker, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., v. 61, 1042 (1969). <sup>11</sup> А. А. Краевский, П. П. Пурыгин, Б. П. Готтих, Изв. АН СССР, сер. хим., 1971, 2028. <sup>12</sup> Б. П. Готтих, А. А. Краевский, П. П. Пурыгин, Изв. АН СССР, сер. хим., 1971, 2529. <sup>13</sup> Y. Lapidot, N. de Groot, I. Fry-Shajrir, Biochim. et biophys. acta, v. 145, 292 (1968). <sup>14</sup> G. C.-H. Mao, Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 52, 595 (1973). <sup>15</sup> J. L. Lessard, S. Pestka, J. Biol. Chem., v. 247, 6901 (1972). <sup>16</sup> А. А. Краевский, Л. Л. Киселев, Б. П. Готтих, Молекулярная биология, т. 7, № 5, 796 (1973).