

**ТРАНСПОРТНЫЕ
РИБОНУКЛЕИНОВЫЕ
КИСЛОТЫ**

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР
ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ

ТРАНСПОРТНЫЕ РИБОНУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ
СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИИ

Под общей редакцией
чл.-кор. АН УССР Г. Х. Мацук

ИЗДАТЕЛЬСТВО «НАУКОВА ДУМКА»
КИЕВ — 1976

УДК 547.963.3;547.963.32;577.1

В монографии дан критический анализ современных методов выделения суммарных препаратов и индивидуальных транспортных РНК из различных биологических объектов. Рассмотрены данные о первичной структуре, пространственной конфигурации и физико-химических свойствах тРНК. Большое внимание уделено обсуждению современных представлений об акцепторной и адапторной функциях тРНК, взаимодействию их с аминоксил-тРНК-синтетазами и участию в процессах регуляции биосинтеза белка. Описана роль олиговалентных катионов в каталитической функции аминоксил-тРНК-синтетаз. Рассмотрены современные физические методы изучения тРНК.

Расчитана на биологов всех специальностей, аспирантов и студентов биологических факультетов вузов.

Авторы

Г. Х. Мацука, А. В. Ельская, М. И. Коваленко, А. И. Корнелюк

Рецензенты

д-р мед. наук З. А. Бутенко, д-р мед. наук В. Н. Окунев

Редакция физиологии, биохимии и медицины

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений	4
Введение	5
Глава 1	
Получение препаратов суммарных и индивидуальных транспортных РНК	7
Глава 2	
Образование аминоксил-тРНК	41
Глава 3	
Роль олиговалентных катионов в реакции аминокислирования тРНК	69
Глава 4	
Биологически активные и неактивные тРНК	86
Глава 5	
Конформационные изменения тРНК, не влияющие на ее биологические свойства	119
Глава 6	
Современные представления о регуляторной функции тРНК на уровне трансляции	125
Глава 7	
Физические методы исследования структуры транспортных РНК	168

СПИСОК СОКРАЩЕНИЯ

ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота

РНК — рибонуклеиновая кислота

тРНК, рРНК, иРНК — соответственно транспортная, рибосомальная, информационная РНК

тРНК^{Фен}, тРНК^{Тир} — тРНК, специфичная к фенилаланину, тирозину

тРНК^{Трп}, тРНК^{Сер} и т. д. — тРНК, специфичная к триптофану, серину и т. д.

тРНК₁^{Фен}, тРНК₂^{Фен} и т. д. — тРНК^{Фен} первая, тРНК^{Фен} вторая и т. д.

тРНК_ф^{Мет} — формилметиониновая тРНК

A, G, C, U, T — соответственно, аденин, гуанин, цитозин, урацил, риботимидин

m¹A, m²C, m⁵C, m²G — 1-метиладенозин, 2-метилцитидин, 5-метилцитидин, 2-диметилгуанозин

ОмеN — нуклеозиды, метилированные по 2-ОН-группе рибозы

Y — минорный компонент из тРНК^{Фен}

T₁-рибонуклеаза — гуанил-рибонуклеаза

ВВЕДЕНИЕ

Среди всех известных видов нуклеиновых кислот транспортные РНК занимают особое место, являясь своеобразным «ключом» для считывания аминокислотного кода.

Структурные особенности тРНК заключаются в том, что у них сравнительно короткая нуклеотидная последовательность, большое число редко встречающихся минорных оснований, четкость построения первичной и вторичной структур, хорошо выражена жесткость третичной структуры. Отдельные участки тРНК выполняют строго определенную функциональную роль. У тРНК четко выражена функциональная специфичность: для каждой аминокислоты существует «семейство» тРНК, осуществляющих перенос одной и той же аминокислоты к определенному кодону.

Транспортные РНК выполняют две основные функции. Первая — акцепторная, заключается в том, что тРНК ковалентно связывается со «своей» аминокислотой, в результате чего образуется аминоацил-тРНК. Эту многостадийную реакцию осуществляет в каждом случае «свой» фермент — аминоацил-тРНК-синтетаза. Вторая функция тРНК — адапторная состоит в том, что тРНК в составе образовавшегося соединения — аминоацил-тРНК выступает в роли посредника — адаптора между аминокислотой и кодовым словом на мРНК. Аминокислота без тРНК не может «узнать» свой кодон.

Помимо этих двух основных функций тРНК участвует и в некоторых других процессах, например в переносе аминокислоты на акцепторные белки. В этой реакции аминоацил-тРНК-пептидилтрансфераза переносит аминокислоту от аминоацил-тРНК на N-концевую аминокислоту акцепторного белка. Транспортные РНК могут предохранять аминоацил-тРНК-синтетазы от терминирующей инактивации, влиять на точность работы аминоацил-тРНК-синтетазы при ошибочном активировании «чужих» аминокислот. Транспортные РНК входят в состав некоторых мембран, участвуют в синтезе липидов. тРНК являются субстратом примерно двух десятков ферментов, к которым относятся различные нуклеазы, метилазы, лигазы, трансферазы, ферменты, участвующие в процессинге (формирование окончательной биологически активной структуры из предшественников тРНК) и др. Транспортные РНК участвуют в регуляторных процессах биосинтеза белка на уровне трансляции. Все это дает основания рассматривать тРНК как необычный вид нуклеиновых кислот среди всех известных. Правда, эта необычность может быть кажущейся из-за того, что тРНК — наиболее изученные нуклеиновые кислоты. Это пока

единственный вид нуклеиновых кислот, первичная структура которых во многих случаях установлена.

Транспортные РНК были первыми среди других нуклеиновых кислот, которые удалось получить в кристаллическом виде, подвергнуть рентгеноструктурному анализу и установить третичную структуру. Функциональные свойства тРНК в значительной степени зависят от ее конформации. По-видимому, тРНК могут находиться в растворе в виде нескольких конформеров, часть которых биологически активна, а часть — биологически неактивна. Интересно, что переход в биологически неактивную форму обратим и в значительной степени зависит от присутствия двухвалентных катионов.

Исследования в области тРНК ведутся главным образом на микробиальных объектах и на дрожжах. Транспортные РНК животных как объект исследований пока еще имеют сравнительно небольшой удельный вес в лабораториях мира. Это видно хотя бы из того факта, что среди изученных первичных структур тРНК бактерий и дрожжей насчитывают примерно шесть десятков, а тРНК животных всего единицы. Такая ситуация отражает разные методические возможности при установлении последовательности нуклеотидов тРНК различного происхождения. Методы расшифровки первичной структуры тРНК бактериального и дрожжевого происхождения не могут быть использованы по ряду причин для тРНК животных.

За последние годы число исследований первичных структур тРНК бактерий и дрожжей резко возросло. Такие работы ведутся у нас в стране. В предыдущие годы в лаборатории академика А. А. Баева была установлена последовательность нуклеотидов двух валиновых тРНК дрожжей. Работы по расшифровке первичных структур тРНК и методам их определения были обобщены в монографии Т. В. Венкстерн, которая явилась первой книгой в этой области знаний в мировой литературе и первой книгой у нас в стране, посвященной транспортным РНК.

Предлагаемая читателю публикация является попыткой обобщить исследования авторов, касающиеся некоторых аспектов структуры и функции транспортных РНК животных. Авторы изучали взаимосвязь молекулярных механизмов начальных этапов биосинтеза белка с разными функциональными состояниями организма, при которых резко меняется качество и количество синтезируемого белка. Такой подход дал возможность сопоставить функционально-физиологическое состояние организма с молекулярными процессами на уровне трансляции, в частности с функционально-структурным состоянием тРНК и аминоацил-тРНК-синтетаз.

Все сведения, изложенные в книге, основаны на опыте работы авторов и имеющихся литературных данных. Авторы будут признательны всем, кто пришлет свои замечания по поводу материалов, изложенных в книге.

Глава 1

ПОЛУЧЕНИЕ ПРЕПАРАТОВ СУММАРНЫХ И ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ТРАНСПОРТНЫХ РНК

Суммарная фракция транспортных рибонуклеиновых кислот представляет собой смесь индивидуальных специфических молекул, сходных по молекулярному весу и ряду физико-химических свойств, но отличающихся по составу и последовательности оснований в полинуклеотидной цепи. Интерес, проявляемый учеными различных направлений к изучению структуры и биологической функции, диктовал и развитие методов выделения тРНК из самых разнообразных объектов.

Принципиальная цель исследований по разработке методов выделения тРНК заключалась в том, чтобы найти способ, который удовлетворял бы таким требованиям, как техническая доступность, достаточный выход препарата, практическое отсутствие примесей различного характера, длительное сохранение биологической активности.

Все предложенные приемы можно разделить на три группы, первая из которых объединяет метод выделения тРНК из надосадочной жидкости после скоростного центрифугирования. После удаления последовательным центрифугированием из гомогената ткани ядер, микросомных частиц и рибосом тРНК остается в надосадочной жидкости. Тиссер [1] предложил метод получения тРНК *E. coli* депротеинизацией фенолом супернатанта после центрифугирования при $105\ 000 \times g$. Выход конечного продукта тРНК составлял приблизительно $100\ \text{мг}/100\ \text{г}$ сырой ткани.

Иной прием выделения тРНК из надосадочной жидкости после скоростного центрифугирования гомогената печени кролика использовали Кантони и сотр. [2]. Авторы сначала получали «рН5-фермент», из которого экстрагировали тРНК горячим раствором хлористого натрия. Выход тРНК составлял $50\ \text{мг}/\text{кг}$ ткани. Описанный метод не получил распространения вследствие незначительного выхода тРНК с низкой биологической активностью, что обусловлено деградацией полинуклеотидного материала в процессе выделения. Сравнительные исследования биологической активности препаратов тРНК, полученных фенольной депротеинизацией супернатанта после $105\ 000 \times g$ и отделением тРНК от высокомолекулярных РНК клетки $1\ \text{M NaCl}$, позволили прийти к выводу, что солевая экстракция может служить одним из методических приемов для выделения тРНК различного происхождения [3].

Комбинирование фенольной депротеинизации супернатанта после скоростного центрифугирования и хроматографии на ЭК-ТЕОЛА-целлюлозе позволило получить из дрожжей гомогенный

(по электрофоретическим исследованиям) препарат тРНК с коэффициентом седиментации S_{20}^0 равным 4,0 [4].

Описанный методический прием получения тРНК с использованием на начальных этапах ультрацентрифугирования технически не выгоден, так как требует длительной эксплуатации дорогостоящего оборудования и малоэффективен при выделении препаративных количеств тРНК.

Следующий прием заключается в прямой экстракции нуклеиновых кислот из ткани с последующим отделением тРНК от высокомолекулярных РНК различными методами — как солевой экстракцией, так и ионообменной хроматографией.

Обработывая фенолом клетки *E. coli*, Зубей [5] выделил тотальную РНК, из которой высаливанием холодным 1 М NaCl была получена тРНК. Препараты тРНК освобождали от примесей ДНК осаждением последней изопропанолом в присутствии ацетата натрия. Сходная процедура была применена Розенбаум и Брауном [6] для выделения тРНК из печени крыс.

При разработке методического приема выделения препаративных количеств тРНК из пасты *E. coli* были проведены сравнительные исследования метода солевого разделения суммарной РНК с последующей изопропанольной обработкой и хроматографического отделения тРНК на ДЭАЭ-целлюлозе.

Начальной стадией обоих методов была фенольная экстракция. Автор [7] пришел к выводу, что оба метода дают равноценную очистку препарата тРНК, однако в ряде случаев все-таки рекомендуют сочетать обработку изопропанолом с хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе.

Следует отметить, что приемы, сочетающие гомогенизацию ткани в присутствии фенола, ДЭАЭ-целлюлозную хроматографию и изопропанольное фракционирование, достаточно эффективны и позволяют получить препарат тРНК с хорошей биологической активностью.

Следующий подход при выделении тРНК заключается в прямой экстракции интактных клеток фенолом, т. е. клетки не разрушаются, а в присутствии фенола клеточные стенки действуют по примеру молекулярного сита, что позволяет экстрагировать в основном РНК с низким молекулярным весом [8]. Этот метод используется для выделения больших количеств тРНК из дрожжей. Монье [9] впервые предложил экстракцию РНК из клеток смесью вода—фенол, углеводные примеси удаляли обработкой раствора РНК 2-метоксиэтанолом [10], тРНК от рибосомной РНК отделяли хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе.

Метод был несколько упрощен Холли и сотр. [11] и модифицирован для выделения граммовых количеств тРНК из дрожжей [12]. Модификация заключалась в следующем: 1) фенол, вода и дрожжи смешивали встряхиванием в больших полиэтиленовых банках до встряхивания в стеклянных сосудах; 2) фенол и водная фаза разделялись отстаиванием, чтобы избежать центрифуги-

гирования больших количеств смеси фенол—вода—дрожжи. Выход препарата тРНК составлял 65 г из 40 кг дрожжей. Автор метода отмечает, что тРНК по биологической активности не отличалась от тРНК, выделенной по немодифицированной методике.

Метод выделения тРНК из целых клеток дрожжей водно-фенольной экстракцией с последующим осаждением тРНК спиртом и дальнейшей очисткой ионообменной хроматографией получил широкое развитие, особенно в препаративном варианте. Так, был предложен ряд модификаций на стадии освобождения от полисахаридов и низкомолекулярных примесей. Поскольку метоксиэтанол (метиловый эфир этиленгликоля) может вызывать дополнительную деполимеризацию полинуклеотидов [13], было предложено отделять полисахариды центрифугированием после замораживания и оттаивания слабосолевого раствора тРНК (0,15 М NaCl; 0,015 М цитратный буфер, рН 7,5) [13]. После замораживания и оттаивания полисахариды переходят в нерастворимую форму и могут быть легко удалены центрифугированием. Для разделения тРНК и полисахаридов успешно используют гель-фильтрацию через сефадекс Г-75, а низкомолекулярные примеси могут быть отделены на сефадексах Г-25 и Г-50. Добавление хлороформа при второй депротеинизации водного слоя приводит к лучшему разделению водной и фенольной фаз.

Несколько иной подход для удаления полисахаридов и низкомолекулярных примесей был предложен В. К. Алтуниной и сотр. [14]. Спиртовой осадок РНК, полученный после депротеинизации пивных дрожжей фенолом, растворяли в 10-кратном количестве воды и добавляли по каплям концентрированную трихлоруксусную кислоту до 5%-ной концентрации. Образующийся при этом осадок через 5—10 мин собирали центрифугированием и промывали спиртом. При добавлении трихлоруксусной кислоты происходит освобождение от основной массы полисахаридов и низкомолекулярных примесей. После описанной стадии очистки следовала хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе. Выход препарата тРНК составлял 500—700 мг/кг влажного веса биомассы.

Одной из модификаций препаративного варианта метода Холли [12] является хроматография на аминоэтил-целлюлозе разведенной водной фазы после обработки дрожжей и клеток *E. coli* водно-фенольной смесью (без предварительного осаждения РНК спиртом) [15]. Существенным моментом предложенного метода является максимальное отделение водного слоя от фенольного. Водный слой разбавляли водой из расчета 1 л H₂O на 3 л водного слоя и пропускали через аминоэтилцеллюлозную колонку. тРНК, выделенную из элюента спиртовым осаждением, растворяли в 1 М ацетате натрия рН 5,5, перемешивали, хлопьевидный осадок удаляли центрифугированием, а тРНК осаждали спиртом из надосадочного слоя. Выход тРНК в случае дрожжей был 0,3—

0,5 г, а в случае *E. coli* — 0,8 — 1 г на 1 кг биомассы. Применение аминоэтилцеллюлозы, по мнению авторов, позволяет упростить метод выделения тРНК, сократить расход спирта и время выделения. Полученные препараты тРНК содержат 80—85% нуклеотидного материала с хорошей акцепторной активностью.

Бауэр и сотр. [16] предложили иной вариант препаративного выделения тРНК из клеток *E. coli*. Экстракцию и депротеинизацию вели при рН 5—6 и оптимальном соотношении фенола, пасты и экстрагирующего буфера. Подобранные условия позволяли получить быстрое расслоение экстракт-фенольной смеси. Водную фазу сразу же смешивали с ДЭАЭ-целлюлозой, заполняли колонку ионообменником, элюировали тРНК и осаждали ее спиртом.

Линдал и Фреско [17] предложили метод получения высокоочищенной суммарной тРНК дрожжей, который включает начальную обработку клеток по Холли [12] и фракционирование раствора РНК сульфатом аммония, который осаждает высокомолекулярные примеси, оставляя тРНК в растворе. тРНК, в свою очередь, можно осадить более высокими концентрациями соли — 95%-ным насыщением. Диализ против ЭДТА удаляет поливалентные катионы, а диализ против NaCl и воды освобождает препараты тРНК от низкомолекулярных примесей. Последние стадии можно заменить хроматографией солевого раствора тРНК, прогретого при 40° * в присутствии ЭДТА на колонке с сефадексом Г-100. Фракционирование сульфатом аммония авторы рекомендуют при препаративном выделении тРНК.

Принцип прямой фенольной экстракции РНК из клеток с последующей очисткой тРНК от примесей различного характера широко используется для выделения тРНК в препаративных и полупрепаративных количествах из самого разнообразного биологического материала [18—20]. Помимо фенольной экстракции клеток и безрибосомного супернатанта для выделения тРНК использовали метод солевой экстракции [3], а также экстракцию додецилсульфатом натрия [21, 22]. Сравнительные исследования методов выделения тРНК показали, что при солевой экстракции выделенный препарат тРНК имеет очень низкую биологическую активность и низкий коэффициент седиментации [23].

При сравнении метода фенольной обработки клеток и экстракции додецилсульфатом показано [24], что выход тРНК всегда выше при действии фенола на интактные клетки. Кроме того, тРНК, полученная методом фенольной обработки интактных клеток с последующей хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе, свободна от высокомолекулярных примесей, которые часто присутствуют в препаратах, выделенных с помощью горячего или холодного додецилсульфата натрия и отделением тРНК от рибосомной РНК хлористым натрием. Так, при проверке коэф-

* Здесь и далее температура в °С.

фициентов седиментации выяснилось, что тРНК, полученная обработкой клеток додецилсульфатом натрия, имеет дополнительный компонент, который удаляется хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе [23].

Акцепторная активность препаратов тРНК также зависит от примененного метода выделения. Прямая фенольная обработка клеток и экстракция горячим додецилсульфатом натрия дают наиболее активные препараты [24]. Что же касается добавления додецилсульфата натрия к фенолу при начальной обработке клеток, то показано, что присутствие детергента при экстракции приводит к выделению более лабильного препарата тРНК [25].

Как отмечалось, при обработке клеток фенолом в водную фазу наряду с тРНК переходят полисахариды, высокомолекулярные РНК, белки, в том числе и нуклеазы, пигменты, низкомолекулярные вещества. Дальнейшая очистка препарата тРНК весьма трудоемкая, особенно сложно освободиться от полисахаридов. Кроме того, многочисленные методические приемы не гарантируют полного удаления и других примесей, в частности нуклеаз, незначительное присутствие которых опасно для сохранения нативности препарата тРНК. Для того чтобы максимально исключить действие ферментов на послепенольных стадиях выделения тРНК, а также достигнуть максимального удаления иных примесей, были предложены методы, основанные на комбинировании фенольной обработки клеток по Монье [9] с последующим осаждением и очисткой тРНК бромистым цетилтриметиламмонием (цетавлоном) [27], а также метод, сочетающий применение сефадексов для фракционирования по молекулярному весу и осаждение тРНК цетавлоном для консервации на промежуточных стадиях и дополнительной очистки [28]. Цетавлоновое осаждение — очень эффективный методический прием для освобождения тРНК от углеводных примесей [28—30] и как способ разделения РНК и ДНК [29, 31]. Полисахариды дрожжей можно удалить, осаждая тРНК из 0,3 М NaCl цетавлоном. При этом в надосадочной жидкости остаются полисахариды, следовые количества белка, пигменты и низкомолекулярные примеси [30]. Растворение цетавлоновой соли тРНК в спирте с последующим переводением в натриевую соль позволяет получить свободный от полисахаридов препарат тРНК. Растворение цетавлонового производного тРНК в органических растворителях и обратный перевод в водорастворимое состояние не сказываются на ее акцепторных свойствах [27].

Помимо отделения полисахаридов применение цетавлона эффективно еще и в том отношении, что его соли тРНК устойчивы к действию нуклеаз и других факторов, вызывающих деградацию молекул тРНК. Этим объясняется возможность длительного хранения цетавлоновых производных тРНК без потери биологической активности. Именно на стадии цетавлонового осаждения РНК удобно накапливать продукт для дальнейшей очистки.

Необходимо отметить, что особую трудность представляет выделение препаратов тРНК из животных тканей. В противоположность микробиальным объектам активность нуклеаз животных тканей значительно выше, кроме того, экстракты животных тканей содержат значительное количество ДНК, от которой довольно трудно избавиться в процессе выделения. В связи с тем что методы, используемые для получения тРНК из микробиальных объектов не всегда дают удовлетворительные результаты применительно к животным тканям, необходимо было искать дополнительные процедуры, чтобы метод можно было бы применить к данному биологическому материалу.

Так, для максимального отделения тРНК от примесей ДНК и рибосомной РНК был предложен метод [33], включающий дополнительную очистку тРНК печени крыс экстракцией горячим фенолом и гельфильтрацию на сефадексе Г-200. Элюция тРНК с сефадекса калийфосфатом позволяет легко осаждать тРНК без добавления соли. Метод рекомендован для препаративного выделения тРНК.

Рогг и сотр. [33] для выделения тРНК из печени крыс использовали метод, комбинирующий хроматографию на ДЭАЭ-целлюлозе и изопропанольное фракционирование по Зубей [5]. Следует отметить, что авторы предложили очень удачный вариант фракционирования суммарной РНК на ДЭАЭ-целлюлозе. Раствор РНК суспендировали с ионообменником и помещали на Бюхнеровскую воронку, после промывки 0,1—0,3 М NaCl тРНК элюировали 1 М NaCl. Этот прием значительно ускоряет фракционирование, что особенно важно при выделении препаративных количеств тРНК. Эти же методические подходы были применены и при выделении тРНК из печени кроликов [34].

Интересная модификация метода Холли [11, 12] предложена для выделения препаративных количеств тРНК из куриных эмбрионов [35]. Основное различие между методами состоит в рН экстракции. Куриные эмбрионы гомогенизировали в ацетатном буфере рН 4,5, содержащем 0,1% -ный додецилсульфат натрия и 0,14 М NaCl. Поскольку водную фазу непосредственно сорбировали на ДЭАЭ-целлюлозную колонку, без предварительного осаждения РНК спиртом, очень важно получить хорошее расслоение гомогената фенольной смеси. Авторы отмечают, что снижение рН при экстракции имеет большое значение для разделения водной и фенольной фаз, так как при рН 7,6 даже при избыточном объеме экстракционного буфера смесь часто превращается в гель. Кроме того, снижение рН экстрагирующего буфера исключает примеси ДНК, особенно при низких концентрациях солей. Биологическая активность препаратов тРНК, выделенных при рН 4,5 и 7,6, практически была одинаковой. Хроматография на гельсефадексе показала, что тРНК, экстрагированная при рН 4,5, практически не содержит высокомолекулярных примесей.

Методический прием, предложенный Брунграбер [36] для получения тРНК из печени крыс, состоит из гомогенизации ткани в присутствии равных объемов фенола и 1 М NaCl в *трис*-HCl-буфере, разделения смеси нуклеиновых кислот на ДЭАЭ-целлюлозе с элюцией тРНК 1 М NaCl в *трис*-HCl-буфере и последующей депротеинизацией ее фенолом. Этот способ нашел довольно широкое применение. Так, в методе, рекомендованном для выделения граммовых количеств тРНК из печени кролика [37], на первом этапе используют гомогенизацию ткани по упомянутому выше методу. Затем проводят ДЭАЭ-целлюлозную хроматографию на Бюхнеровской воронке, дополнительную депротеинизацию раствора тРНК фенолом в присутствии бентонита (1 мг/мл) и селективное фракционирование изопропанолом [34]. Из 12 кг печени кроликов было выделено 5 г суммарного препарата тРНК.

Иной подход для выделения препаративных количеств тРНК из печени быка применен Робисоном и Циммерманом [38]. На первой стадии была использована обычная фенольная экстракция при низкой концентрации соли (чтобы исключить экстракцию ДНК) в присутствии 0,1 %-ного бентонита для подавления активности и удаления нуклеаз. Авторы ввели двукратное изопропанольное фракционирование. При первом фракционировании на стадии получения водной фазы после фенольной экстракции изопропанолом удаляется основное количество примесей, экстрагирующихся из печени, особенно гликогена, что значительно увеличивает эффект последующих очисток. Препарат тРНК, полученный после осаждения изопропанолом, растворяли в 0,3 М Na-ацетате и вновь фракционировали по методу Зубей [5]. После хроматографии препарата на ДЭАЭ-целлюлозе раствор тРНК дважды обрабатывали фенолом в присутствии 0,1 %-ного додецилсульфата натрия для удаления остатков нуклеаз. Выход тРНК составлял 36 мг из 100 г ткани. Гомогенность выделенного препарата тРНК проверяли гельфильтрацией на сефадексе Г-100. Приблизительно 89% нуклеотидного материала элюировалась острым симметричным пиком.

Последний метод модифицирован применительно к выделению тРНК в препаративных количествах из печени кроликов [39]. Принципиальная модификация включает ультрацентрифугирование после фракционирования изопропанолом. Далее, для более полного удаления полисахаридов и белков была применена хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе. Описанным методом можно получать тРНК из печени предварительно голодавших животных. Препараты тРНК не содержат примесей ДНК и рибосомальной РНК. Выход составлял 200 мг тРНК из 500 г ткани.

Процедура, предложенная для выделения тРНК из печени теленка и быка [40], по существу является модификацией метода Брунграбер [36] и включает фенольную экстракцию, этанольное осаждение, солевое фракционирование и ДЭАЭ-целлюлозную

хроматографию. Авторы метода считают, что такие стадии очистки, как хроматография на сефадексе Г-200, фракционирование изопропанолом не увеличивают акцепторную активность суммарного препарата транспортной РНК. При добавлении диэтилпирокарибоната — ингибитора нуклеазной активности — наблюдалось снижение биологической активности препаратов тРНК, что обусловлено, по мнению авторов [40], взаимодействием тРНК с ингибитором.

Метод препаративного получения тРНК из печени кроликов и молочной железы коров, применяемый в Институте молекулярной биологии и генетики АН УССР, также основан на принципе метода Брунграбер [36]. При гомогенизации ткани с фенолом для экстракции тРНК использовали 0,001 М калийфосфатный буфер рН 6,5, содержащий 0,001 М ЭДТА. Были исследованы различные варианты экстракционной среды. Оказалось, что присутствие сахарозы, увеличение ионной силы (до 0,1 М) буфера практически не влияют ни на количественный выход, ни на степень чистоты препарата тРНК. Повышение рН буфера до 7,2—7,5 несколько увеличивает количество экстрагируемой тРНК, однако при этом возрастает и примесь ДНК. Дополнительную депротенинизацию РНК перед ионообменной хроматографией проводили смесью хлороформ — изоамиловый спирт. При наличии больших примесей углеводов и высокомолекулярных РНК спиртовой осадок тРНК растворяли в 0,1 М Na-ацетате, содержащем 0,01 М Mg-ацетат, и центрифугировали 1 ч при 105 000 × g.

При выделении тРНК из килограммовых количеств молочной железы коровы хроматографию на ДЭАЭ-целлюлозе вели на Бюхнеровской воронке по Рогу и сотр. [33]. тРНК после ионообменной хроматографии дважды депротенинизировали фенолом с бентонитом. Окончательная очистка тРНК от пигментов и низкомолекулярных примесей достигалась гельфильтрацией на сефадексах Г-25 и Г-50.

В заключение необходимо остановиться на некоторых положениях, которые следует принимать во внимание независимо от выбранного метода выделения тРНК и используемого биологического материала. Необходимыми условиями при работе с тРНК является тщательно вымытая посуда и перчатки, чтобы избежать попадания пальцевой рибонуклеазы. Хорошо очищенные препараты тРНК могут храниться в течение длительного времени — несколько лет — в высушенном или лиофилизированном состоянии при минусовой температуре. При этом надо учитывать, что тРНК очень гигроскопична и должна храниться без доступа воздуха [17].

В настоящее время уже многое достигнуто в области выделения суммарных препаратов тРНК из различных объектов. Однако решение таких вопросов, как количество суммарной тРНК, достаточное для получения препаративных количеств высокоочищенных индивидуальных тРНК, и высокая степень чистоты

препарата тРНК требует поиска новых методических приемов. Прежде всего это касается животных тканей, требующих разработки частных методических приемов для выделения тРНК.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА МЕТОДОВ ПОЛУЧЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ тРНК

В настоящее время существует целый арсенал методов выделения высокообогащенных индивидуальных тРНК из различного биологического материала. Однако не все из предложенных методов дают удовлетворительные результаты как в отношении количества препарата, так и в отношении его чистоты, т. е. гомогенности.

Наиболее эффективным методом получения тРНК различной аминокислотной специфичности на препаративной шкале является метод противоточного распределения. К тому же этот метод является одним из самых чувствительных приемов органической химии как для разделения сложных смесей веществ, так и для доказательства индивидуальности химического соединения.

Метод противоточного распределения был предложен для фракционирования РНК и ферментативно синтезированных полинуклеотидов [41]. Холли и сотр. [42, 43] успешно применили способ для фракционирования тРНК. Авторы использовали двухфазную систему растворителей, включающих фосфатный буфер, изопропанол и формамид. Вскоре была предложена аммоний-сульфатная система, растворимость тРНК в которой выше, чем в предыдущей; кроме того, аммоний-сульфатная система менее чувствительна к температурным изменениям [44]. Помимо систем, основанных на хроматографировании солей РНК щелочных металлов предпочтительно в водной забуференной среде, используется система фракционирования трибутил-аммонийной соли тРНК в системе органических растворителей [45, 46]. Последняя менее чувствительна, чем две другие, к температурным изменениям, однако более чувствительна к концентрации тРНК: коэффициент разделения при повышении концентрации тРНК увеличивается. тРНК хорошо растворима в системе органических растворителей: 220 мг дрожжевой тРНК в 1 мг начальной фазы. Характерно и то, что распределение тРНК в системе Цахау [45] отличается от распределения, получаемого в первых двух системах.

Значительный вклад в развитие метода противоточного распределения применительно к тРНК был внесен целым рядом исследователей, и в настоящее время есть много работ, в которых представлены данные о фракционировании тРНК дрожжей, *E. coli*, печени крыс [47—54].

Впоследствии метод противоточного распределения был модифицирован [55], и эта модификация получила название двойного противотока. В двойном противотоке верхняя и нижняя

фазы переносятся одновременно в противоположных направлениях после каждого уравнивания. Метод имеет преимущество перед обычным противотоком в том, что позволяет выделить из смеси минорные соединения. Двойной противоток был использован для очистки валиновой и аланиновой тРНК дрожжей [56]. В результате сравнительных исследований авторы установили, что в двойном противотоке большая эффективность очистки достигается меньшим количеством переносов, кроме того, разделение идет быстрее. Однако двойной противоток не рекомендуется как общая процедура для очистки тРНК различной аминокислотной специфичности [56].

Метод противоточного распределения позволяет фракционировать граммовые количества суммарной тРНК. При этом может быть получено десятки миллиграмм индивидуальных тРНК. Высокая разрешающая способность метода по разделению тРНК на изоакцепторные фракции позволила успешно использовать его при получении индивидуальных тРНК различной специфичности для расшифровки их первичной структуры [57].

Несмотря на большие преимущества, метод противоточного распределения имеет серьезные технические ограничения, связанные с крупной дорогостоящей установкой и значительной затратой времени для выделения тРНК.

Попыткой объединить емкость и разрешающую способность противоточного распределения с простотой колоночной хроматографии явился метод распределительной хроматографии. Он основан на тех же принципах, что и противоточное распределение, — различная растворимость отдельных тРНК в бифазных системах растворителей. В качестве колоночного матрикса при распределительной хроматографии применяли кремниевую кислоту (гель кремнезема) [58] и сефадекс [59, 60], однако в случае геля кремнезема происходили очень большие потери тРНК, особенно при сорбции на колоночный матрикс. При фракционировании дрожжевой тРНК с помощью распределительной хроматографии на сефадексе Г-25 в системе органических растворителей было получено 5 сериновых тРНК с чистотой 30—80% [60].

Мюнх и Берг [61] предложили метод, использующий двухфазную систему растворителей. При этом тРНК, растворенную в водной фазе, иммобилизируют на колонке с сефадексом Г-25 и фракционно экстрагируют подвижной органической фазой. Для колоночной распределительной хроматографии характерно то, что применение градиентной элюции увеличивает коэффициент разделения.

Один из методических приемов, использованных для получения высокоочищенных по определенной аминокислоте тРНК, основан на высокой специфичности реакции аминоацилирования и различной реактивности аминоацилированной и неаминоацилированной тРНК в суммарном препарате. Замечник [62, 63] впервые применил этот принцип для получения валиновой тРНК,

используя периодатное окисление неацилированной тРНК и последующее взаимодействие диальдегидов тРНК с производными гидразина для отделения их от аминоацилированных тРНК. Метод включает образование окрашенного вещества, прочно связанного с тРНК, в результате взаимодействия гидразон-тРНК с тетраазотированным *o*-дианизидином. Окрашенная тРНК значительно отличается по растворимости от аминоацилированной тРНК и легко отделяется от последней осаждением сульфатом аммония. Описанным методом были получены препараты валиновой и лизиновой тРНК 40%-ной чистоты. Применение ионообменной хроматографии для отделения аминоацил-валил-тРНК от окрашенного комплекса [64] позволило выделить валиновую тРНК приблизительно 80%-ной чистоты.

Отделение лейцил-тРНК от тРНК, имеющих диальдегидные группы, Зубей [65] осуществил с помощью хроматографии на аминоэтилцеллюлозной колонке. Диальдегидные группы тРНК превращаются в шиффовы основания и блокируются на колонке, в то время как аминоацилированные тРНК проходят через колонку. Таким способом была выделена лейциновая тРНК 70%-ной чистоты. В дальнейшем для фиксации окисленных тРНК использовали полиакрилгидразидагаровый гель [66, 67] и описанный метод в сочетании с другими приемами — ионообменной хроматографией [66, 68] или противоточным распределением [67] успешно применяли для выделения валиновой тРНК дрожжей.

Химические методы выделения обогащенных препаратов индивидуальных тРНК включают также приемы, основанные на модификации аминоацилированной тРНК наращиванием полимера на свободную аминогруппу [69—72]. Полимер, образованный на аминогруппе, присоединенной к тРНК аминокислоты, нерастворим, что обеспечивает отделение от неаминоацилированных тРНК. Процесс наращивания синтетического полимера можно повторить, ацилируя оставшуюся тРНК второй аминокислотой.

Применение методов, использующих различную реактивность ацилированных и неацилированных тРНК для получения высокоочищенных тРНК различной аминокислотной специфичности, ограничивается прежде всего чистотой (отсутствием примесей рибосомальной РНК и эндогенных аминокислот) и начальной биологической активностью суммарных препаратов тРНК и аминоацил-тРНК-синтетаз (АРСаз, К. Ф. 6, 1, 1). Кроме того, недостаток химических методов выделения индивидуальных тРНК высокой степени чистоты является невозможность разделения на изоакцепторные тРНК.

Хроматографические приемы, использующие колонки с метилированным альбумином (МАК), гидроксипатитом, ДЭАЭ-сефадексом и ДЭАЭ-целлюлозой, предполагают дополнительные подходы для выделения тРНК различной аминокислотной специ-

фичности. Относительная стабильность аминокислотной тРНК в буферных растворах с низким рН позволяет разделить меченые аминокислот-тРНК на колонках с метилированным альбумином, но в этом случае необходимо предварительное ферментативное аминокислотирование, чтобы локализовать определенный вид тРНК.

Колонка МАК, предложенная Менделем и Херши [73] и Суюэки и Яманэ [74], широко использовалась для фракционирования тРНК различного происхождения. Метилирование альбумина происходит по свободным карбоксильным группам, и в целом белок приобретает свойства слабого анионита, однако наряду с электростатическим взаимодействием между тРНК и белком имеет место и гидрофобное. В качестве инертного носителя в колонках с метилированным альбумином использовали кизельгур, целит, кремниевую кислоту [75]. Однако, несмотря на то что замена кизельгура кремниевой кислотой значительно повысила (в 50—100 раз) емкость и разрешающую способность колонки [76], использование ее для препаративной хроматографии весьма ограничено. Кроме того, после хроматографии на колонках с метилированным альбумином тРНК значительно теряет акцепторную активность, поскольку метилированный альбумин, образуя комплекс с тРНК, ингибирует реакцию аминокислотирования [77, 78]. Недостатком колонки является и то, что метилированный альбумин частично элюируется с колонки вместе с тРНК, загрязняя фракции проназой, которая гидролизует аминокислотную связь.

Гидроксиапатитовые колонки (колонки ГАП), предложенные первоначально для белковой хроматографии, в дальнейшем были использованы для фракционирования нуклеиновых кислот. Способность колонок ГАП дискриминировать тонкие различия вторичной и третичной структуры сходных биополимеров явилась исходным моментом для использования этих колонок при фракционировании различных индивидуальных тРНК. Хартман и Кой [79] впервые хроматографировали тРНК на гидроксиапатите ступенчатой элюцией и получили частичное разделение тРНК, специфичных к валину и фенилаланину. Последующими работами нескольких групп исследователей [80, 81, 82] были определены экспериментальные условия для хорошего разделения тРНК различной аминокислотной специфичности. Использование для элюции фосфатного буфера рН 5,8 и 5,4 [80, 82] позволяет хроматографировать на гидроксиапатите аминокислотированные тРНК, что, в свою очередь, облегчает работу по локализации тРНК.

Элюционная последовательность индивидуальных тРНК с гидроксиапатита значительно отличается от последовательности в иных хроматографических системах, поэтому комбинирование колонок ГАП с другими методами успешно применяется для получения высокоочищенных препаратов индивидуальных тРНК.

Так, с помощью последовательного применения метода противоточного распределения и хроматографии на гидроксипатите были выделены две фенилаланиновые тРНК [83], а также изучена гетерогенность некоторых тРНК [84]. Хроматография на гидроксипатите была включена как одна из стадий очистки при выделении двух высокоочищенных аспарагиновых тРНК дрожжей [85]. Комбинированием хроматографий в обращенной фазе по Келмерсу и гидроксипатитовой колонке выделены метиониновая и формилметиониновая РНК *E. coli* [86]. Можно успешно сочетать хроматографию на колонках ГАП с распределительной хроматографией [80].

В заключение необходимо отметить, что хроматография биополимеров, в том числе и тРНК, на гидроксипатите находится в стадии развития, как в теоретическом, так и в экспериментальном плане; большинство экспериментов проведены в условиях, выбранных эмпирически, систематизированные исследования параметров хроматографии на гидроксипатите не проводились.

При подборе методов фракционирования и очистки тРНК значительное внимание было уделено хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе и ДЭАЭ-сефадексе. В неэлектростатическом взаимодействии с тРНК в случае этих ионообменников участвуют соответственно целлюлоза и декстран. ДЭАЭ-целлюлоза и ДЭАЭ-сефадекс обладают хорошей скоростью тока, воспроизводимостью хроматографических результатов. Химические и физические параметры разделения специфических тРНК при хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе и ДЭАЭ-сефадексе широко представлены в работах Черайля и Бока [87, 88].

Порядок элюции тРНК различной аминокислотной специфичности изменяется в зависимости от частичного протонирования аденина и цитозина. Сильное неэлектростатическое взаимодействие между тРНК и целлюлозой может быть снято градиентом мочевины, который в свою очередь, изменяет порядок элюции специфических тРНК. Неэлектростатическое взаимодействие выражено гораздо в меньшей степени при использовании ионообменника с декстрановым матриксом. Таким образом, ионный обмен, степень протонирования оснований и концентрация мочевины составляют взаимодополняющие переменные, которые могут менять порядок элюции тРНК различной аминокислотной специфичности.

Как отмечалось, Черайл и Бок [87] приводят значения рН, молярность солевых градиентов и градиента концентрации мочевины, при которых получено хорошее разделение на колонках с ДЭАЭ-целлюлозой и ДЭАЭ-сефадексом тРНК ряда специфичностей, выделенных из *E. coli* и дрожжей. При элюции тРНК дрожжей при рН 7,6 в градиенте мочевины с ДЭАЭ-целлюлозной колонки аргининовая, валиновая и пролиновая тРНК элюируются вместе в начале градиента и таким образом отделяются от тРНК иных специфичностей. При повторной хроматографии фракции

этих трех тРНК на ДЭАЭ-сефадексе в солевом градиенте при рН 4,5, валиновая тРНК элюируется перед аргининовой и пролиновой тРНК и хорошо отделяется от последних. Аргининовая и пролиновая тРНК могут быть разделены хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе в градиенте концентрации мочевины при рН 4,5. Тирозиновая и лейциновая тРНК элюируются вместе с ДЭАЭ-целлюлозы при рН 7,6, однако разделяются при хроматографии на ДЭАЭ-сефадексе при рН 4,5. Чистота тРНК, полученных после фракционирования, составляла 95—100% [87, 88]. Таким образом, комбинирование ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе и ДЭАЭ-сефадексе может быть успешно использовано для разделения смеси специфических тРНК, а также для изучения гетерогенности специфических тРНК различного происхождения.

Хроматография тРНК на ДЭАЭ-сефадексе и ДЭАЭ-целлюлозе при повышенной температуре (60—65—72°) может служить одним из методических приемов для аналитического и препаративного фракционирования суммарных тРНК или же для дальнейшей очистки фракций тРНК, обогащенной по какой-либо аминокислоте [89—91]. Метод фракционирования при повышенной температуре использует различия в температуре плавления специфических тРНК, что обусловлено различием во вторичной структуре. Выбором температуры, солевого или температурного градиента можно контролировать последовательность элюции тРНК той или иной специфичности. Предложенный метод предполагает использование градиента температуры при постоянной концентрации соли и солевого градиента. При этом порядок элюции и степень разделения отдельных тРНК в температурном и солевом градиентах значительно отличаются.

Постепенное снижение температуры является средством селективной десорбции специфических тРНК, что зависит от содержания ГЦ-пар и относительного содержания спаренных участков в различных молекулах тРНК [92]. Однако поскольку порядок элюции отдельных тРНК зависит и от градиента концентрации соли, и от температурного градиента, авторы метода [93] полагают, что порядок распределения ГЦ- и АУ-обогащенных участков в молекулах тРНК влияет на десорбцию индивидуальных тРНК, так как последние факторы контролируют вторичную структуру молекулы при любой температуре и концентрации соли. Порядок элюции различных видов тРНК при хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе и ДЭАЭ-сефадексе при повышенной температуре отличается от порядка элюции в иных хроматографических системах, поэтому первый метод применяется как одна из стадий очистки при выделении высокообогащенных индивидуальных тРНК [82, 94].

Группа исследователей [95—97] использовала при фракционировании тРНК *T. utilis* на ДЭАЭ-сефадексе ряд элюирующих систем, включающих линейный градиент аммоний сульфата, KCl-

линейный градиент в фосфатном или боратном буфере в присутствии различных концентраций диметилформаида. Авторы получили хорошее разделение специфических тРНК во всех элюирующих системах и высокий процент чистоты аланиновой, валиновой и изолейциновой тРНК. Поскольку каждая из указанных систем дает различный порядок элюции отдельных тРНК, авторы рекомендуют комбинировать использование элюирующих систем для получения высокоочищенных препаратов индивидуальных тРНК. Так, первой может быть использована аммонийсульфатная система, которая не требует температурного контроля, далее хроматографию можно проводить в 1 М фосфатном буфере, содержащем диметилформамид (линейный градиент КСl) [97]. Боратную систему авторы рекомендуют применять на конечных этапах очистки индивидуальных тРНК, так как эта система дает четкое разделение изоакцепторных тРНК [95]. Полученные хроматографияей на ДЭАЭ-сефадексе высокоочищенные препараты, валиновой, изолейциновой и тирозиновой тРНК были использованы для расшифровки их первичной структуры [98—100].

Используя хроматографию на ДЭАЭ-целлюлозе и ДЭАЭ-сефадексе, Каваде и сотр. [101] выделили из пивных дрожжей высокоочищенную валиновую тРНК. Выход препарата по активности составлял 80%. Авторы отмечают, что разделение специфических тРНК на ДЭАЭ-сефадексе в градиенте NaCl более четкое, чем на ДЭАЭ-целлюлозе. Кроме того, несмотря на использование разнообразных приемов, влияющих на разделение отдельных тРНК (градиент температуры, pH), фракционирование тРНК на ДЭАЭ-целлюлозе не всегда воспроизводится от опыта к опыту и в последнее время редко используется. ДЭАЭ-сефадекс, напротив, широко применяется на стадии предварительной очистки и в дополнение к иным способам получения высокоочищенных индивидуальных тРНК [68, 103].

Наиболее распространен в настоящее время метод фракционирования тРНК на бензолированной ДЭАЭ-целлюлозе (БД-целлюлозе), который очень успешно используется как для изучения спектра изоакцепторных тРНК [104—107], так и для получения препаративных количеств тРНК требуемой аминокислотной специфичности [19, 108, 109]. Методический прием был предложен в 1967 г. группой Тенера [110].

Замена гидроксильных групп в ДЭАЭ-целлюлозе ароматическими (в результате взаимодействия с бензоилхлоридом в присутствии пиридина) значительно увеличивает неэлектростатическое взаимодействие ионообменника с тРНК. Использование дополнительных сил неэлектростатического взаимодействия имеет значение и для тонкого фракционирования тРНК. Кроме того, преимуществом БД-целлюлозы перед другими ионообменниками, особенно на начальных стадиях фракционирования, является достаточная емкость в сочетании с хорошей разрешающей способностью по изоакцепторным тРНК.

Как отмечалось, наличие бензоильных групп в структуре БД-целлюлозы обеспечивает увеличенное сродство этого ионообменника к липофильным и ароматическим группам полинуклеотидов. Именно это свойство БД-целлюлозы легло в основу довольно простого метода выделения фенилаланиновой тРНК из различных источников [102, 108, 111—113]. Фенилаланиновые тРНК микробального, растительного и животного происхождения содержат модифицированное основание У с сильно выраженными липофильными свойствами, что и обуславливает более прочное присоединение тРНК^{Фен} к БД-целлюлозе. тРНК^{Фен} может быть элюирована с ионообменника только добавлением к солевому раствору спирта или мочевины, т. е. реагентов, разрушающих гидрофобные и водородные связи. Использование градиента этилового спирта в солевом растворе позволяет освободиться от примесей нунуклеотидного происхождения, сопровождающих фенилаланиновую фракцию тРНК и выделить тРНК^{Фен} высокой чистоты [111].

Из свободных, т. е. неаминоацилированных, тРНК только тРНК^{Фен} обладает свойством более прочно взаимодействовать с БД-целлюлозой. Что же касается иных специфических тРНК, то аминоацилирование по тирозину и триптофану соответствующих тРНК также приводит к более прочному связыванию их с ионообменником [109, 114]. Последнее обусловлено изменением липофильной природы тРНК в результате введения ароматических аминокислот на акцепторный конец, так как опыты с аланиновой тРНК показали, что аминоацилированная и неаминоацилированная тРНК элюируются с ионообменника приблизительно при одинаковых концентрациях соли [100].

Метод хроматографического разделения тРНК на БД-целлюлозе получил дальнейшее развитие, и через год группа Тенера предложила фракционировать тРНК в аминоацилированной форме с блокированной аминогруппой [115]. Суммарный препарат тРНК аминоацилируют по определенной аминокислоте, а затем в аминогруппу аминоацильного эфира вводится феноксиацетил или нафтоксиацетильная группа. Модификация вызывает значительный сдвиг в элюции аминоацилированной тРНК с БД-целлюлозы и ее отделение от иных тРНК. Замещенный аминоацильный эфир легко гидролизует, и тРНК, обогащенная по необходимой аминокислоте, освобождается.

Фракционирование препарата тРНК *E. coli*, содержащего феноксиацетилпроизводное метионил-тРНК на БД-целлюлозе, стало основой метода получения высокоочищенных препаратов формилметиониновой и метиониновой тРНК [116]. Предложенный метод включает однократную хроматографию при 4°, позволяющую получить 80%-ной чистоты формилметиониновую и 35%-ной чистоты метиониновую тРНК. Порядок элюирования с БД-целлюлозы тРНК^{Мет} и тРНК^{Мет}_ф после введения феноксиацетильного остатка меняется, что, вероятно, обусловлено индуди-

рованием конформационных изменений при N-ацетилировании метионина в метионил-тРНК. Последнее и определяет изменение сродства к сорбенту. При повторной хроматографии чистота выделенных препаратов тРНК^{Мет} и тРНК^{Мет}_ф достигла соответственно 70 и 100%.

Двукратное фракционирование препаратов тРНК на БД-целлюлозе использовано при выделении пяти лейциновых тРНК [117]. На первом этапе хроматографировали лейцил-тРНК после нафтоксиацетилирования, на втором — очищенную фракцию лейциновых тРНК после химического деацелирования разделяли на изоакцепторные фракции обычной хроматографией на БД-целлюлозе. Полученные лейциновые тРНК были 90%-ной чистоты.

При хроматографии тРНК *E. coli* на БД-целлюлозе в отсутствие Mg²⁺ и при 2° была достигнута семикратная очистка сериновой, тирозиновой и триптофановой тРНК [118]. Причем в подобранных хроматографических условиях во фракции тРНК, элюирующейся только при добавлении этанола (этанольная фракция), содержится вся тРНК^{Сер} и основное количество тРНК^{Тир} и тРНК^{Три}. Повторная хроматография этанольной фракции при тех же условиях приводит к дальнейшей очистке содержащихся в ней тРНК.

При получении супрессорной лейциновой тРНК *E. coli* K12 [119] первым этапом было обычное фракционирование на БД-целлюлозе. Фракции тРНК, обладающие супрессорной активностью, объединяли, и выделение тРНК^{Лей} проводили повторной хроматографией на БД-целлюлозе нафтоксиацетилированного препарата лейцил-тРНК. Фракции тРНК^{Лей}, обладающие супрессорной активностью, объединяли, деацелировали и рехроматографировали на БД-целлюлозе в обычных условиях.

Для получения высокоочищенных индивидуальных тРНК с использованием хроматографии на БД-целлюлозе разработаны и иные подходы. Так, Ишида и Суеока [120] при выделении триптофановой тРНК *E. coli* использовали возможность существования последней в биологически активной и неактивной формах. Описанный метод включает фракционирование тРНК на БД-целлюлозе в условиях (отсутствие ионов Mg, 2°), при которых с сорбентом более прочно связывается тРНК^{Три}. Затем обогащенную фракцию тРНК^{Три} *E. coli* хроматографировали на колонках МАК в присутствии ионов Mg сначала в биологически неактивной форме, а затем после превращения в активную форму. Полученная таким способом тРНК^{Три} была 80%-ной чистоты.

Другой прием был предложен для выделения лизиновой тРНК из *B. subtilis* [121]. Метод состоит в хроматографии тРНК, содержащей нативный лизил-тРНК, на БД-целлюлозной колонке с последующим окислением иодатом фракций тРНК, специфичных к лизину, и повторной хроматографии на БД-целлюлозе окисленных лизил-тРНК. Окисленная лизил-тРНК элюируется рань-

ше, чем тРНК иных специфичностей. Авторы выделили лизиновою тРНК 66%-ной чистоты.

Как отмечалось, связывание тРНК с сорбентами, обладающими сильно выраженным неионным взаимодействием, зависит от относительного количества спирализованных участков и порядка их расположения в молекулах биополимеров. Поэтому последовательность элюции тРНК можно контролировать факторами, влияющими на вторичную и третичную структуры,— рН, температура, градиент мочевины.

Наряду с описанными условиями хроматографии тРНК на БД-целлюлозе — солевой градиент при слабокислых и нейтральных рН — были предложены методы фракционирования при кислых рН в 7 М мочеvine и градиенте хлористого натрия, а также при рН 5 в градиенте мочевины [122]. Предложенные способы дают хорошей разделению как в препаративных, так и в аналитических экспериментах, причем в опытах с БД-целлюлозой при кислых рН на 1 мл колонки можно сорбировать до 90 оптических единиц нефракционированной тРНК без ухудшения разделения.

Фракционирование тРНК на БД-целлюлозе в сочетании с другими хроматографическими приемами широко и успешно применяются для выделения индивидуальных тРНК из различных объектов. Пять сериновых тРНК 60—85%-ной чистоты были получены из клеток *E. coli* последовательной хроматографией на БД-целлюлозе и ДЭАЭ-сефадексе [123]. Те же методические приемы были использованы при выделении обогащенных препаратов тирозиновой и валиновой тРНК из печени крыс [103] и триптофановой тРНК из печени кролика [114].

При выделении аргининовой тРНК из пивных дрожжей первым этапом было фракционирование суммарного препарата тРНК методом противоточного распределения, затем следовала хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе при 65°. Препарат тРНК^{Arg} достигал 90%-ной чистоты на третьем этапе, на котором была использована хроматография на БД-целлюлозе [124].

Комбинацией хроматографии на БД-целлюлозе и гидроксипатите выделена фенилаланиновая тРНК из печени быка и телят [102].

Стандартная процедура хроматографии на БД-целлюлозе была модифицирована для фракционирования аминоксил-тРНК [125].

Для аналитических колонок использовали более мелкую смолу (менее 200 mesh) и заполняли колонки под большим давлением для уменьшения свободного объема. Хроматографию проводили при 37°. В описанных условиях сериновая и аспарагиловая тРНК дрожжи хорошо разделялись на изоакцепторные фракции; гистидил-тРНК, обладающую более лабильной эфирной связью, хроматографировали при 30°.

Наряду с хроматографией на бензоилированной ДЭАЭ-целлюлозе, эффективным методом фракционирования тРНК является хроматография в обращенной фазе (ХОФ), предложенная Келмерсом и соавт. [126, 127]. В первой хроматографической системе (ХОФ-1) в качестве носителя неподвижной фазы использовали диатомовую землю — «хромосорб W». Последняя предварительно обрабатывалась кислотой и диметилдихлорсиланом для получения гидрофобной поверхности, обладающей минимальной активностью. В изоамилацетате, который благодаря гидрофобности хромосорба прочно удерживается его гранулами, растворяют жирный ион четвертичного аммония — диметилдилауриламмоний хлорид. Подвижной фазой хроматографической колонки является буферный раствор хлористого натрия. тРНК растворяют в соответствующем буфере в присутствии необходимого количества NaCl. При сорбции тРНК взаимодействует с диметилдилауриламмонием, образует жирную аммонийную соль и иммобилизуется на колонке. Последовательность элюции специфических тРНК в линейном градиенте контролируется доступностью фосфатных групп отдельных тРНК для взаимодействия с ионами четвертичного аммония. тРНК, имеющие более компактную структуру, элюируются с колонки при низких концентрациях соли, а с более рыхлой структурой — при более высоких концентрациях.

В следующей системе — ХОФ-2 [127], предложенной для фракционирования тРНК, в качестве иона четвертичного аммония использовали метилтрикаприламмоний хлорид, а органическая фаза была представлена фреоном (тетрахлортетрафторпропан).

Описанные системы — ХОФ-1 и ХОФ-2 — комбинируют ионообменную и распределительную хроматографии. Реагентами для ионного обмена были выбраны четвертичные производные аммония, вследствие их обменных свойств при нейтральных рН, растворимости в органических растворителях и способности взаимодействовать с нуклеиновыми кислотами без изменения активности последних [128, 129].

Основным недостатком указанных систем является трудность в получении равномерного распределения пленки органического растворителя по поверхности гранул хромосорба, без чего качество фракционирования значительно ухудшается. Для устранения этой трудности авторы метода использовали закрепление ионов аммония непосредственно на поверхности хромосорба. Последняя модификация нашла отражение в системах ХОФ-3 и ХОФ-4 [130]. В системе ХОФ-3 в качестве четвертичного основания использовали триоктилпропиламмоний бромид, а в ХОФ-4 — диметилдилауриламмоний хлорид [131].

Исследование большого количества инертных носителей для солей аммония позволило авторам метода остановиться на полихлортрифторэтиленовой смоле «Plaskon». Преимущество послед-

него носителя перед другими состоит в одинаковом размере гранул и в абсолютной химической инертности. На основе «Plaskop» созданы две новые хроматографические системы — ХОФ-5 и ХОФ-6 [132]. В качестве органической фазы в ХОФ-5 применен триалкилметиламмоний хлорид (Adogen 464), а в ХОФ-6 — триоктилпропиламмоний бромид. Техника хроматографии в обращенной фазе довольно проста, и системы могут быть использованы как для препаративного фракционирования тРНК, так и для аналитического [133, 134]. Основными факторами, влияющими на разделение специфических тРНК в указанных системах, являются: объем градиента и тип его, условия элюции (рН, концентрация ионов Mg, температура), а также размер колонок. В системе ХОФ-3 удовлетворительное разделение тРНК достигнуто при использовании колонок 1×240 см, $2,5 \times 100$, 10×100 см [135]. Объем и размеры колонок определяются хроматографируемым количеством тРНК; в свою очередь, соответственно объему применяемой колонки подбирается и объем градиента. Значительное количество экспериментальных работ с использованием систем ХОФ-2, ХОФ-3 и ХОФ-4 проведено при нагрузке 5—10 оптических единиц тРНК на 1 мл колонки, или 1000—2000 оптических единиц тРНК на колонку размером 1×240 см [136—138].

Согласно данным авторов метода [131], коэффициент распределения тРНК между водной фазой и упаковкой колонки является функцией от температуры. При увеличении температуры тРНК сорбируются прочнее и для элюции требуются более высокие концентрации хлористого натрия. Это положение согласуется с представлением о том, что при повышении температуры частично плавится структура тРНК, поэтому более доступным становится взаимодействие фосфатных групп тРНК с ионами четвертичного аммония. Вот почему важно, чтобы при постановке опыта температура не колебалась более чем $\pm 0,1^\circ$.

Одним из многочисленных факторов, влияющих на последовательность элюции индивидуальных тРНК при хроматографии в ХОФ-системах, является рН элюирующего буфера [131]. С изменением рН меняется количество протонированных оснований в молекуле тРНК, что в свою очередь, влияет на ионное взаимодействие тРНК с четвертичным производным аммония. Однако такие тРНК, как формилметиониновая-1 и аргининовая тРНК *E. coli*, незначительно изменяют элюционное положение при рН от 4,5 до 8, в то время как характер элюции валиновой и формилметиониновой-2 тРНК в значительной мере чувствителен к различным уровням рН [131].

При фракционировании тРНК в ХОФ-системах варьирование значений рН элюирующих растворов может быть использовано для хроматографического разделения различных специфических тРНК, элюируемых в смежных областях градиента. Изменение рН может привести к выявлению различного количества изоак-

цепторных фракций тРНК. Так, при фракционировании тРНК *E. coli* в системе ХОФ-1 при рН 7,4 получено 5 фракций лейциновой тРНК, а при рН 4,5 — только 4 [126, 133]. Авторы высказывают предположение, что при более низких рН тРНК₄^{Le^н} и тРНК₅^{Le^й} не разделяются, вследствие изменений в заряде молекул.

При фракционировании частично обогащенного препарата тРНК^{Вал} обратнофазовой хроматографией по Келмерсу [126] обнаружено, что валиновая тРНК при рН 7,5 и 8,5 не разделяется на изоакцепторные фракции [138], кроме того, главный компонент — тРНК₂^{Вал} достигает высокой степени гомогенности только после хроматографии при рН 4,35, а не при более высоких значениях. Снижение рН до 4,2 приводит к элюции тРНК^{Вал} более широким пиком, и дальнейшая очистка не происходит. Отделение тРНК^{Фен} от тРНК^{Le^й} и тРНК^{Тир} достигается также хроматографией при более низких рН.

Не все тРНК в равной степени стабильны при различных значениях рН. Поэтому в настоящее время фракционирование суммарных тРНК в ХОФ-системах проводят, как правило, при комнатной температуре и рН 4,5.

Последовательность элюирования индивидуальных тРНК, а также разделение на изоакцепторные фракции определяется наличием или отсутствием в растворах для элюции Mg^{2+} [126, 131]. Поскольку, как отмечалось, элюция тРНК при хроматографии в обращенной фазе контролируется доступностью фосфатных групп тРНК к взаимодействию с ионами четвертичного аммония, наличие ионов стабилизирующих третичную структуру биополимеров, значительно ускоряет десорбцию молекул тРНК.

Время хроматографического эксперимента определяется обычно скоростью элюции. При фракционировании тРНК во всех ХОФ-системах удачно подобранное соотношение скорости элюции и объема градиента позволяет получить удовлетворительное разделение. В работах с ХОФ-3- и ХОФ-4-системами скорость элюции варьировала от 1—2 мл/мин на 1 см² до 15 мл/мин на 1 см² [133, 136, 137, 139]. ХОФ-2-система более чувствительна к изменению скорости элюции по сравнению с иными системами, поскольку в ней используется дискретная жидкая ионообменная фаза и скорость диффузии через интерфазу может быть лимитирована. Хроматографическое разделение в ХОФ-2-системах проводилось в основном на колонках размером 1×240 см при скорости элюции 0,5—1 мл/мин [127]. Увеличение скорости элюирования снижает эффект разделения. Учитывая, что объем градиента при хроматографировании на таких колонках достигает 2—3 л, фракционирование тРНК длится 1—2 дня. Предложенные недавно новые хроматографические системы ХОФ-5 и ХОФ-6 [132] позволяют значительно сократить время хроматографии при использовании колонок размером 1×240 см. Келмерс и сотр.

[140] предложили аналитические маленькие колонки для разделения ^3H - и ^{14}C -аминоацил-тРНК в ХОФ-5-системе. Время эксперимента 30—60 мин, объем градиента 100 мл, скорость элюции 1,6—3,3 мл/мин. По мнению авторов, преимущество таких колонок состоит в сокращении времени эксперимента, уменьшении используемого количества тРНК, а также в исключительной чувствительности и превосходном разделении изоакцепторных фракций.

Пять изоакцепторных лейциновых тРНК обнаружено в клетках как при фракционировании лейцил-тРНК на аналитических колонках, так и при хроматографическом разделении на колонках 1×240 см [132]. Чистота лейциновых тРНК составляла 84%. При фракционировании ^{14}C -аминоацил-тРНК печени быка в ХОФ-5-системе было получено 5 фракций аргининовой тРНК, 2 изолейциновых, 2 лизиновых, 4 фенилаланиновых, 5 лейциновых, 5 метиониновых и 4—8 сериновых тРНК [140]. Описанные хроматографические системы применимы для фракционирования тРНК различного происхождения.

В сравнительных исследованиях хроматографического разделения лейцил-тРНК *E. coli* в системах ХОФ-5, ХОФ-6 и ХОФ-2, ХОФ-3 получено пять четких пиков изоакцепторных фракций в системах ХОФ-5 и ХОФ-6 [132]. Чистота лейциновых тРНК достигала 90%. В системах ХОФ-2 и ХОФ-3 пики изоакцепторных фракций определены нечетко, растянуты, область перекрывания пиков значительна.

ХОФ-5-система имеет преимущество перед другими системами при разделении аминокислот-тРНК вследствие высокой скорости элюции [141]. Колонки стабильны в работе и могут использоваться 30—40 раз. Применяемое в ХОФ-6-системе четвертичное основание аммония — триоктилпропиламмонийбромид — слабо растворимо в воде, и колонки указанной хроматографической системы могут быть использованы 3—6 раз.

Первые системы, предложенные для хроматографии в обращенной фазе — ХОФ-1 и ХОФ-2, — дают хорошее распределение индивидуальных тРНК по всей хроматограмме, что делает их незаменимыми при изучении гетерогенности тРНК. Сравнение профилей элюции лейцил-тРНК, полученных на колонке МАК, в ХОФ-1- и ХОФ-2-системах показало очевидное преимущество ХОФ-2-системы для фракционирования тРНК [134]. ХОФ-1- и ХОФ-2-системы удачно использовались для изучения гетерогенности тРНК различного происхождения [126, 137, 142], а также в сочетании с гельфильтрацией для получения высокоочищенных лейциновой и фенилаланиновой тРНК *E. coli* [127, 136]. Однако необходимо отметить, что системы ХОФ-1 и ХОФ-2 мало применяются для препаративного хроматографирования, поскольку скорость элюции в них лимитируется диффузией через промежуточную фазу. ХОФ-2-система очень чувствительна к изменению в хромосорбе W и структурным особенностям изучаемой

тРНК, поэтому воспроизводимость экспериментов не всегда абсолютна [131].

ХОФ-3-система вначале использовалась для получения индивидуальных тРНК в полупрепаративных количествах. Для нее характерно то, что формилметиониновая-тРНК элюируется в первых фракциях и может быть отделена от тРНК другой специфичности [143]. Затем система ХОФ-3 была модифицирована для хроматографии малых количеств аминоксил-тРНК и применялась для разделения метиониновой и формилметиониновой тРНК на аналитических колонках [130, 135, 139, 143]. В процессе эксплуатации ХОФ-3-система надежна и позволяет получить воспроизводимые результаты. Недостатком ее является небольшая, однако ощутимая растворимость четвертичного производного аммония, что в значительной мере ограничивает использование упаковки колонки [139].

ХОФ-4-система позволяет получить хорошее разделение индивидуальных тРНК, элюирующихся в последних фракциях градиента. В этой системе были хорошо разделены две фенилаланиновые тРНК. Акцепторная способность составляла для тРНК₁^{Фен} — 880 нмоль на оптическую единицу, для тРНК₂^{Фен} — 1042 нмоль на оптическую единицу [131]. ХОФ-4-система стабильна в работе, упаковка колонки может быть использована несколько раз, результаты хроматографического разделения отличаются высокой воспроизводимостью.

Учитывая преимущества и недостатки каждой из систем хроматографии в обращенной фазе, описанный методический прием широко используют для получения высокоочищенных индивидуальных тРНК, главным образом на завершающих стадиях очистки.

При выделении метиониновой, тирозиновой, валиновой и фенилаланиновой тРНК *E. coli* [138] на первом этапе была применена хроматография на ДЭАЭ-сефадексе, повторное фракционирование обогащенных препаратов специфических тРНК проводили с помощью хроматографии в обращенной фазе [127]. тРНК^{Тир}, тРНК^{Мет} и тРНК^{Фен} были выделены в виде препаратов соответственно 65, 84 и 90% -ной чистоты.

Комбинацией фракционирования тРНК на ДЭАЭ-сефадексе и в обращенной фазе по Келмерсу [126, 127] были получены: гистидиновая тРНК из дрожжей [144], четыре сериновых тРНК из клеток *E. coli* [145] и обогащенные препараты тРНК^{Фен}, тРНК^{Тир} и тРНК^{Вал} из печени крыс [103].

Применение хроматографии на ДЭАЭ-сефадексе, БД-целлюлозе и ХОФ-2-системе легло в основу метода выделения метиониновых тРНК из *E. coli* [146]. Эти же методические приемы были использованы при выделении препаративных количеств валиновых тРНК из пекарских дрожжей [147]. Предварительно обогащенные хроматографией на БД-целлюлозе в градиенте хлористого натрия при рН 3,5 в отсутствие Mg²⁺ тРНК₁^{Вал} и тРНК₂^{Вал},

рехроматографировали соответственно на БД-целлюлозе в присутствии Mg^{2+} при pH 5 и в сульфатной системе на ДЭАЭ-сефадексе А-25. Окончательной очистки препаратов удалось достигнуть, применяя хроматографию в обращенной фазе [130].

Как видно из представленных данных, при получении высокоочищенных индивидуальных тРНК из различных объектов исследования используется обычно сочетание нескольких методических приемов. Следует также отметить, что методы выделения специфических тРНК из микробных объектов не всегда достаточно эффективны и применимы без модификации при работе с животными тканями. Очевидно, этим объясняется то, что в настоящее время из животных тканей выделено относительно небольшое количество высокоочищенных индивидуальных тРНК. Недавно предложенные системы для хроматографии в обращенной фазе (ХОФ-5 и ХОФ-6) имеют преимущества перед иными системами при работе с животными тканями [132, 140]. Использование хроматографии в обращенной фазе в системах ХОФ-5 и ХОФ-6 в сочетании с фракционированием на БД-целлюлозе и ДЭАЭ-сефадексе позволило выделить пять индивидуальных тРНК из печени теленка [40]. Препараты тРНК₁^{Лей}, тРНК_{Асп}, тРНК₃^{Сер}, тРНК_{Лиз}, тРНК_{Фал} имели чистоту 87—100%.

Предложен вариант разделения аминоксил-тРНК в системе ХОФ-5 на капиллярных колонках [148]. В качестве колонок использовали капиллярную часть пастеровских пипеток. Для хроматографического разделения на колонку может быть сорбировано 0,1 А₂₆₀ суммарного препарата тРНК, аминокислотированного по ¹⁴С-или ³Н-аминокислоте. При использовании высокоактивных аминокислот количество анализируемой тРНК может быть снижено на порядок. Хроматографию проводят при комнатной температуре, время элюции 40—60 мин.

Работы, проводимые в Институте молекулярной биологии и генетики АН УССР по изучению особенностей тРНК и АРСаз при различных функциональных состояниях организма, стимулировали исследования по подбору методических подходов для выделения высокоочищенных индивидуальных тРНК из печени кролика и молочной железы коров.

Для первой стадии фракционирования была выбрана хроматография на БД-целлюлозе, поскольку эта хроматографическая система обладает высокой емкостью, что более всего подходит для препаративных экспериментов, а также хорошей разрешающей способностью по разделению тРНК, акцептирующих одну и ту же аминокислоту.

На первой стадии фракционирования суммарного препарата тРНК печени кролика получено четкое разделение трех лейциновых тРНК, причем хроматография на БД-целлюлозе дает 6—10-кратную очистку каждой изоакцепторной фракции. Чистота лейциновых тРНК после первой стадии очистки составляла 22—

36,5% (табл. 1). Специфическая активность тРНК^{Фен} после хроматографии на БД-целлюлозе была в 15 раз выше, чем активность по акцептированию фенилаланина суммарного препарата тРНК. Чистота выделенной тРНК^{Фен} составляла 30%. Частично

Таблица 1

Очистка тРНК^{Лей} и тРНК^{Фен} печени кролика

Фракции тРНК	тРНК, о. е. 260*	Удельная актив- ность, пк/моль о. е. 260	Суммар- ная актив- ность, нмоль	Чисто- та, %
тРНК^{Лей}				
Суммарная	11 500	60	690	
После БД-целлюлозы, рН 5				
тРНК ^{Лей} ₁	288	510	146	36
тРНК ^{Лей} ₂	120	612	73	36,5
тРНК ^{Лей} ₃	240	357	86	22,0
После ХОФ-5				
тРНК ^{Лей} ₂	16,3	1360	22,5	80
тРНК^{Фен}				
Суммарная тРНК	11 500	34	392	
После БД-целлюлозы	384	510	196	30
После ХОФ-5				
тРНК ^{Фен} ₂	28,8	1480	43	87

* О. е. 260 — количество оптических единиц при 260 нм.

очищенные препараты тРНК^{Лей}₂ и тРНК^{Фен} подвергались дальнейшей очистке хроматографией в обращенной фазе в системе ХОФ-5 [40]. тРНК^{Фен} в ХОФ-5-системе разделилась на три компонента. Условия хроматографии в ХОФ-5-системе представлены в табл. 2. После хроматографии в обращенной фазе [132] чистота тРНК^{Лей}₂ и тРНК^{Фен}₂ достигала соответственно 80 и 87% (см. табл. 2).

При фракционировании препаративных количеств тРНК молочной железы качественное разделение на изоакцепторные фракции представляет особую трудность, поскольку в суммарном препарате тРНК молочной железы содержится 6 лейциновых тРНК, причем все эти фракции элюируют с БД-целлюлозы вместе с тРНК иной аминокислотной специфичности и занимают на хроматограмме широкую область. Поэтому для более полного

разделения изоакцепторных тРНК^{Лей} область, содержащую всю лейцин-акцепторную активность на стадии БД-целлюлозы, рехроматографировали на том же сорбенте, однако в измененных хроматографических условиях, которые представлены в табл. 3.

Повторная хроматография на БД-целлюлозе позволила получить три группы лейциновых тРНК, чистота каждой из которых была 20% (табл. 4). Чистота фенилаланиновой тРНК после пер-

Таблица 2

Условия хроматографии частично обогащенных препаратов тРНК^{Лей} и тРНК^{Фен} печени кролика в ХОФ-5-системе

	Количество сорбированной тРНК, о. е. 260	Перепад градиента, М NaCl	Объем градиента, мл	Скорость элюции, мл/мин	Объем фракций, мл
тРНК ^{Лей} ₁	108	0,4—1,1	200	0,5	4,0
тРНК ^{Лей} ₂	66	0,5—0,9	300	0,2	4,0
тРНК ^{Лей} ₃	115	0,5—0,95	360	0,5	3,5
тРНК ^{Фен} ₁	192	0,45—1,05	360	0,32	4,5
тРНК ^{Фен} ₂	163	0,45—0,95	400	0,5	3,5

Таблица 3

Условия хроматографии тРНК молочной железы на БД-целлюлозе и в ХОФ-5-системе

Опыт	Количество тРНК, о. е. 260	Размер колонки, см	Градиент		рН	Число разделенных фракций
			объем, л	перепад, М NaCl		

БД-целлюлоза

1-й	15600	3×40	3,0	0,2 —1,0	5,0
2-й	56400	4,3×76	8,0	0,2 —1,0	5,0
	8160	3,0×45	4,0	0,25—0,6	4,0

ХОФ-5-система

тРНК ^{Лей} ₂	250	0,8×70	0,4	0,45—0,95	4,5	1 (2-я)
тРНК ^{Лей}	38,4	0,8×70	0,2	0,45—0,95	4,5	1 (тРНК ^{Лей} ₅)
	576,0	1,2×90	2,0	0,45—0,95	4,5	3 (1-я, 3-я, 4-я)
тРНК ^{Фен}	1320,0	2,3×95	2,5	0,45—0,95	4,5	2 (2-я, 6-я)
	1648,0	2,3×95	2,4	0,45—0,95	4,5	3 (1-я, 2-я, 3-я)

ного фракционирования на БД-целлюлозе составляла 25%. После хроматографии в ХОФ-5 системе получено шесть лейциновых и три фенилаланиновых тРНК из молочной железы коров периода лактации. Выделенные препараты специфичных тРНК содержали 40—100% тРНК^{Лей} и 40—70% тРНК^{Фен}. Номера изоакценторных фракций определяли порядком их элюции в градиенте NaCl

Таблица 4

Очистка тРНК^{Лей} и тРНК^{Фен} молочной железы периода лактации

Номер опыта	Фракции тРНК	О. е. 260	Удельная активность, пкмоль/ /о. е. 260	Суммарная активность, нмоль	Чистота, %
тРНК^{Лей}					
1	Суммарная тРНК	15600	51	795	3,1
	После БД-целлюлозы, рН 5,0	234	238	54	14,0
2	После ХОФ-5, тРНК ₂ ^{Лей}	17,3	1,156	20	68,0
	Суммарная тРНК	56000	49,5	2793	3,0
	После БД-целлюлозы, рН 5,0	8,160	264,0	2145	16,5
	После БД-целлюлозы, рН 4,0, тРНК ₅ ^{Лей}	38	330,0	12,5	19,8
	тРНК ₁ ^{Лей} + тРНК ₃ ^{Лей} + тРНК ₄ ^{Лей}	576	330,0	188,0	19,8
	тРНК ₂ ^{Лей} + тРНК ₆ ^{Лей}	1322	340,0	449,0	20,0
	После ХОФ-5				
	тРНК ₁ ^{Лей}	60	749,0	44,9	40,0
	тРНК ₂ ^{Лей}	420	927,0	389,0	56,0
	тРНК ₃ ^{Лей}	924	1049,0	93,7	63,0
тРНК ₄ ^{Лей}	3,0	1485,0	5,4	89,0	
тРНК ₅ ^{Лей}	54,0	1201,0	6,1	72,0	
тРНК ₆ ^{Лей}	14,0	1669,0	23,4	100	
тРНК^{Фен}					
	Суммарная тРНК	56400	63	3270	3,6
	После БД-целлюлозы, рН 5, тРНК ₁₋₃ ^{Фен}	1648	432	712	25
	После ХОФ-5				
	тРНК ₁ ^{Фен}	50,4	870	43,8	50
	тРНК ₂ ^{Фен}	441	1160	511,5	70
	тРНК ₃ ^{Фен}	78,4	665	12,0	40

при фракционировании в ХОФ-5 - системе. тРНК₁^{Лей}, тРНК₂^{Лей}, тРНК₃^{Лей} и все изоакцепторные тРНК^{Фен} были получены в значительном количестве. Выход тРНК₂^{Лей} и тРНК₂^{Фен} составлял почти 2,5% (каждая) от нефракционированной.

Таким образом, использованные хроматографические системы достаточно эффективны применительно к животным тканям и позволяют получить высокоочищенные препараты индивидуальных тРНК в полу- и препаративных количествах.

Как отмечалось, выделение высокоочищенных индивидуальных тРНК открывает широкие перспективы для изучения химической основы функционирования этих биополимеров. Получение химически гомогенных препаратов тРНК явилось основой для расшифровки первичной структуры ряда тРНК животного и микробного происхождения, что, в свою очередь, является предпосылкой для решения таких проблем, как значение множественности тРНК, природа белково-нуклеинового узнавания, видовая и органная специфичность тРНК и АРСаз, изучение пространственной структуры.

ЛИТЕРАТУРА

1. Tissieres A. Some properties of RNA from *E. coli*.— *J. Mol. Biol.*, 1969, **1**, 365.
2. Cantoni G., Gelboin H., Luborsky S., Richards H., Singer M. Preparation and properties of rabbit sRNA.— *Biochim. Biophys. Acta*, 1962, **61**, 354.
3. Smith. Isolation of «soluble» RNA without an ultracentrifuge.— *Biochim. Biophys. Acta*, 1960, **40**, 360.
4. Osawa S. Preparation and some properties of a soluble ribonucleic acid from yeast.— *Biochim. Biophys. Acta*, 1960, **43**, 110.
5. Zubay G. The isolation and fractionation of soluble ribonucleic acid.— *J. Mol. Biol.*, 1962, **4**, 347.
6. Rosenbaum M., Brown R. Simplified preparation and properties of undergrated rat liver transfer ribonucleic acid.— *Anal. Biochem.*, 1968, **2**, 15.
7. Ehrenstein G. von. Isolation of sRNA from intact *E. coli* cells.— In: *Methods in Enzymology*, **12**, part A. New York—London, Acad. Press, 1967, 588.
8. Кирби К. Выделение и фракционирование нуклеиновых кислот.— В кн.: *Нуклеиновые кислоты*. М., «Мир», 1966, 24.
9. Monier R., Stephenson M., Zamecnik P. The preparation and some properties of a low molecular weight RNA from Baker's yeast.— *Biochim. Biophys. Acta*, 1960, **43**, 1.
10. Kirby K. A new method for the isolation of RNA's from mammalian tissues.— *Biochem. J.*, 1956, **64**, 605.
11. Holley R., Apgar J., Doctor P., Farrow J., Marini M., Merrill S. A simplified procedure for the preparation of tyrosine- and valine-acceptor fractions of yeast «soluble ribonucleic acid».— *J. Biol. Chem.*, 1961, **236**, 200.
12. Holley R. Large-scale preparation of yeast «soluble» ribonucleic acid.— *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1963, **10**, 186.
13. Фролова Л. Ю., Киселев Л. Л. Выделение транспортных («растворимых») рибонуклеиновых кислот и определение их акцепторной активности.— *Биохимия*, 1963, **28**, 722.

14. Алтунина В. К., Василенко С. К., Коржов В. А., Сандахчиев Л. С. Выделение и характеристика растворимой РНК из пивных дрожжей.— Биохимия, 1964, 29, 53.
15. Сандахчиев Л. С., Старостина В. К., Стефанович Л. Е., Чучаев В. М. Применение сорбции на аминоэтилцеллюлозе для выделения тРНК из водного слоя после фенольной экстракции.— Мол. биол., 1967, 1, 463.
16. Bauer S., Milner Y., Liv E., Shiloach J., Groot N. de, Lapidot Y. A modified procedure for the large-scale preparation of tRNA from *E. coli*.— Biotechnol. a. Bioeng., 1973, 15, 6, 1081.
17. Lindal T., Fresco J. Preparation of highly purified sRNA from yeast.— In: Method in Enzymology, 12, part A. N. Y.— L., 1967, 601.
18. Onodera K., Komano T. Glycine-specific transfer ribonucleic acid in the posterior silk gland in *Bombyx mori*.— Biochim. Biophys. Acta, 1964, 87, 338.
19. Hayashi H., Fisher H., Söll D. Transfer ribonucleic acid from *Mycoplasma*.— Biochemistry, 1969, 8, 3680.
20. Legocki A., Szym-Kowiak A., Pech K., Pawelkiewicz J. Isolation and properties of soluble ribonucleic acid from yellow lupin seeds.— Acta biochim. Pol., 1976, 14, 323.
21. Crestfield A., Smith K., Allen F. The preparation and characterization of ribonucleic acids from yeast.— J. Biol. Chem., 1955, 216, 185.
22. Berg P.— Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 1958, 44, 78.
23. Klee C., Staehelin M. Comparative study of different preparations of yeast soluble ribonucleic acid.— Biochim. Biophys. Acta, 1962, 61, 618.
24. Burkard G., Weil J., Ebel J. Etude comparative de differentes preparations d'acids ribonucleique soluble de levure.— Bull. Soc. Chim. Biol., 1965, 47, 545.
25. Glitz D., Dekker C. The purification and properties of ribonucleic acid from wheat germ.— Biochemistry, 2, 1185, 1963.
26. Чучаев В. М., Бахвалов О. В., Хмельницкий А. Г., Мензорова Н. И., Сандахчиев Л. С. Выделение транспортной РНК из дрожжей.— Прикл. биохим. микробиол., 1967, 3, 3, 336.
27. Мирзабеков А. Д., Крутилина А. И., Горшкова В. И., Баев А. А. Выделение транспортной рибонуклеиновой кислоты из растворов флотацией ее цетавлоновых солей.— Биохимия, 1964, 29, 1158.
28. Будовский Э. И., Грачев М. А. Метод выделения транспортной РНК из пекарских дрожжей.— Вopr. мед. химии, 1964, 10, 431.
29. Jones A. The isolation of bacterial nucleic acids using acetyltrimethylammonium bromide (cetavlon).— Biochim. Biophys. Acta, 1953, 10, 607.
30. Мирзабеков А. Д., Венкстерн Т. В., Баев А. А. Олигонуклеотиды рибонуклеазного гидролизата суммарной транспортной РНК пекарских дрожжей.— Биохимия, 1965, 30, 825.
31. Dutta S., Jones A., Stacey A. The preparation of deoxypentosenucleic acids and pentosenucleic acids.— Biochim. Biophys. Acta, 1953, 10, 613.
32. Delinas N., Staehelin M. The preparation of rat liver soluble ribonucleic acid.— Biochim. Biophys. Acta, 1966, 119, 385.
33. Rogg H., Wehrli W., Staehelin M. Isolation of mammalian tRNA.— Biochim. Biophys. Acta, 1969, 195, 13.
34. Deutscher M. Rat liver glutamyl transfer RNA synthetase.— J. Biol. Chem., 1967, 242, 1123.
35. M. B. Jacob Spurgeon, Anandara J., Cherayil J. A simple method for large-scale preparation of chick embryo tRNA.— Anal. Biochem., 1974, 58, 190.
36. Brungraber E. A simplified procedure for the preparation of «soluble» RNA from rat liver.— Biochem. Biophys. Res. Commun., 1962, 8, 1.
37. Petrissant G., Boissnard M., Puissant C. Large scale preparation of rabbit liver tRNA. Isolation of tRNAs specific for methionine, phenylalanine, serine, tryptophan and valine.— Biochemie, 1971, 53, 1105.

38. Robison B., Zimmerman T. A modified procedure for large-scale preparation of beef liver tRNA.— *Anal. Biochem.*, 1970, **37**, 11.
39. Igarashi S., Dufresne M. Large-scale preparation rabbit liver tRNA.— *Anal. Biochem.*, 1972, **47**, 102.
40. Pearson R., Hancher C., Weiss J., Holladay D., Kellers A. Preparation of crude transfer RNA and chromatographic purification of five transfer RNAs from calf liver.— *Biochim. Biophys. Acta*, 1973, **294**, 236.
41. Wasner R., Vaimberg P. Counter current fractionation of ribonucleic acid.— *Federat. Proc.*, 1958, **17**, 331.
42. Holley R., Merrill S. Counter current distribution of an active ribonucleic acid.— *J. Amer. Chem. Soc.*, 1959, **81**, 753.
43. Holley R., Appgar J., Merrill S., Doctor B., Farrow J., Marini M. A simplified procedure for the preparation of tyrosine-, valine-acceptor fractions of yeast soluble RNA.— *J. Biol. Chem.*, 1961, **236**, 200.
44. Doctor B., Connelly C. Separation of yeast amino acid acceptor ribonucleic acids by counter current distribution in modified Kirby's system.— *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1961, **6**, 201.
45. Zachau H., Tada M., Lawson W., Schweiger M. Fraktionierung der löslichen ribonucleinsäure.— *Biochim. Biophys. Acta*, 1961, **53**, 221.
46. Zachau H. G. et al. The structure of two serine transfer ribonucleic acids.— *Hoppe-Sey. Z. Physiol. Chem.*, 1966, **347**, 212.
47. Appgar J., Holley R., Merrill S. Purification of the alanine-, valine-, histidine-, tyrosine-acceptor ribonucleic acids from yeast.— *J. Biol. Chem.*, 1962, **237**, 796.
48. Doctor B., Appgar J., Holley R. Fractionation of yeast amino acid-acceptor ribonucleic acids by countercurrent distribution.— *J. Biol. Chem.*, 1961, **236**, 1117.
49. Weisblum B., Benzer S., Holley R. A physical basis for degeneracy in amino acids code.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1962, **48**, 1449.
50. Goldstein J., Bennet T., Craig L. Counter current distribution studies of *E. coli* sRNA.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1964, **51**, 119.
51. Weismeyer H., Kjellin K., Boman H. Counter-current distribution of bacterial soluble RNA in an aqueous-phase system.— *Biochim. Biophys. Acta*, 1962, **61**, 625.
52. Karau W., Zachau H. Isolierung von serinspezifischen transfer — ribonucleinsäure-fractionen.— *Biochim. Biophys. Acta*, 1964, **91**, 549.
53. Dütting D., Karau W., Melchess F., Zachau H. Nucleotidsequenzen in serinspezifischen transfer-ribonucleinsäuren.— *Biochim. Biophys. Acta*, 1965, **108**, 194.
54. Appgar J., Holley R. Differences between yeast and rat liver amino acid-specific soluble RNA shown by counter current distribution.— *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1962, **8**, 391.
55. Post O., Craig I. A new type of stepwise counter current distribution train.— *Anal. Chem.*, 1963, **35**, 641.
56. Imura N., Weiss G., Chambers R. Fractionation of transfer ribonucleic acid by counter double current distribution.— *Biochemistry*, 1969, **8**, 4776.
57. Венкстерн Т. В. Первичная структура транспортных рибонуклеиновых кислот. М., «Наука», 1970.
58. Everett G., Merrill S., Holley R. Separation of amino-acid specific «soluble» ribonucleic acids by partition chromatography.— *J. Amer. Chem. Soc.*, 1960, **82**, 5757.
59. Tanaka K., Richards H., Cantoni G. Studies on soluble ribonucleic acid. Partition chromatography of yeast «soluble» ribonucleic acid on Sephadex.— *Biochim. Biophys. Acta*, 1962, **61**, 846.
60. Bergquist P., Robertson J. Nucleotide sequences from yeast serine-acceptor ribonucleic acid.— *Biochim. Biophys. Acta*, 1965, **103**, 579.

61. Muench K., Berg P. Fractionation of tRNA by gradient partition chromatography on Sephadex columns.— *Biochemistry*, 1966, 5, 970.
62. Zamechnik P. C., Yu C. T. Modification of tRNAs by bromination.— In: *Method in Enzymology*, 20, part. C. N. Y., 1971, 175.
63. Zamecnik P., Stephenson M., Scott J. Partial purification of soluble RNA.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1960, 46, 811.
64. Stephenson M., Zamecnik P. Purification of valine transfer RNA by combined chromatographic and chemical procedures.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1961, 47, 1627.
65. Laskov R., Margoliash E., Littauer U. High-molecular-weight ribonucleic acid from rat liver.— *Biochim. Biophys. Acta*, 1959, 33, 247.
66. Фролова Л. Ю., Сандахчиев Л. С., Кнорре Д. Ф., Киселев Л. Л. Выделение индивидуальных фракций тРНК с использованием полиакрильгидразидагарового геля.— *ДАН СССР*, 1964, 158, 235.
67. Мирзабеков А. Д., Крутилина А. И., Решетов П. Д., Сандахчиев Л. С., Кнорре Д. Г., Хохлов А. С., Баев А. А. Препаративное получение обогащенной валинацепторной тРНК из пекарских дрожжей.— *ДАН СССР*, 1965, 160, 1200.
68. Грачев М. А., Мензорова Н. И., Сандахчиев Л. С., Будовский Э. И., Кнорре Д. Г. Выделение валин-специфичных тРНК.— *Биохимия*, 1966, 31, 840.
69. Mehler A., Bank A. Isolation of specific transfer ribonucleic acids by a general method using N-carboxy anhydrides.— *J. Biol. Chem.*, 1963, 238, PC 2288.
70. Simon S., Littauer U., Katchalski E. Preparation and isolation of specific transfer ribonucleic acid-polypeptides.— *Biochim. Biophys. Acta*, 1964, 80, 169.
71. Katchalski E., Yankofsky S., Novogrodsky A., Galenter Y., Littauer U. A chemical method for the purification of amino acid-specific transfer RNAs.— *Biochim. Biophys. Acta*, 1966, 123, 641.
72. Littauer U., Yankofsky S., Novogrodsky A., Bursztyn H., Galenter Y., Katchalski E. Synthesis of peptidyl aminoacyl transfer RNA a chemical method for the purification of transfer RNA's.— *Biochim. Biophys. Acta*, 1969, 195, 29.
73. Mandel J., Herchey A. A fractionating column for analysis of nucleic acid.— *Anal. Biochem.*, 1960, 1, 66.
74. Sueoka N., Yamane T. Fractionation of aminoacyl — acceptor RNA on methylated albumin column.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1962, 48, 1454.
75. Okamoto T., Kawade Y.— Fractionation soluble tRNA by a methylated albumin column of increased capacity.— *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1963, 13, 324.
76. Stern R., Littauer U. Fractionation of transfer ribonucleic acid on a methylated albumin-silicic acid column. I. Preparation of the column.— *Biochemistry*, 1968, 7, 3469.
77. Goldin H., Kaizer I. Interaction of transfer RNA from *E. coli* and methylated bovine serum albumin.— *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1969, 36, 1013.
78. Chuang R., Doi R. Isolation of a lysine tRNA species from *Bacillus subtilis* by use of chemical modification.— *Biochim. Biophys. Acta*, 1972, 272, 53.
79. Hartman G., Coy U. Fraktionierung der aminosäure spezifischen löslichen ribonucleinsäuren.— *Biochim. Biophys. Acta*, 1961, 47, 612.
80. Muench K., Berg R. Resolution of aminoacyl transfer ribonucleic acid by hydroxyapatite chromatography.— *Biochemistry*, 1966, 5, 982.
81. Pearson R., Kelmers A. Separation of tRNA by hydroxyapatite columns.— *J. Biol. Chem.*, 1966, 241, 767.
82. Dirheimer G. Chromatographie des acides ribonucleiques de transfert de levure de biere sur colonne d'hydroxyapatite.— *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1968, 50, 1221.

83. Barnett E., Epler J. Fractionation and specificities of two aspartyl-ribonucleic acid and two phenylalanyl-ribonucleic acid synthetases.—*Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1966, **55**, 184.
84. Legocki A., Szymkowiak A., Hierowski M., Pawelkiewicz J. Heterogeneity of transfer ribonucleic acids from yellow lupin seeds.—*Acta biochim. Pol.*, 1968, **15**, 197.
85. Dirheimer G., Sabeur G., Ebel J. Isolement d'un aspartate tRNA, de levure de biere hautement purifie.—*Biochim. Biophys. Acta*, 1967, **149**, 587.
86. Schofield P. Isolation and some properties of methionine transfer ribonucleic acid from *E. coli*.—*Biochemistry*, 1970, **9**, 1694.
87. Cherayil I., Bock R. A column chromatographic procedure for the fractionation of sRNA.—*Biochemistry*, **4**, 1174, 1965.
88. Bock R., Cherayil J. Chromatography of sRNA on DEAE-cellulose and DEAE-Sephadex.—In: *Methods in Enzymology*, **12**, part A. 1967, 638.
89. Baguley B., Bergquist P., Ralph R. Fractionation of amino acid acceptor ribonucleic acids on DEAE-cellulose columns.—*Biochim. Biophys. Acta*, 1965, **95**, 510.
90. Bergquist P., Baguley B., Robertson J., Ralph R. Fractionation of amino acid acceptor ribonucleic acid.—*Biochim. Biophys. Acta*, 1965, **108**, 531.
91. Bergquist P., Capecchi M. Fractionation of a supressor sRNA.—*J. Mol. Biol.*, 1966, **19**, 202.
92. Baguley B., Bergquist P., Ralph R. Fractionation of amino acid acceptor ribonucleic acid. Part III.—*Biochim. Biophys. Acta*, 1965, **108**, 139.
93. Bergquist P., Baguley B., Ralph R. The hot DEAE — column method for tRNA fractionation.—In: *Methods in Enzymology*, **12**, part A. 1967, 660.
94. Legocki A., Szymkowiak A., Pawelkiewicz J. Isolation of isoleucine-specific transfer ribonucleic acid from yellow lupin seeds.—*Acta biochim. Pol.*, 1968, **15**, 183.
95. Kawata M., Nakazawa K., Takemura S. Fractionation of transfer ribonucleic acids from *Torulopsis utilis*. IX. Purification of the alanine, valine and isoleucine transfer ribonucleic acids by column chromatography.—*J. Biochem.*, 1967, **62**, 161.
96. Miyazaki M., Kawata M., Takemura S. Fractionation of transfer ribonucleic acids from *Torulopsis utilis*. I. Chromatography on a DEAE-Sephadex column with concentration gradient of ammonium sulfate and potassium chloride containing organic solvent.—*J. Biochem.*, 1966, **60**, 519.
97. Miyazaki M., Takemura S. Fractionation of transfer ribonucleic acids from *Torulopsis utilis*. II. Chromatography on a DEAE-Sephadex column in phosphate and in borate.—*J. Biol. Chem.*, 1966, **60**, 526.
98. Takemura S., Mizutani T., Miyazaki M. The primary structure of valine-1 transfer ribonucleic acid from *Torulopsis utilis*.—*J. Biochem.*, 1968, **63**, 277.
99. Takemura S., Murakami M., Miyazaki M. Primary structure of isoleucine transfer ribonucleic acid from *Torulopsis utilis*.—*J. Biochem.*, 1969, **65**, 553.
100. Hashimoto S., Miyazaki M., Takemura S. Nucleotide sequence of tyrosine transfer ribonucleic acid from *Torulopsis utilis*.—*J. Biochem.*, 1969, **65**, 659.
101. Kawade Y., Okamoto T., Yamamoto Y. Fractionation of soluble RNA by chromatography on DEAE-ion exchange.—*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1963, **10**, 200.
102. Blobstein I., Grunberger D., Weinstein I., Nakanishi K. Isolation and structure determination of the fluorescent base from bovine liver phenylalanine tRNA.—*Biochemistry*, 1973, **12**, 188.
103. Nishimura S., Weinstein B. I. Fractionation of rat liver tRNA.

- Isolation of tyrosine, valine, serine and phenylalanine tRNA and their coding properties.—*Biochemistry*, 1969, 8, 832.
104. Mäenpää P., Bernfield M. Quantitative variation in serine tRNA during estrogen-induced phosphoprotein synthesis of looster liver.—*Biochemistry*, 1969, 8, 4926.
 105. Taylor M. Benzoylated DEAE-cellulose chromatography of tumor and non-tumor tRNA.—*Cancer Res.*, 1970, 30, 10, 2463.
 106. Mittelman A. Patterns of isoaccepting phenylalanine tRNA in human leukemia and lymphoma.—*Cancer Res.*, 1971, 31, 647.
 107. Jesus T. G. S. de Gray E. D. Isoaccepting tRNA species in differing morphogenetic states of *Rhodospseudomonas spheroides*.—*Biochim. Biophys. Acta*, 1971, 254, 419.
 108. Wimmer E., Maxwell H., Tener G. A simple method for isolation highly purified yeast phenylalanine transfer ribonucleic acid.—*Biochemistry*, 1968, 7, 2623.
 109. Maxwell H., Wimmer E., Tener G. The isolation of yeast tyrosine and tryptophan tRNA.—*Biochemistry*, 1968, 7, 2629.
 110. Gillam G., Millward S., Blew D., Tigeström M., Wimmer E., Tener G. The separation of soluble ribonucleic acids on benzoylated DEAE-cellulose.—*Biochemistry*, 1967, 6, 3043.
 111. Litt M. A simple procedure for the purification on of yeast phenylalanine tRNA.—*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1968, 32, 507.
 112. Zimmerman T., Robison B., Gibbs J. Fluorescence as a conformational probe of beef liver phenylalanine tRNA.—*Biochim. Biophys. Acta*, 1970, 209, 151.
 113. Fink L., Lanks K., Goto T., Weinstein B. Comparative studies on mammalian and yeast phenylalanine tRNA.—*Biochemistry*, 1971, 10, 1873.
 114. Cittanova N., Petrissant G. Purification of mammalian tryptophan tRNA.—*Biochim. Biophys. Acta*, 1972, 262, 308.
 115. Gillam G., Millward S., Blew D., Tigeström M., Wimmer E., Tenet G. A general procedure for the isolation of specific tRNA.—*Biochemistry*, 1968, 7, 3459.
 116. Henes C., Krauskopf M., Ofengand J. A simple one-step for the preparation of highly purified formylmethionine transfer ribonucleic acid from *E. coli*.—*Biochemistry*, 1969, 8, 3024.
 117. Blank H., Söll D. Purification of five leucine transfer ribonucleic acid species from *E. coli* and their acylation by heterologous leucyl-transfer ribonucleic acid synthetase.—*J. Biol. Chem.*, 1971, 246, 4947.
 118. Roy K., Söll D. Fractionation of *E. coli* tRNA on benzoylated DEAE-cellulose.—*Biochim. Biophys. Acta*, 1968, 161, 572.
 119. Hayashi H., Söll D. Purification of an *E. coli* leucine supressor transfer ribonucleic acid and its aminoacylation by the homologous leucyl-transfer ribonucleic acid synthetase.—*J. Biol. Chem.*, 1971, 246, 4951.
 120. Ishida T., Sueoka N. The use of conformational changes to purify tryptophan tRNA from *E. coli*.—*Biochim. Biophys. Acta*, 1970, 217, 209.
 121. Chuang R., Doi R. Isolation of a lysine tRNA species from *Bacillus subtilis* by use of chemical modification.—*Biochim. Biophys. Acta*, 1972, 272, 53.
 122. Fitter F., Kruppa J., Zachau H. Two fractionation methods for tRNAs.—*Biochim. Biophys. Acta*, 1972, 277, 513.
 123. Roy K., Söll D. Purification of five serine tRNA species from *E. coli* and their acylation by homologous and heterologous seryl tRNA-synthetases.—*J. Biol. Chem.*, 1970, 245, 1394.
 124. Weissenbach G. J., Werner C., Dirheimer G. Purification du tRNA₂^{Arg} de levure de biere.—*Biochimie*, 1972, 54, 111.
 125. Bradley W. N., Tener G. Small analytical BD-cellulose columns for rapid chromatography of aminoacyl-tRNA.—*Anal. Biochem.*, 1973, 55, 394.
 126. Kelmers A., Stulberg M., Novelli G. Separation of tRNA by reverse-phase chromatography.—*J. Biol. Chem.*, 1965, 240, 3979.

127. Weiss I., Kelmers A. A new chromatographic system for increased resolution of tRNAs.— *Biochemistry*, 1967, **6**, 2507.
128. Auber-Sandor G., Beck G., Ebel J. Action des cells d'ammonium quaternaire sur les acides nucleiques. I. Solubilite des sels d'ammonium quaternaire des acides nucleiques dans les solvants organiques.— *Biochim. Biophys. Acta*, 1961, **53**, 1, 11.
129. Weil J., Ebel J. Action des sels d'ammonium quaternaire sur les acides nucleiques.— *Biochim. Biophys. Acta*, 1962, **55**, 836.
130. Weiss J., Pearson R., Kelmers A. Two additional reversed-phase chromatographic system for the separation transfer ribonucleic acids and their applications to the preparation of two formyl methionine and a valine transfer ribonucleic acid from *E. coli* B.— *Biochemistry*, 1968, **7**, 3479.
131. Kelmers A., Weeren H., Weiss I., Pearson R., Stulberg M., Novelli D. Reversed-phase chromatography system for tRNA-preparatory-scale methods.— In: *Methods in Enzymology*, 20. N. Y.— L., 1971, 9.
132. Pearson R., Weiss J., Kelmers A. Improved separation of tRNAs on polyclotrifluoroethylene-supporte reversed-phase chromatography column.— *Biochim. Biophys. Acta*, 1971, **288**, 770.
133. Kelmers A. Preparation of highly purified leucine transfer ribonucleic acid.— *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1966, **25**, 562.
134. Waters L., Novelli D. A new change in leucine tRNA observed in *E. coli* infected with bacteriophage T-2.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1967, **57**, 979.
135. Kelmers A. Effect of divalent metal ion on the reverse-phase chromatography.— *Biochemistry*, 1970, **9**, 4401.
136. Kelmers A. Preparation of highly purified phenylalanine transfer ribonucleic acid.— *J. Biol. Chem.*, 1966, **241**, 3540.
137. Yang W., Novelli G. D. Analysis of isoaccepting tRNA's in mamalian tissues and cells.— In: *Methods in Enzymology*, 20. N. Y.— L., 1971, 44.
138. Smith D., McNamara A. The tRNA content of rabbit reticulocytes. Enumeration of the individual species per cell.— *Biochim. Biophys. Acta*, 1972, **1**, 67.
139. Schugart L., Novelli G. D. Use of reversed-phase column chromatography for rapid isolation and identification of formylmethionine tRNA.— *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1969, **186**, 384.
140. Kelmers A., Heatherly D. Columns for the rapid chromatographic separation of small amounts of tracer-labeled transfer RNA.— *Anal. Biochem.*, 1971, **44**, 486.
141. Befort J. Etude comparative des acides ribonucleicnes de transfer extraits du foil de rat et de hepatome.— *Biochimie*, 1972, **54**, 1327.
142. Yang W., Novelli G. D. Isoaccepting tRNAs in mouse plasma cells tumors that synthesise different myeloma proteins.— *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1968, **31**, 354.
143. Schugart L., Novelli G. D. Modification of reversed-phase column chromatography for rapid isolation and identification of formylmethionine-tRNA.— *Int. Methods in Enzymology*, 20, part C, 1971, 35.
144. Takeishi K., Nishimura S., Ukita T. Purification of histidine-specific transfer RNA from yeast.— *Biochim. Biophys. Acta*, 1967, **145**, 605.
145. Ishikura H., Nishimura S. Fractionation of serine transfer ribonucleic acids from *E. coli* and their coding properties.— *Biochim. Biophys. Acta*, 1966, **155**, 72.
146. Seno T., Kobayashi M., Nishimura S. Two methionine tRNA's from *E. coli*.— *Biochim. Biophys. Acta*, 1968, **169**, 80.
147. Крюков В. М., Исаенко С. Н., Аксельрод В. Д., Баев А. А. Выделение и характеристика валиновых транспортных РНК *Saccharomyces cerevisiae*.— *Мол. биол.*, 1972, **6**, 860.
148. Hentzen D., Foubnier A., Garel J. Reversed-phase separation of aminoacyl-transfer RNA's on capillary columns.— *Anal. Biochem.*, 1973, **53**, 299.

Глава 2

ОБРАЗОВАНИЕ АМИНОАЦИЛ-тРНК

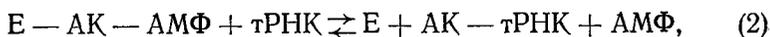
Известно, что роль тРНК в биосинтезе белка как посредника между аминокислотами и соответствующими им кодонами на матрице, была предсказана теоретически [1], а затем, начиная с момента открытия тРНК [2, 3], доказана в огромном количестве работ.

Условно участие тРНК в процессах белкового синтеза разграничивают как акцепторную и адапторную функции. Присоединение аминокислоты к тРНК — акцепторная функция — является ферментативным процессом и схематично осуществляется в два этапа.

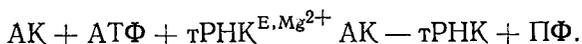
Первый этап — активация аминокислоты:



второй — перенос активированной аминокислоты на тРНК:



суммарная реакция:



На первой стадии активации аминокислоты происходит образование смешанного ангидрида между карбоксильной группой аминокислоты и 5'-фосфатом АМФ с освобождением пирофосфата. На втором этапе, вследствие взаимодействия аминоацил-аденилата с тРНК, на поверхности фермента происходит этерификация аминоацильного остатка аминокислоты 3'-гидроксилом рибозы терминального аденозина тРНК. Каждой аминокислоте соответствует одна или несколько изоакцепторных специфических тРНК и специфический фермент—аминоацил-тРНК-синтетаза (АРСаза). Вопрос о существовании изоферментов еще окончательно не решен. По рациональной классификации ферментов, одобренной Международным биохимическим союзом, ферменты этой группы имеют индекс 6.1.1 и называются аминоацил-тРНК-лигазами или аминоацил-тРНК-синтетазами.

Впервые активация аминокислот по карбоксильной группе в присутствии АТФ была обнаружена в осаждающей при рН 5,0 фракции цитоплазматических белков печени крыс [4]. В дальнейшем оказалось, что основная функция этих ферментов, именовавшихся вначале активирующими или «рН 5-ферментами»,

состоит в катализе образования аминоктил-тРНК, которые затем используются для синтеза полипептидных цепей на рибосомах.

После открытия аминоктил-тРНК-синтетаз и транспортных тРНК изучение взаимодействия этих макромолекул находится в центре внимания многих зарубежных и отечественных ученых. Это закономерно, так как правильная трансляция генетической информации зависит от присоединения аминокислоты к соответствующей специфической тРНК. К тому же процесс аминоктилации тРНК, катализируемый АРСазами, является одной из лучших моделей для изучения фундаментального явления — белково-нуклеинового «узнавания».

Огромное количество работ по данной проблеме суммировано в ряде обзоров, в том числе советских авторов [5—8]. Последние три года ознаменовались новыми достижениями в установлении механизма взаимодействия АРСаз с микросубстратами и тРНК. Настоящая глава является попыткой критически обобщить эти исследования, ценность которых во многом определена большими успехами, достигнутыми в области выделения из различных объектов высокоочищенных препаратов индивидуальных тРНК и АРСаз.

Ряд вопросов, связанных со специфичностью и кинетическими особенностями реакции аминоктилации, был разрешен с помощью использования «грубых» и частично очищенных препаратов ферментов. Однако для установления первичной и макромолекулярной структур АРСаз, функциональной роли отдельных аминокислот, для изучения тонких механизмов процесса «узнавания» и каталитического акта необходимым условием является получение высокообогащенных ферментных препаратов. Сложность задачи объясняется многостадийностью процедуры очистки и низкой стабильностью большинства АРСаз, особенно на последних этапах выделения. При работе с животными тканями большие затруднения возникают в связи с высокой активностью протеаз. Обычно процедура получения индивидуальных АРСаз включает не менее 4—6 последовательных стадий очистки, причем для каждого фермента из определенного объекта необходим подбор соответствующей схемы выделения, так как многие АРСазы существенно отличаются своими физико-химическими данными.

Для стабилизации АРСаз широко используют глицерин, меркаптоэтанол, дитиотреитол и ингибиторы протеаз. На первых этапах очистки обычно применяют ультрацентрифугирование, разделение в двухфазной системе по Альбертсону [9, 10] и ступенчатое фракционирование сульфатом аммония, причем АРСазы высаливаются в основном при 30—70%-ном насыщении сульфатом аммония. Хорошие результаты получены в ряде случаев при использовании метода адсорбции на гелях фосфата кальция и гидроксиды алюминия [11, 12].

Почти все исследователи успешно используют ионообменную

хроматографию, особенно на ДЭАЭ- и фосфоцеллюлозе [13—16], а на заключительном этапе наилучшие результаты обычно дает хроматография на гидроксипатите [16, 17]. Весьма эффективно проведение последовательной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе и гидроксипатите при разных значениях рН [9, 18]. Стандартными приемами являются также распределительная хроматография, гельфильтрация и электрофорез.

В последнее время получает распространение метод изоэлектрической фокусировки [19, 20], и особенно афинная хроматография [21—24]. Хроматография сродства — чрезвычайно перспективный метод, в частности при необходимости быстрого получения малых количеств АРСаз из различных источников в сравнительных экспериментах. Обычно субстрат (чаще аминокислота) иммобилизована на сефарозной колонке, однако в последнее время начали применять афинную элюцию [25, 26]. Многие синтетазы довольно прочно связываются с фосфоцеллюлозой. В отличие от афинной хроматографии при афинной элюции фермент снимается с колонки субстратом, находящимся в элюирующем растворе. Для очистки сериновой, фенилаланиновой, валиновой и изолейциновой синтетаз достаточным оказалось наличие двух оптических единиц (E_{260}) соответствующей тРНК в 1 мл раствора, причем последующее разделение специфических тРНК и АРСаз легко осуществляется хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе с 90%-ной сохранностью взятого для афинной элюции препарата индивидуальной тРНК.

При оценке гомогенности полученного препарата АРСаз руководствуются данными одновременно нескольких аналитических подходов — аналитические ультрацентрифугирование и электрофорез, рехроматография в условиях, не применявшихся в ходе очистки, иммунохимический анализ [7, 9, 16].

Необходимо подчеркнуть, что препараты высокоочищенных АРСаз в основном получены из дрожжей, *E. coli* и других микроорганизмов, в значительно меньшем количестве — из растительных и животных объектов.

Появление препаратов АРСаз, удовлетворяющих критериям гомогенности, дало возможность начать изучение их химической и макромолекулярной структуры, без знания которой невозможно выяснение тонких механизмов образования аминоксил-тРНК, катализируемого АРСазами. Наименьшие успехи достигнуты в изучении первичной структуры ферментов, что связано, по-видимому, как с довольно большими молекулярными весами (40 000—200 000 дальтон), так и с трудностью выделения значительных количеств гомогенного препарата. Отрывочные данные о первичной и вторичной структурах АРСаз суммированы в обзорах О. О. Фаворовой, А. В. Парина, О. И. Лаврик [7], И. Л. Киселева, О. О. Фаворовой [8].

Анализ аминокислотного состава ряда АРСаз показал преобладание остатков дикарбоновых и низкое содержание основных

аминокислот, на основании чего АРСазы можно отнести к классу кислых белков. Пока еще не расшифрована первичная структура ни одного фермента этой группы, однако в ближайшем будущем следует ожидать полного анализа аминокислотной последовательности метионил-тРНК-синтетазы *E. coli* [27].

В начальных исследованиях первичной структуры некоторых АРСаз установлен чрезвычайно интересный факт: наличие повторяющихся последовательностей в протомерах, молекулярный вес которых близок к 100 000 дальтон. Высказывается предположение, что в основе этого явления лежит дупликация гена с последующим слиянием [28, 29].

Что касается роли отдельных функциональных групп АРСаз, то до недавнего времени основное внимание уделяли SH-группам и дисульфидным мостикам. Почти все АРСазы принадлежат к группе тиоловых ферментов, и их чувствительность к SH-блокирующим реагентам описана во многих работах. В ряде случаев показано изменение числа титруемых SH-групп фермента в присутствии субстратов или продуктов реакции аминокислотирования тРНК [11, 32]. У авторов, изучавших SH-группы АРСаз разной аминокислотной специфичности или из различных объектов, нет единого мнения о их роли в процессах связывания субстратов и катализа. Есть основания считать, что SS-мостики участвуют в формировании активного центра лизил-тРНК-синтетазы *E. coli*, активность которой сохраняется в присутствии SH-блокирующих реагентов [30] и ингибируется относительно низкими концентрациями меркаптоэтанола [31]. В то же время лизил-тРНК-синтазы из зародышей пшеницы [32], печени крысы [33], дрожжей и асцитной опухоли [30] чувствительны к действию *n*ХМБ. В отношении глутамил-тРНК-синтетазы печени крыс [34] существует мнение, что SH-группы важны для каталитической активности фермента и не существенны для связывания субстратов.

В последние годы получены интересные данные о структуре полипептидных фрагментов в области активного центра АРСаз. Первая работа была выполнена на метионил-тРНК-синтетазе *E. coli* Брутоном и Хартли [35], которым удалось присоединить бифункциональный агент — *n*-нитрофенилхлороформат к аминокислотному остатку метионил-тРНК и α -NH₂-группе лизина ферментного белка. После обработки РНКазой и протеазой был выделен и расшифрован октапептид, находящийся в непосредственной близости, либо входящий в состав активного центра метионил-тРНК-синтетазы. Аналогичные приемы были использованы при изучении изолейцил-тРНК-синтетазы *E. coli* [36] и валлил-тРНК-синтетазы печени быка [37]. Однако существенные выводы, по-видимому, будут сделаны лишь после получения большого числа данных на ферментах разной аминокислотной специфичности и разного происхождения.

Вторичная структура АРСаз практически не изучена. Лишь для триптофанил-тРНК-синтетазы поджелудочной железы уста-

повлено, что степень спирализации составляет 35—40% [38]. Что касается общей формы и размеров АРСаз, то некоторый прогресс в их определении наметился после получения ряда АРСаз в кристаллическом состоянии [39—42]. По данным рентгеноструктурного анализа и электронной микроскопии лизил- и лейцил-тРНК-синтетазы дрожжей имеют форму эллипсоида.

Все большее число данных свидетельствует о том, что ряд АРСаз имеет «ядро», устойчивое к действию протеаз, которое окружено более рыхлой полипептидной «оболочкой», не имеющей существенного значения для энзиматической активности [8].

Изучение некоторых индивидуальных АРСаз методами флуоресценции показало, что значительное число гидрофобных триптофановых остатков открыто и расположено на поверхности фермента. Этот факт объясняют возможной ролью триптофана в связывании АРСаз с тРНК [43, 44].

Особый интерес представляет вопрос о субъединичном строении АРСаз в связи с бифункциональной природой этих ферментов. Многочисленные сведения о четвертичной структуре позволяют в настоящее время разделить АРСазы на три класса: 1 — состоящие из одной полипептидной цепи, 2 — из идентичных субъединиц, 3 — из неидентичных субъединиц. К первому классу, например, относятся валил-тРНК-синтетаза дрожжей [45] и *E. coli* [46], изолейцил- [47] и лейцил-тРНК-синтетаза [48] *E. coli*, аргинил-тРНК-синтетаза *Bac. stearothermophilus* [49]. В случае лейцил-тРНК-синтетаз *E. coli* простота макроструктуры оказалась кажущейся. Установлено, что после удаления избирательным протеолизом полипептидного фрагмента с молекулярным весом около 3000 фермент способен диссоциировать на две субъединицы [48].

Из идентичных субъединиц состоят: метионил- [8], серил- [50], лизил- [45], тирозил- [51] тРНК-синтетазы *E. coli*, лизил- [45], лейцил- [13] тРНК-синтетазы дрожжей, серил-тРНК-синтетаза печени кур [16], триптофанил-тРНК-синтетаза поджелудочной железы быка [52] и ряд других ферментов. Идентичными субъединицы в большинстве случаев считаются лишь на основании равенства молекулярного веса. Возможно, последующие химические и структурные исследования изменят наши представления по этому вопросу.

Из неидентичных субъединиц состоят: глицил-тРНК-синтетаза *E. coli* [53], фенил-тРНК-синтетаза дрожжей [54] и печени крыс [17] — тетрамер $\alpha\beta_2$ типа. Чрезвычайно интересные данные получены при изучении глутамил-тРНК-синтетазы *E. coli*, которая содержит каталитически активную субъединицу (56 К) и субъединицу (46 К), влияющую на родство фермента к субстратам [55]. Вообще, проблема активности субъединиц сложна, так как в большинстве работ применяются довольно жесткие условия для диссоциации фермента.

В связи с субъединичным строением ряда АРСаз возникает вопрос о локализации активных центров, ответственных за взаимодействие с низкомолекулярными субстратами и тРНК. Следует подчеркнуть, что, кроме стандартных методов определения активности АРСаз (метод $^{32}\text{ПФ}$ —АТФ обмена, гидроксаматный метод и включение радиоактивной аминокислоты в тРНК), для изучения механизмов взаимодействия АРСаз с субстратами широко применяются методы регистрации ферментсубстратных комплексов, равновесного диализа, молекулярной гибридизации, использование аналогов субстратов и др. [7]. АРСазы содержат ароматические аминокислоты и интенсивно люминесцируют, причем флуоресцентные характеристики в значительной степени зависят от изменений структуры молекулы. Флуориметрический метод изучения связывания АРСаз с субстратами был впервые применен Элен для валиновой синтетазы *E. coli* [56], а затем широко использован многими авторами.

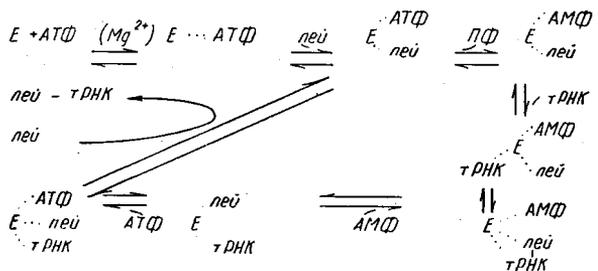
Используя широкий методический арсенал, многие авторы исследуют вопрос о числе участков связывания субстратов и возможной разобщенности их в связи с бифункциональной природой АРСаз. Результаты исследования метионил-тРНК-синтетазы *E. coli* показали, что димерная форма связывает по 2 моля АТФ, аминокислоты и 1,9 моля тРНК на 1 моль фермента, т. е. каждая субъединица обладает местами связывания для всех трех субстратов [57]. Существование аминокислота- и АТФ-связывающих участков на каждой субъединице показано также для лизил-тРНК-синтетазы *E. coli* и дрожжей [45], триптофанил-тРНК-синтетазы *E. coli* [58]. Интересно, что по одному связывающему участку для субстратов обнаружено не только для одноцепочечных ферментов [46, 49, 59], но и для ряда АРСаз субъединичного строения, в частности метионил- [60], тирозил-тРНК-синтетазы *E. coli* [61] и фенилаланин- [62], серил-тРНК-синтетазы дрожжей [63], которые связываются с тРНК в эквимоллярных количествах. Имея по одному участку для аминокислоты и тРНК, фенилаланиновая и сериновая синтетаза дрожжей, по данным Цахау [174], связывает более 2 молей АТФ на 1 моль фермента [174]. Однако при обсуждении данного вопроса следует с осторожностью относиться к результатам одного методического подхода. В этом отношении показательны данные изучения тирозил-тРНК-синтетазы *E. coli* [51]. Фермент состоит из двух равных субъединиц и, по данным равновесного диализа, связывает 1 моль тирозина на 1 моль АРСазы. Кинетический анализ дает возможность предположить наличие второго участка «слабого» связывания тирозина. Авторы считают, что, используя тонкие методические приемы, можно обнаружить второй участок с низким сродством к аминокислоте и у других АРСаз, состоящих из идентичных субъединиц.

Многочисленные данные, детально рассмотренные в работах [7, 8], свидетельствуют о структурной разобщенности центров.

взаимодействия с АТФ и аминокислотой, с одной стороны, и с тРНК, с другой. В то же время все большее внимание исследователей привлекает проблема функционального взаимодействия этих центров, без понимания которой невозможен анализ механизма работы фермента. Наряду с исследованиями кооперативности функционирования активирующего участка АРСаз и «узнающего» тРНК [64, 65], влияния аминокислот и АТФ на взаимодействие фермента с тРНК [63, 66, 67], дальнейшее развитие получили работы о влиянии тРНК на активацию аминокислот. Эта проблема приобретает особое значение в связи с предположением о том, что *in vivo* АРСазы находятся в комплексе с тРНК. Ранее было показано, что добавление тРНК оказывает стимулирующий эффект на реакцию $^{32}\text{P}\Phi\text{---АТФ}$ обмена, катализируемую глутаминил- и глутамил-тРНК-синтетазами *E. coli* [68], дрожжей и печени свиньи [69], печени крыс [34], аргинил-тРНК-синтетазой *E. coli* [70], дрожжей [71] и *Bac. stearothermophilus* [49]. Влияние тРНК на ферментативную активность АРСаз наблюдали также при использовании гидроксаматного метода.

В ряде случаев это влияние может быть объяснено вовлечением тРНК в реакцию обмена или переключением синтеза гидроксамата на путь гидроксиламинолиза аминоксил-тРНК [49, 72, 73]. С другой стороны, изменяя структуру каталитического центра или повышая эффективность связывания субстратов, тРНК может являться истинным активатором фермента. Деутчер предположил, что у тРНК-зависимых АРСаз может быть два места для связывания тРНК — одно для молекулы субстрата, а другое — для аллостерического эффектора [72]. Это предположение в настоящее время приобрело новое звучание в связи с открытием сложного строения одного из таких ферментов — глутамил-тРНК синтетазы *E. coli*, состоящей из каталитически активной субъединицы и меньшей субъединицы, по-видимому, регулирующей активность фермента [55].

С проблемой кооперативности функционирования активирующего и «узнающего» центров АРСаз тесно связан вопрос о порядке присоединения субстратов и последовательности самого хода реакции аминокислотирования. В настоящее время дискутируются два типа механизма действия АРСаз. Первый состоит из двух отдельных стадий с образованием стабильного аминоксил-аденилатферментного комплекса и последующим переносом активированной аминокислоты на транспортную РНК. Пользуясь классификацией Клеленда [74], разработавшего логику подхода к установлению порядка присоединения субстратов к АРСазам, такой механизм называют «Bi Uni Uni Bi Ping Pong» механизмом. Изучая взаимодействие лейцил-тРНК-синтетазы *E. coli*, с субстратами, а также основываясь на данных других авторов [59, 75—77], Шапвиль предложил следующую схему функционирования фермента:



Другие исследователи, изучающие АРСазы, также предполагают последовательное присоединение субстратов, однако в ином порядке: аминокислота, АТФ, тРНК [78]. Связывание тирозина в отсутствие других субстратов установлено и для тирозил-тРНК-синтетазы *E. coli* [51]. Авторы, изучавшие изолейцил-тРНК-синтетазу *E. coli*, считают, что оба комплекса — $E \cdots \text{ATP}$ и $E \cdots$ изолейцин образуются без необходимости присоединения к ферменту сначала какого-то одного субстрата [79]. тРНК, не закрывая места связывания АТФ, в то же время в три раза уменьшает количество присоединяющегося изолейцина. Исследуя механизм действия лизил-тРНК-синтетазы, авторы, не исключая возможности образования лизил-аденилатферментного комплекса, считают, что в присутствии тРНК реакция, по-видимому, минует аденилатный путь [80]. Такой механизм, названный «концертным», был простулирован еще в 1969 г. Лофтфильдом [81], по мнению которого взаимодействие глутамил-, глутаминил- и аргинил-тРНК-синтетаз (тРНК-зависимых ферментов) с субстратами более правильно отображает механизм действия АРСаз в физиологических условиях, учитывая данные об ассоциации тРНК и синтетаз в живой клетке. Такая точка зрения поддерживается и в более поздних работах [15, 49, 82]. Ряд фактов противоречит концертному механизму действия АРСаз. Так, есть данные, что лимитирующей стадией реакции аминоацилирования является освобождение аминоацил-тРНК из комплекса с ферментом [63, 83], которое активируется аминоациладенилатом [83]. Однако это противоречие может оказаться чисто внешним. Учитывая существенные структурные особенности индивидуальных АРСаз, можно предположить, что механизмы их действия различны. Возможно также, что механизм действия одного и того же фермента может быть различным в зависимости от условий функционирования. Последнее предположение не выглядит маловероятным, если учесть данные о пути образования аминоацил-тРНК в присутствии полиаминов. Показано, что спермин, спермидин и путресцин могут заменять Mg^{2+} в реакции аминоацилирования ряда тРНК [84—87]. Интересно, что в этом случае не удается зарегистрировать аминоацил-зависимый ^{32}P —АТФ-обмен, не происходит образования кислот или аминоациладени-

латферментного комплекса [87—89]. Подробно эти вопросы будут рассмотрены в следующей главе, посвященной роли олиговалентных катионов в реакции образования аминоксил-тРНК.

Отсутствие данных о первичной структуре АРСаз, о химической природе активных центров сильно затрудняет решение чрезвычайно важной проблемы — выяснение механизма специфического взаимного узнавания тРНК и фермента. Пока методические подходы заключаются в сравнительном анализе первичных структур тРНК, аминокислицируемых одним и тем же ферментом, в изучении мутантных тРНК, использовании методов «разрезанной» молекулы и молекулярной гибридизации, изучении фермент — тРНК комплексов и гетерологичных систем [7, 8]. В результате этих исследований для одних тРНК показано функциональное значение акцепторного стебля и дигидроуридилевой петли [90—92], для других — участка дополнительной петли [92, 93], в ряде случаев для узнавания фермента существенна область антикодона [62, 94, 95].

Существует гипотеза, что для правильного узнавания необходимы, по крайней мере, три точки контакта тРНК с АРСазой [93]. Однако совершенно справедлив вывод Цахау, что современными методами могут быть изучены лишь определенные аспекты проблемы, а точная локализация участков «узнавания» не может быть осуществлена без рентгеноструктурного анализа комплексов: тРНК-фермент [92].

До последнего времени считалось общепринятым, что специфичность образования аминоксил-тРНК зависит от абсолютной специфичности «узнавания» АРСазой соответствующей тРНК. В действительности эта специфичность не абсолютна, о чем свидетельствуют следующие факты:

1. Регистрация и выделение комплексов АРСазы с «чужой» тРНК и наличие «неправильно» ацилированных тРНК в гомологичных системах в обычных условиях [60, 96—101].

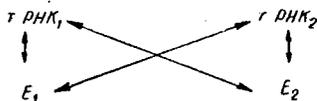
2. Ингибирующее действие «чужих» тРНК на специфическое аминокислицирование [96, 100].

3. Отсутствие специфичности АТФ и ПФ-независимого деацилирования аминоксил-тРНК, катализируемого АРСазами [96, 102].

Сродство АРСаз к «чужим» тРНК в ошибочных реакциях меньше на 1—2 порядка, а V_{max} — на 3—4 порядка по сравнению со специфической реакцией. Эбель и сотр. [96], проводившие этот детальный кинетический сравнительный анализ, считают, что «узнавание», по-видимому, не связано с участком АЦЦ-конца, а эта область существенна для каталитического акта, возможно, вследствие попадания при определенном расположении тРНК и АРСазы 3'-концевого аденозина в каталитический центр энзима. Таким образом, авторы делают вывод о том, что специфическое аминокислицирование состоит из двух отдельных механизмов: первого, о котором судят по K_m , действующего на уровне

«узнавания» (связывания) и второго, более эффективного, определяемого V_{max} и заключающегося в непосредственном образовании аминоацил-тРНК.

Ярус [100], чьи работы посвящены детальному изучению ошибочного аминоацилирования, на примере изолейцил-тРНК-синтетазы *E. coli*, способной образовывать изолейцил-тРНК^{Фен}, -тРНК^{Мет}, считает, что это явление может иметь большие последствия при наличии его в клетке *in vivo*. Действительно, концентрация тРНК в клетках *E. coli* довольно высока ($0,5 \cdot 10^{-5}$ М для индивидуальных фракций) и, следовательно, даже слабое связывание может быть существенным. Кроме того, в клетке возможно большое количество неправильных взаимодействий: 60 видов тРНК и, как минимум, 40 видов АРСаз дают 1200 возможных пар, и только 60 (5%) из них специфичны. Каковы же механизмы исправления ошибочного аминоацилирования? Прежде всего, в ряде работ показано, что аминоацил-тРНК-синтетазы катализируют гидролиз «неправильных» аминоацил-тРНК [100, 103]. Однако Эбель [105], как и Ярус в своих последних работах, считает, что более быстрое энзиматическое расщепление «неправильных» аминоацил-тРНК по сравнению со специфичными нельзя считать главным механизмом исправления ошибок. Высказываются предположение, что в процессе эволюции не было необходимости в создании абсолютной специфичности системы тРНК-АРСазы, поскольку *in vivo* нежелательные взаимодействия просто подавляются [100]. Автор [105] разбирает конкретный пример по следующей схеме:



Концентрации тРНК и АРСаз в клетке примерно эквимоллярны [106, 107]. В этих условиях сильное связывание E_1 и тРНК₁ делает малосущественным взаимодействие E_1 с тРНК₂. Кроме того, концентрация тРНК₂ уменьшается вследствие взаимодействия с E_2 . В результате оба компонента (E_1 и тРНК₂) менее доступны для ошибочного аминоацилирования. Экспериментально показано также, что присутствие тРНК^{Иле} угнетает неправильное ацилирование изолейцил-тРНК-синтетазой. Все эти теоретические предпосылки и экспериментальные данные свидетельствуют о том, что специфичность тРНК АРСазной системы нельзя изучать только на чистых реагентах, так как суммарные препараты, содержащие другие тРНК и АРСазы, могут разрушать или не допускать образование неправильных аминоацил-тРНК. По-видимому, сочетание такого механизма с большой степенью специфичности тРНК-АРСазных взаимодействий предпочтительно в ходе эволюции, поскольку снижает влияние единичной мутации на «значение» генетического кода [100]. В

пользу такого предположения свидетельствуют и данные о наличии комплексов АРСаз в живой клетке [108, 109].

Исследуя максимальный уровень образования аминоацил-тРНК, следует также учитывать, что плато уровня аминоацилирования отражает динамическое равновесие между прямой реакцией и деацилированием, которое может быть неспецифическим и ферментативным [110—112]. Кроме того, ряд АРСаз в присутствии тРНК и аминокислоты катализируют распад АТФ до АМФ и пирофосфата, что тоже сдвигает равновесие в обратную сторону [110].

Изложенные выше данные об ошибочном аминоацилировании, неспецифическом и специфическом деацилировании свидетельствуют о чрезвычайно сложных процессах при использовании грубых гетерологичных систем, на которых было в основном проведено изучение «видовой» специфичности взаимодействия тРНК и АРСаз. Именно в гетерологичных системах впервые обнаружено ошибочное ацилирование гетерологичным ферментом тРНК другой аминокислотой специфичности. Так, фенилаланил-тРНК-синтетаза из нейроспоры ацилирует фенилаланином тРНК^{Ала} и тРНК^{Вал} *E. coli* [7, 113, 114], а та же синтетаза из дрожжей ацилирует тРНК^{Вал} *E. coli* [115]; валил-тРНК-синтетаза *E. coli* в присутствии диметилсульфоксида способна ацилировать тРНК^{Фен}, тРНК^{Вал} и тРНК^{Ала} из дрожжей [116]. Такие ошибочные взаимодействия позволяют, сравнивая первичные структуры тРНК, ацилируемых одним и тем же ферментом, изучать участки тРНК, узнаваемые АРСазой. Вообще с точки зрения структурного анализа взаимодействия тРНК и АРСаз, гетерологичные системы представляют значительный интерес. В литературе описано множество фермент-тРНК пар, у которых наблюдалось самое разное поведение — от полной взаимозаменяемости до полной несовместимости фермента с гетерологической тРНК. В работе Якобсона [117] приведена таблица практически всех описанных перекрестных реакций с использованием АРСаз и тРНК из более чем 30 организмов. Автор показывает, что реактивность гетерологичной тРНК значительно зависит от рН, вида буфера, концентрации ионов магния и ряда солей, концентрации фермента, спермина и других условий проведения реакции. Особенно следует подчеркнуть большое влияние добавления различных спиртов, в частности глицерина.

Интересно, что такая резкая зависимость от рН, концентрации Mg^{2+} , солей и фермента характерна для обратной реакции — деацилирования. Это показано некоторыми исследователями как в гомо-, так и в гетерологичных системах [8, 110]. Напрашивается вывод о том, что снижение уровня и скорости аминоацилирования при перекрестных реакциях может зависеть не только от несовместимости фермента с «чужой» тРНК, но и от сдвига равновесия реакции в обратную сторону, особенно при использовании суммарных препаратов АРСаз.

Многолетние исследования отдела механизмов трансляции генетической информации Института молекулярной биологии и генетики АН УССР были посвящены изучению особенностей взаимодействия гомологичных тРНК и АРСаз, выделенных из молочной железы коров и крольчих при разных функциональных состояниях: до первой лактации (недифференцированная железа телок), в разгар лактации и в период инволюции.

В первых сериях экспериментов мы сравнивали уровни аминоацилирования тРНК железы телок и лактирующей железы в

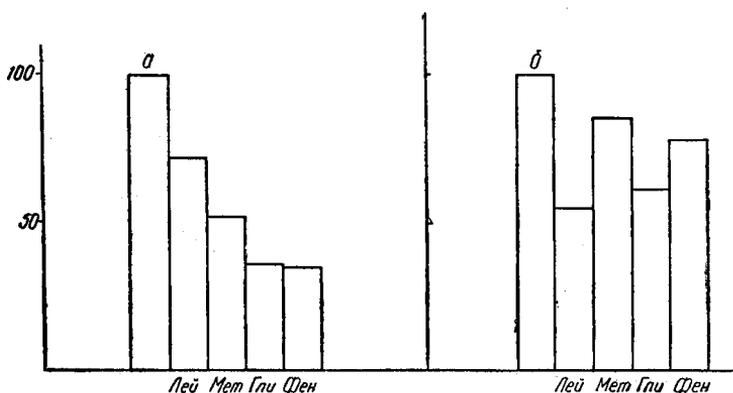


Рис. 1. Относительный уровень аминоацилирования тРНК железы телок (а) и лактирующей железы (б) гомологичными (100%) и гетерологичными АРСазами.

гомологичных системах и при перекрестах в одинаковых условиях проведения реакции — стандартная инкубационная смесь, время инкубации — 15 мин, количество ферментного препарата — 300 мкг на 100 мкг тРНК. Из представленных на рис. 1 данных видно, что максимальное аминоацилирование тРНК всеми использованными аминокислотами наблюдается лишь при воздействии тРНК и АРСаз, выделенных из молочной железы при одном и том же функциональном состоянии. В гетерологичных системах уровень аминоацилирования снижен и составляет 35—87% максимального в зависимости от вида аминокислоты (а следовательно, вида тРНК и АРСаз), участвующей в реакции.

Авторы, изучавшие проблему видовой специфичности, показали, что оптимальные условия для гомо- и гетерологичных взаимодействий тРНК и АРСаз значительно различаются. Анализируя результаты исследований влияния различных условий проведения реакции на уровень аминоацилирования тРНК АРСазами лактирующей железы и железы телок, можно считать, что данные гомо- и гетеросистемы наиболее существенно отличаются по двум факторам — оптимальному времени инкубации (рис. 2) и

«насыщающим» количеством ферментного белка (рис. 3). Однако и в оптимальных условиях проведения реакции уровень аминокцилирования тРНК в гетерологичных системах остается сниженным, хотя в значительно меньшей степени: на 18 и 31% лейцином, 8 и 34% глицином в зависимости от вида гетеросистемы.

Дальнейшие исследования показали, что в перекрестных системах, включающих тРНК и АРСазы лактирующей железы и

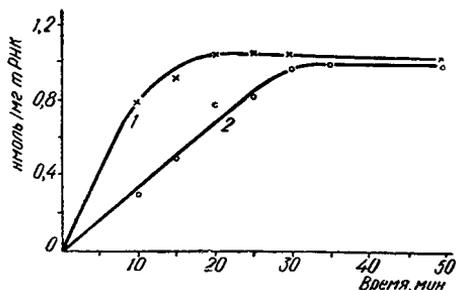


Рис. 2. Зависимость уровня образования лейцил-тРНК железы телок (1) и лактирующей железы (2) от времени в присутствии АРСаз железы телок.

периода инволюции, также наблюдается снижение уровня аминокцилирования, особенно четко для лейцина — на 26 и 38%. Интересно, что в данном случае также необходимы большие концентрации гетерологичного фермента по сравнению с гомологичным для максимального аминокцилирования тРНК. Кроме того, при определении оптимальных условий образования метионил-тРНК лактирующей железы в присутствии АРСаз железы периода инволюции были обнаружены две существенные особенности — оптимальное время инкубации в три раза больше по сравнению с гомологичной системой и значительно повышена потребность в АТФ (рис. 4). При соблюдении этих условий уровень аминокцилирования тРНК лактирующей железы метионином в гетеросистеме практически достигает максимального уровня — 92%.

Чтобы окончательно убедиться в том, что специфичность взаимодействия тРНК и АРСаз молочной железы зависит именно от функционального состояния органа, характеризующегося определенной направленностью белкового синтеза, были проведены следующие эксперименты. Суммарный препарат АРСаз выделяли из лактирующей железы крольчих, а тРНК — из железы коров при разных состояниях. Оказалось, что уровень присоединения как лейцина, так и метионина максимален в системе, содержащей АРСазы лактирующей железы

и периода инволюции, также наблюдается снижение уровня аминокцилирования, особенно четко для лейцина — на 26 и 38%. Интересно, что в данном случае также необходимы большие концентрации гетерологичного фермента по сравнению с гомологичным для максимального аминокцилирования тРНК. Кроме того, при определении оптимальных условий образования метионил-тРНК лактирующей же-

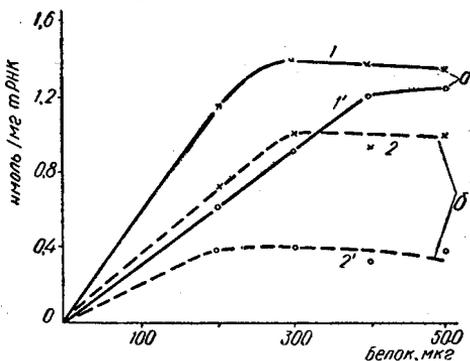


Рис. 3. Зависимость уровня образования лейцил- (1, 1') и глицил-тРНК (2, 2') железы телок (а) и лактирующей железы (б) от концентрации АРСаз железы телок.

крольчих и тРНК лактирующей железы коров, т. е. наиболее эффективна «функционально» гомологичная система. Аналогичные результаты получены при аминокислотировании тРНК лактирующей железы крольчих АРСазами молочной железы коров.

Анализ результатов всех серий экспериментов показал, что в отличие от глицил- и метионил-тРНК уровень образования лейцил-тРНК достоверно снижен во всех гетеросистемах даже в

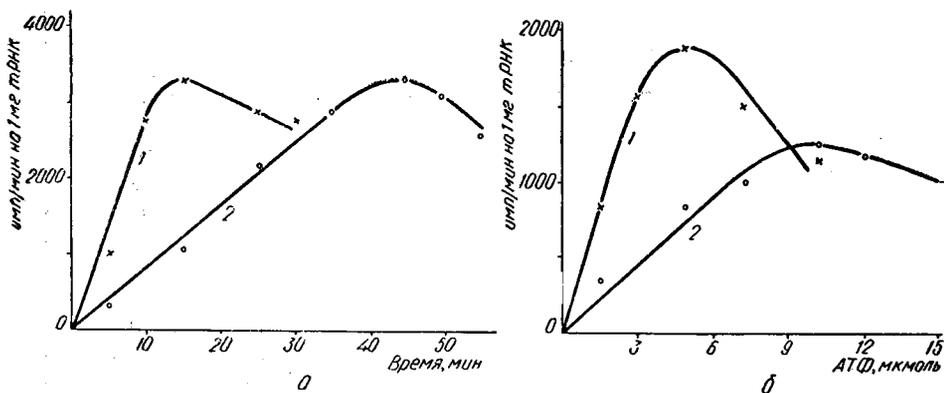


Рис. 4. Зависимость уровня образования метионил-тРНК лактирующей железы от времени инкубации (а) и концентрации АТФ (б) в присутствии гомологичных (1) и гетерологичных (2) АРСаз.

оптимальных условиях проведения реакции. Якобсон [117], обсуждая аналогичные результаты в обзорной статье, посвященной гетерологичным взаимодействиям тРНК и АРСаз, считает, что окончательный вывод о степени специфичности можно делать лишь после добавления в инкубационную смесь некоторых спиртов, в частности глицерина. Действительно, мы установили, что если в среде присутствует глицерин (4%), уровень аминокислотирования тРНК лактирующей железы лейциновыми АРСазами железы периода инволюции возрастает с 67 до 86% уровня, характерного для гомосистемы, т. е. разница уменьшается более чем в два раза (рис. 5). Кроме того, следует отметить, что как в гомо-, так и в гетеросистемах выше уровень аминокислотирования в присутствии глицерина и АРСаз, выделявшихся при наличии этого спирта во всех растворах.

Каков же механизм влияния на уровень образования аминокислот-тРНК? Некоторые исследователи придерживаются мнения, что спирты, изменяя диэлектрическую постоянную среды, влияют на ионные взаимодействия, существенные для образования тРНК-ферментного комплекса. Другие считают, что спирты, в том числе глицерин, изменяют пространственную структуру тРНК в области акцепторного конца. Есть также сведения о том, что глицерин стабилизирует макроструктуру некоторых ферментов (свободные сульфгидрильные группы при этом остаются «за-

крытыми») и влияет на ассоциацию и диссоциацию субъединиц. Стабилизирующее действие глицерина используют все исследователи, работающие с высокоочищенными препаратами АРСаз. При очистке лейцил-тРНК-синтетазы из молочной железы добавление глицерина ко всем растворам и хранение препарата в 20—50% -ном глицерине также чрезвычайно эффективно.

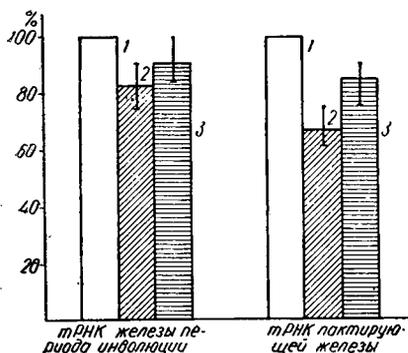


Рис. 5. Относительный уровень аминокислотирования тРНК лейцином в гомологичных (1) и в гетерологичных системах без (2) и в присутствии (3) глицерина.

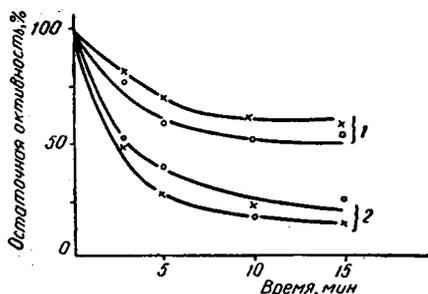


Рис. 6. Кинетика инактивации лейцил тРНК-синтетаз при 40° в присутствии (1) и без (2) глицерина.

Все эти факты дают основание предположить, что влияние глицерина на уровень аминокислотирования может быть связано с его стабилизирующим действием, в частности при термоинактивации АРСаз в процессе инкубации при 37°. Для проверки правильности такого предположения изучено влияние глицерина на кинетику термоинактивации лейцил-тРНК-синтетаз в составе суммарных препаратов из железы периода инволюции и лактации. В отсутствие глицерина кривая инактивации ферментов из обоих видов ткани имеет экспоненциальный характер, а затем наступает относительная стабилизация процесса, которая может быть связана с обратимостью его при температуре 40° (рис. 6). Время половинной инактивации (3 мин) и близкие значения констант скорости инактивации (рис. 7) свидетельствуют о практически одинаковой термостабильности лейцил-тРНК-синтетаз лактирующей железы и периода инволюции в суммарных препаратах ферментов.

Для препаратов АРСаз, выделенных и сохраняемых в присутствии глицерина, время половинной инактивации удлиняется более чем в три раза (рис. 6) и соответственно изменены константы скорости процесса (рис. 7). Следовательно, установлено стабилизирующее влияние глицерина при термоинактивации довольно лабильных лейцил-тРНК-синтетаз молочной железы. Этот эффект может быть одной из причин увеличения уровня

аминоацилирования тРНК при наличии в среде глицерина, но почему это увеличение относительно выше в гетерологической системе? В определенной мере ответ на этот вопрос дают результаты изучения стабилизирующего влияния гомо- и гетерологичных тРНК при термоинактивации тех же ферментов.

Изучая влияние тРНК на стабильность глицеринсодержащих препаратов АРСаз, инактивацию при 40° проводили в течение

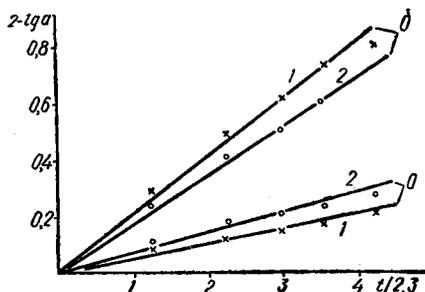


Рис. 7. Определение констант скорости инактивации лейцил-тРНК-синтетазы лактирующей железой (1) и железой периода инволюции (2) в присутствии (а) и без глицерина (б). $\lg a = -\frac{K}{2,3}t + 2$.

10 мин, а препаратов, не содержащих глицерин — 3 мин. Оказалось, что в отсутствие глицерина гомологичная тРНК не только предохраняет фермент от инактивации, но и в значительной степени повышает его аминоацилирующую способность. Гетерологичные тРНК обладают лишь защитным действием (рис. 8). Выраженность как защитного, так и стимулирующего эффекта колеблется довольно значительно при термоинактивации разных ферментных препаратов.

Интересно, что при инактивации глицеринсодержащих препаратов ферментов стимулирующего действия гомологичной тРНК не обнаружено. Наблюдался лишь защитный эффект, практически одинаковый по величине при добавлении как гомо-, так и гетерологичных тРНК. Если же препараты АРСаз освободить от глицерина гельфильтрацией через сефадекс, то при их активации в присутствии гомологичной тРНК вновь проявляется ее стимулирующее действие, причем в некоторых экспериментах чрезвычайно интенсивное.

Мы не располагаем данными, позволяющими однозначно определить механизм обнаруженного явления. Можно лишь предположить, что в процессе прединкубации при 40° гомологичная тРНК объединяет субъединицы либо как-то иначе «исправляет» макроструктуру фермента, нарушенную при получении и хранении его без глицерина. Подобный эффект не наблюдается при добавлении тРНК к глицеринсодержащим препаратам АРСаз, так как их макроструктура и так стабилизирована. Безусловно, это предположение требует специальной экспериментальной проверки и детального знания структуры лейцил-тРНК-синтетазы молячной железы. Однако описанные серии экспериментов позволяют предположить, что одной из причин снижения уровня образования лейцил-тРНК в гетеросистемах может быть менее эффективное действие гетерологичной тРНК при инактив-

вазии фермента в процессе проведения реакции — 20—40 мин при 37°. Глицерин, стабилизируя фермент, тем самым снижает значение этого фактора и уменьшает разницу между уровнями образования лейцил-тРНК в гомо- и гетерологичных системах.

Кроме снижения уровня аминоацилирования для гетеросистем характерно более медленное протекание реакции. Этот факт, описанный при исследовании проблемы видовой специфичности,

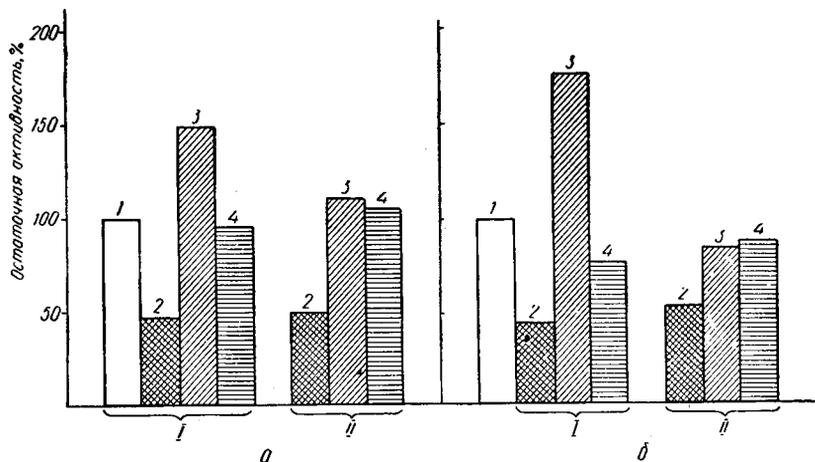


Рис. 8. Влияние тРНК на термоинактивацию лейцил-тРНК-синтетаз железы периода инволюции (а) и лактирующей железы (б) без (I) и в присутствии глицерина (II):

1 — остаточная активность до, 2 — после термоинактивации, 3 — в присутствии гомологичной, 4 — гетерологичной тРНК.

мы также установили в экспериментах по определению оптимального времени инкубации, которое, как правило, увеличено при перекрестах, особенно для образования метионил-тРНК лактирующей железы АРСазами железы периода инволюций — 45 мин в отличие от 15 мин в гомосистеме.

Однако при изучении кинетики реакции нельзя ограничиваться определением оптимального времени, определением интервала времени, характеризующегося постоянной скоростью реакции. Поэтому дальнейшие исследования были посвящены изучению V_0 образования лейцил- и метионил-тРНК в гомологичных системах и при перекрестах. В пробы, содержащие стандартную инкубационную смесь и не лимитирующее скорость реакции количество тРНК (150—200 мкг), вносили 200—300 мкг суммарного препарата АРСаз, что соответствовало прямолинейному участку зависимости V_0 от концентрации фермента. Кинетические точки определяли в интервале времени 0—10 мин инкубации, пользуясь, в основном, микрометодом. V_0 определяли графическим методом, измеряя tg угла наклона касательной к кинетической кривой в точке равной нулю. Поскольку в этом методе

точность определения существенно зависит от точности построения касательной, в ряде случаев результаты контролировали применением аналитического метода с использованием формулы Ньютона—Грегори [118].

Оказалось, что V_0 реакции аминоацилирования тРНК лейцином незначительно снижена в гетеросистемах по сравнению с гомологичными. В то же время скорость образования метионил-тРНК существенно ниже при гетерологичных взаимодействиях,



Рис. 9. Зависимость V_0 образования метионил-тРНК лактирующей железы от концентрации ионов металлов в гетерологичной системе.

особенно в системе тРНК лактирующей железы и АРСазы железы периода инволюции (на 63%). Изучение влияния АТФ и $MgCl_2$ на V_0 реакции показало, что максимальная скорость образования лейцил-тРНК наблюдается при одинаковых для гомо- и гетеросистем концентрациях АТФ и $MgCl_2$: соответственно 3—6 и 5—10 мкмоль на 0,5 мл смеси. Для достижения максимальной скорости синтеза метионил-тРНК необходимы более высокие концентрации АТФ, особенно в гетеросистеме. В этой же системе резко возрастает потребность в $MgCl_2$. При гомологичных взаимодействиях тРНК и АРСаз молочной железы для максимальной скорости присоединения метионина достаточно 5—10 мкмоль $MgCl_2$ на 0,5 мл смеси, в то же время при взаимодействии АРСаз железы периода инволюции с тРНК лактирующей железы оптимум концентрации $MgCl_2$ возрастает до 25 мкмоль на 0,5 мл. Установлено, что ионы Mg в этом случае полностью заменимы ионами Mn (рис. 9).

Осталось, однако, неясным, является ли необходимым для высокой V_0 в изучаемой гетеросистеме повышенное содержание именно двухвалентных ионов металлов или определяющим фактором является увеличение ионной силы инкубационной среды.

Этот вопрос существен, поскольку высказывается мнение, что специфичность взаимодействия тРНК и АРСаз (узнавание) зависит от Ван-дер-Ваальсовых сил, водородных и гидрофобных связей, однако для присоединения молекулы тРНК к ферменту необходимы в значительной мере и ионные взаимодействия.

В последующих экспериментах установлено, что при наличии в гетеросистеме (0,5 мл) 10 мкмоль $MgCl_2$ увеличение ионной силы добавлением KCl до той величины, которую создают 25 мкмоль $MgCl_2$, приводит к тому же эффекту — повышению V_0 в гетеросистеме до уровня гомосистемы. При добавлении в инкубационную среду $NaCl$ в количестве, создающем ту же ионную силу, V_0 не достигает уровня гомосистемы, хотя возрастает в значительной мере — до 84% (рис. 9).

Однако выравнивание V_0 реакции образования метионил-тРНК в гетеросистеме при увеличении концентрации $MgCl_2$ отнести только за счет создания более высокой ионной силы среды, по-видимому, нельзя. Так, при уменьшении количества $MgCl_2$ до 5 мкмоль (нижняя граница оптимальных значений $MgCl_2$ в гомосистеме) при неизменной ионной силе, создаваемой $NaCl$ или KCl , V_0 несколько снижается (рис. 9). Следовательно, кроме повышенной ионной силы среды для взаимодействия гетерологичных тРНК и АРСаз существенной является и достаточно высокая концентрация двухвалентных ионов магния.

Анализируя результаты сравнения скорости реакции аминоацилирования тРНК в гомо- и гетерологичных системах, мы установили, что V_0 существенно зависит от концентрации АТФ, $MgCl_2$ и ионной силы среды и при создании оптимальных условий для каждой системы ферментативный синтез метионил-тРНК молочной железы протекает с одинаковой скоростью в обеих системах.

Необходимость повышения концентрации АТФ для максимального уровня и высокой скорости образования метионил-тРНК лактирующей железы в присутствии АРСаз желез периода инволюции по сравнению с гомологичной системой может быть связана с влиянием тРНК на каталитические свойства фермента при активации аминокислоты, т. е. на первый этап реакции аминоацилирования.

Для изучения активации метионина был выбран гидроксаматный метод, который технически доступен и более пригоден для проведения сравнительных экспериментов с использованием малоочищенных препаратов АРСаз. ^{14}C - α -аминокарбогидроксамовые кислоты, регистрируемые как продукт реакции, образуются в результате неферментативного процесса — взаимодействия гидроксилamina с аминоациладенилатферментным комплексом:



Проведенный Д. Г. Кнорре детальный анализ показал, что зависимость скорости реакции образования амингидроксаматов

от концентрации субстратов и конкурентных ингибиторов выражается теми же уравнениями, что и в случае обычных ферментативных процессов. Однако для использования скорости накопления аминокислот как характеристики процесса активации аминокислоты нужно проводить реакцию в условиях, когда лимитирующей стадией является ферментативное образование аминокислоты, а не реакция неферментативного синтеза аминокислоты [119, 120]. Поэтому при использовании гидроксиламинного метода особую важность приобретает правильный выбор используемых концентраций гидроксиламина и фермента. При низких концентрациях гидроксиламина лимитирующей стадией может стать гидроксиламинолиз аминокислоты ферментного комплекса. В присутствии высоких концентраций гидроксиламина свойства фермента, а также константы скоростей отдельных стадий реакции могут изменяться. Оптимальной является концентрация 1 М, поскольку в этом случае выход конечного продукта не лимитируется гидроксиламином и в то же время эта концентрация в 4 раза меньше той, при которой наблюдается заметное ингибирование фермента.

Изучение зависимости образования ^{35}S -метионил-гидроксиламина от количества суммарного препарата АРСаз показало, что наличие в пробе 100—200 $\mu\text{кг}$ белка недостаточно для образования ощутимых количеств продукта и получения достоверных результатов, а в диапазоне от 200 до 900 $\mu\text{кг}$ белка наблюдается прямолинейная зависимость скорости реакции от концентрации фермента. В дальнейшем в пробу вносили 750 $\mu\text{кг}$ препарата АРСаз.

В работах ряда авторов, использовавших гидроксиламинный метод определения активности фермента, время инкубации колеблется довольно широко — от 20 до 120 мин . Изучение кинетики образования ^{35}S -метионил-гидроксиламина в присутствии АРСаз железа периода инволюции показало, что 40 мин соответствуют примерно половине участка прямолинейной зависимости выхода продукта от времени. В дальнейшем скорость реакции определяли либо по нескольким кинетическим точкам, либо инкубируя реакционную смесь 40 мин . Оптимальная концентрация MgCl_2 оказалась равной 5 $\mu\text{моль}/0,4 \text{ мл}$, ^{35}S -метионина — 0,08 $\mu\text{моль}/0,4 \text{ мл}$ смеси.

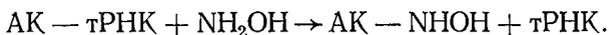
При использовании указанных выше концентраций фермента и гидроксиламина есть основание считать, что лимитирующей стадией реакции получения ^{35}S -метионил-гидроксиламина является ферментативная стадия образования аминокислоты ферментного комплекса. В этом случае измеряемая в эксперименте скорость образования гидроксиламина представляет собой скорость активации аминокислоты, а зависимость V_0 от концентрации субстратов выражается уравнением Михаэлиса. Поэтому правомочно, используя метод двойных обратных величин Лайнуивера—Берка [121], определить константы Михаэлиса по АТФ для метионил-тРНК-синтетазы железа периода инволюции в отсутствие

тРНК и в присутствии как гомологичной, так и гетерологичной тРНК.

Так как кинетические параметры K_m и V_{max} определяют при условии прямолинейной зависимости $1/V_0$ от $1/[S]$ субстрата, необходимо было прежде всего определить концентрации АТФ, соответствующие этой зависимости. Оказалось, что прямолинейная зависимость в системе без тРНК и в присутствии гетерологичной тРНК наблюдается при 1—7 мкмоль АТФ в пробе, а гомологичной тРНК — при 0,1—2,0 мкмоль АТФ.

Установлено, что в присутствии гомологичной тРНК K_m по АТФ снижается с 7,6 до $0,68 \cdot 10^{-3}$ М при одновременном снижении V_{max} на 40%. Наличие в инкубационной смеси гетерологичной тРНК приводит к некоторому повышению K_m — до $21 \cdot 10^{-3}$ М. Уменьшение значения K_m по АТФ для АРСаз железа периода инволюции в присутствии гомологичной тРНК может быть связано с влиянием тРНК на конформацию фермента, приводящем к повышению эффективности связывания микросубстратов, в частности АТФ. Такое предположение давно и неоднократно высказывалось авторами, изучавшими влияние тРНК на стадию активации аминокислоты, особенно при исследовании так называемых тРНК-независимых АРСаз [69, 70, 72]. Существенное подтверждение возможности такого механизма действия тРНК было получено в результате исследования структуры и свойств глутамил-тРНК-синтетазы, о чем более подробно сказано выше.

Хотя многие авторы обнаружили стимулирующее влияние тРНК на скорость активации аминокислоты, интерпретация таких исследований должна проводиться очень осторожно. Об этом свидетельствуют работы Д. Г. Кнорре [120, 122], который детально проанализировал кинетику образования гидроксаматов и механизм влияния тРНК на этот процесс на примере валил-тРНК-синтетазы *E. coli*. Он показал, что в присутствии тРНК основное количество валил-гидроксамата образуется в результате гидроксиламинолиза валил-тРНК, идущего по схеме:



По мнению Д. Г. Кнорре, такой механизм влияния тРНК характерен для систем с более высокой скоростью образования аминоксил-тРНК по сравнению со скоростью ферментативного образования аминоксидроксиаматов [122].

Не проводя детального кинетического анализа, можно отклонить подобный механизм влияния тРНК железа периода инволюции на активацию метионина гомологичными АРСазами по следующим причинам. 1. Результаты контрольных экспериментов показали, что для изучаемой системы характерна более высокая скорость образования метионилгидроксамата по сравнению с метионил-тРНК. 2. В последующих экспериментах мы

изучили влияние тРНК железа периода инволюции, окисленной NaJO_4 , на процесс активации аминокислоты и установили, что K_m по АТФ составляет $0,72 \cdot 10^{-3}$ М, т. е. и в случае потери акцепторной активности гомологичная тРНК снижает значение K_m на порядок. Следовательно, полученные нами данные об изменении K_m по АТФ в определенной мере свидетельствуют о повышении сродства фермента к АТФ в присутствии гомологичной тРНК. Необходимо, однако, подчеркнуть два существенных момента. Во-первых, зная все недостатки гидроксаматного метода, нельзя полученные величины K_m считать безоговорочно истинными. И, во-вторых, неизвестно, оказывают ли влияние на фермент именно метиониновые тРНК или другие фракции суммарного препарата. Ответ могут дать лишь исследования высокообогащенных препаратов метиониновых тРНК и АРСаз с регистрацией фермент-субстратных комплексов.

Для анализа гетерологичных взаимодействий тРНК и АРСаз молочной железы существенно, что гомо- и гетерологичные тРНК по-разному влияют на кинетические параметры реакции образования метионилгидроксаматов, катализируемой одними и теми же АРСазами железа периода инволюции.

Коротко суммируя результаты изучения особенностей взаимодействия гомо- и гетерологичных тРНК и АРСаз, выделенных из молочной железы при разных функциональных состояниях, следует подчеркнуть следующее. В стандартных условиях проведения реакции аминоацилирования как уровень, так и скорость образования аминоксил-тРНК существенно снижены при перекрестах. Оптимальные условия и концентрации субстратов значительно отличаются для гомо- и гетерологичных систем, и не всегда их применение приводит к полному выравниванию уровня реакции аминоацилирования в гетерологичных системах.

Открытое нами явление специфичности взаимодействия тРНК и АРСаз, выделенных из одного и того же органа при состояниях, отличающихся направленностью и уровнем биосинтеза белка [123—127], имеет много общих черт с видовой и органной специфичностью. Это дает основание считать, что различия в характере биосинтеза белка являются одним из основных факторов, определяющих особенности тРНК и АРСаз из разных объектов и тканей, благодаря которым снижается их способность взаимодействовать при перекрестах. По нашим данным, в основе этого явления может быть прежде всего несоответствие качественных и количественных наборов тРНК и АРСаз в суммарных препаратах, о чем более подробно будет сказано далее.

Заканчивая обсуждение литературных данных и результатов собственных исследований, необходимо подчеркнуть, что за последние годы накоплен обширный и важный фактический материал, посвященный акцепторной функции тРНК, хотя во многом он имеет еще чисто описательный характер. Однако окончательное решение проблемы «узнавания» и механизма каталитичес-

кого действия АРСаз невозможно без определения химической природы активных центров, первичной структуры участков связывания субстратов и рентгеноструктурного анализа комплексов фермента как с микросубстратами, так и с тРНК.

ЛИТЕРАТУРА

1. Crick F.—Biochem. Soc. Sympos., 1957, 14, 25.
2. Hoagland M., Zamesnik P., Stephenson M. Intermediate reactions in protein biosynthesis.—Biochim. Biophys. Acta, 1957, 24, 215.
3. Ogata K., Nohara H. The possible role of the ribonucleic acid (RNA) of the pH 5 enzyme in amino acid activation.—Biochim. Biophys. Acta, 1957, 25, 659.
4. Hoagland M., Keller E., Zamesnik P. Enzymatic carboxyl activation of amino acids.—J. Biol. Chem., 1956, 218, 245.
5. Киселев Л. Л., Никифоров В. Г., Астаурова О. Б., Готтих Б. П., Краевский А. А. Соединения аминокислот с транспортными (адапторными) РНК.—В кн.: Молекулярные основы биосинтеза белков. М., «Наука», 1971, 121.
6. Мацука Г. Х. Каталитическая функция аминоктил-тРНК-синтетаз и олиговалентные катионы.—В кн.: Молекулярная биология, вып. 10. Киев, «Наукова думка», 1974, 24.
7. Фаворова О. О., Парин А. В., Лаврик О. И. Аминоктил-тРНК синтетазы.—Биофизика, сер. «Итоги науки и техники», 1972, 2, 6.
8. Kisselev L., Favorova O. Aminoacyl-tRNA synthetases: some recent results and achievements.—Adv. Enzymol., 1974, 40, 141.
9. Hayashi H., Knowles J. R., Katze J. R., Lapointe J., Söll D. Purification of leucyl-tRNA synthetase from *E. coli*.—J. Biol. Chem., 1970, 245, 1401.
10. Lapointe J., Söll D. Glutamyl tRNA synthetase of *E. coli*. Interaction with intact glutamyl tRNA.—J. Biol. Chem., 1972, 247, 4975.
11. Bennett T. P. Evidence for one leucyl-tRNA synthetase with specificity for leucine tRNAs with different coding characteristics.—J. Biol. Chem., 1969, 244, 3182.
12. Deutscher M. P. Rat liver glutamyl transfer RNA synthetase.—J. Biol. Chem., 1967, 242, 1123.
13. Chirikjian J., Kanagalingan K., Lau E., Fresco J. R. Purification and properties of leucyl-tRNA synthetase from Baker's yeast.—J. Biol. Chem., 1973, 248, 1074.
14. Cowles J., Key J. Demonstration of two tyrosyl-tRNA synthetases of pea roots.—Biochim. Biophys. Acta, 1972, 281, 33.
15. Baikirsh H., Haar F., Cramer F.—Europ. J. Biochem., 1972, 26, 182.
16. Le Meur M. A., Gerlinger P., Clavent J., Ebel J.-P. Purification and properties of seryl-tRNA synthetase from hen's liver.—Biochimie, 1972, 54, 1391.
17. Tscherne J. et al. Studies on rat liver phenylalanyl-tRNA synthetase.—J. Biol. Chem., 1973, 248, 4052.
18. Rouget P., Chapeville F.—Leucyl-tRNA synthetase. Purification of two interconvertible forms and evidence for an interconversion factor.—J. Biochem., 1970, 14, 498.
19. Surguchev A., Surgucheva L. Studies on methionyl-tRNA synthetase from *Bacillus brevis* by isoelectric focusing.—Biochim. Biophys. Acta, 1970, 224, 623.
20. Tchou H., Claflin A., Muench K. Tryptophanyl-tRNA synthetase from lymphocytes of human chronic lymphocytes leukemia.—Cancer Res., 1971, 31, 679.

21. Bartkowiak S., Pawelkiewicz J. The purification of aminoacyl-tRNA synthetase by affinity chromatography.— *Biochim. Biophys. Acta*, 1972, 272, 137.
22. Forrester P., Hancock R. Affinity chromatography of phenylalanyl-tRNA ligase.— *Canad. J. Biochem.*, 1973, 51, 231.
23. Jakubowski H. et al. Chromatography of plant aminoacyl-tRNA synthetases on aminoalkyl Sepharose columns.— *FEBS Lett.*, 1973, 34, 150.
24. Remy P. et al. Purification of yeast phenylalanyl-tRNA synthetase by affinity chromatography on a tRNA^{Phe} Sepharose column.— *FEBS Lett.*, 1972, 27, 134.
25. Haar F. Affinity elution as a purification method for aminoacyl-tRNA synthetases.— *Europ. J. Biochem.*, 1973, 34, 84.
26. Yamada H. Specific elution of tyrosyl RNA synthetase from phosphocellulose by tyrosine tRNA.— *J. Biochem.*, 1973, 4, 187.
27. Bruton C. J. tRNA: Structure and function. EMBO workshop, Aspen Gardens, Sweden, June, 1973, abstracts.
28. Koch G. L., Boulanger J., Hartley B. S. Repeating sequences in aminoacyl-tRNA synthetase.— *Nature*, 1974, 249, 316.
29. Waterson R. M., Konigsberg W. H. Peptide mapping of aminoacyl-tRNA synthetases: evidence for internal sequence homology in *E. coli* leucyl-tRNA synthetase.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1974, 71, 376.
30. Stern R., DeLuca M., Mehler A., McElroy W. Role of sulphhydryl groups in activating enzymes. Properties of *E. coli* lysinyl-transfer ribonucleic acid synthetase.— *Biochemistry*, 1966, 5, 126.
31. Stern R., Peterkofsky A. Studies of lysyl-transfer ribonucleic acid synthetase from *E. coli*.— *Biochemistry*, 1969, 8, 4346.
32. Moustafa E. Purification and properties of lysyl- and methionyl-soluble ribonucleic acid synthetase from wheat germ.— *Biochim. Biophys. Acta*, 1964, 91, 421.
33. Hele P. The interaction of «soluble» ribonucleic acid magnesium ions and sulphhydryl groups in the control amino acid-dependent pyrophosphate-exchange reactions.— *Biochem. J.*, 1961, 81, 329.
34. Deutscher M. Rat liver glutamyl ribonucleic acid synthetase.— *J. Biol. Chem.*, 1967, 242, 1132.
35. Bruton C., Hartley B. Chemical studies on methionyl-tRNA synthetase from *E. coli*.— *J. Mol. Biol.*, 1970, 52, 165.
36. Santi D., Marchant W., Yarus M. Affinity labeling of isoleucyl-tRNA synthetase with N-bromoacetylisoleucyl-tRNA.— *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1973, 51, 370.
37. Frolova L., Kovalyeva G., Agalarova M., Kisselev L. Irreversible inhibition of beef liver valyl-tRNA synthetase by an alkylating derivative of L-valine.— *FEBS Lett.*, 1973, 34, 213.
38. Lemaire G., van Rapenbusch R., Gros C., Labouesse B. Beef pancreas tryptophanyl-tRNA synthetase. Molecular weight, composition and spectral properties.— *Europ. J. Biochem.*, 1969, 10, 236.
39. Chirikjian J. et al. Crystallization of tRNA^{Leu}-synthetase from Baker's yeast.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1972, 69, 1638.
40. Lagerkvist U., Rymo L., Lindquist O., Anderson E. Some properties of crystals of lysine tRNA ligase from yeast.— *J. Biol. Chem.*, 1972, 247, 3897.
41. Österberg R. et al. Small-angle X-ray scattering study of lysine tRNA ligase from yeast.— *J. Mol. Biol.*, 1973, 77, 153.
42. Rymo L., Lagerkvist U. Crystallization of lysyl-tRNA synthetase from yeast.— *Nature*, 1970, 226, 5240.
43. Helene C. Fluorescence studies of the binding of valyl-tRNA synthetase and tryptamine to valine-specific tRNA. A possible role for tryptophan residues in the binding of aminoacyl-tRNA synthetase to RNAs.— *FEBS Lett.*, 17, 73, 1972.
44. Helene C.— *Nature New Biol.*, 1971, 234, 120.

45. Rymo L., Lundvik L., Lagerkvist U. Subunit structure and binding properties of three amino acid tRNA ligases.—*J. Biol. Chem.*, 1972, 247, 3888.
46. Yaniv M., Gros F. Studies on valyl-tRNA synthetase and tRNA^{Val} from *E. coli*.—*J. Mol. Biol.*, 1969, 44, 31.
47. Arndt D., Berg P. Isoleucyl-tRNA synthetase is a single polypeptide chain.—*J. Biol. Chem.*, 1970, 245, 665.
48. Rouget P., Chapeville F. Leucyl-tRNA synthetase. Two forms of the enzyme: relation between structural and catalytic properties.—*Europ. J. Biochem.*, 1971, 23, 459.
49. Parfait R., Grosjean H. Arginyl-tRNA synthetase from *Bacillus stearothermophilus*.—*Europ. J. Biochem.*, 1972, 30, 242.
50. Katze J. R., Königsberg W. Purification and properties of seryl tRNA synthetase from *E. coli*.—*J. Biol. Chem.*, 1970, 245, 923.
51. Krajewska-Grynkiewicz K., Bunocore V., Schlesinger I. Studies on the interaction of tyrosyl-tRNA synthetase from *E. coli* K 12 with tyrosine and tyrosyl-AMP.—*Biochim. Biophys. Acta*, 1973, 312, 518.
52. Киселев Л. Л. и др. Триптофанил-ТРНК-синтетаза. Выделение и характеристика двух форм фермента.—*Мол. биол.*, 1974, 8, 729.
53. Katze J. R., Berg P. Glycyl-tRNA synthetase from *E. coli*. Purification, properties, substrates binding.—*Biochemistry*, 1974, 13, 1338.
54. Fasiolo F., Befort N., Boulander Y., Ebel J. P. Purification et quelques propriétés de la phenylalanyl-tRNA synthetase de levure de boulangerie.—*Biochim. Biophys. Acta*, 1970, 217, 305.
55. Lapointe J., Söll D. Glutamyl-tRNA synthetase. Purification and properties.—*J. Biol. Chem.*, 1972, 247, 4982.
56. Helene C., Breen F., Yaniv M. Fluorescence study of interaction between valyl-tRNA synthetase and valine-specific tRNA *E. coli*.—*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1969, 37, 393.
57. Bruton C., Hartley B. Chemical studies on methionyl-tRNA synthetase from *E. coli*.—*J. Mol. Biol.*, 1970, 52, 165.
58. Joseph et al. Tryptophanyl tRNA synthetase of *E. coli*.—*J. Biol. Chem.*, 1971, 246, 7610.
59. Rouget P., Chapeville F. Leucyl-tRNA synthetase. Mechanism of leucyl-tRNA formation.—*Europ. J. Biochem.*, 1971, 23, 443.
60. Blanquet S., Iwatsubo M., Waller J. The mechanism of action of methionyl-tRNA synthetase from *E. coli*.—*Europ. J. Biochem.*, 1973, 36, 213.
61. Buonocore V., Schlesinger S. Interactions of tyrosyl-tRNA synthetase from *E. coli* with its substrates.—*J. Biol. Chem.*, 1972, 247, 1343.
62. Krauss G., Römer R., Reisner D., Maass G. Thermodynamics and kinetics of the interaction of phenylalanine specific tRNA from yeast with its cognate synthetase as studied by the fluorescence of the Y-base.—*FEBS Lett.*, 1973, 30, 6.
63. Pingoud A., Kiesner D., Boehme D., Maass G. Kinetic studies on the interaction of seryl-tRNA synthetase with tRNA^{Ser} and ser-tRNA^{Ser} from yeast.—*FEBS Lett.*, 1973, 30, 1.
64. Charlier J. Isoleucyl-tRNA synthetase from *Bacillus stearothermophilus*.—*Europ. J. Biochem.*, 1972, 25, 175.
65. Hertz H., Zachau H. Kinetic properties of phenylalanyl-tRNA and seryl-tRNA synthetases for normal substrates and fluorescent analogs.—*Europ. J. Biochem.*, 1973, 37, 203.
66. Knowles G., Söll D. The interaction seryl- and leucyl-tRNA synthetases with their cognate tRNA's.—*J. Biol. Chem.*, 245, 1407, 1970.
67. Mitra S., Chakraborty K., Mehler A. Binding of RNA and arginine to the arginine tRNA synthetase of *E. coli*.—*J. Mol. Biol.*, 1970, 49, 139.

68. Ravel J., White M., Shive W. Activation of tyrosine analogs in relation to enzyme repression.—*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1965, **20**, 352.
69. Lee L., Ravel J., Shive W. A general involvement of acceptor RNA in the initial activation step of glutamic acid and glutamine.—*Arch. Biochem. Biophys.*, 1967, **121**, 614.
70. Mitra S., Mehler A. The role of tRNA in the pyrophosphate exchange reaction of arginine-tRNA synthetase.—*J. Biol. Chem.*, 1966, **241**, 5161.
71. Mitra S., Smith C. Absolute requirement for tRNA in the activation of arginine by arginyl-tRNA synthetase of yeast.—*Biochim. Biophys. Acta*, 1969, **190**, 222.
72. Deutscher P. The effect of polynucleotides on aminoacyl-tRNA synthetases.—*J. Biol. Chem.*, 1967, **242**, 3601.
73. Favorova O., Kisselev L.—*Studia biophys.*, 1970, **24/25**, 383.
74. Cleland W. The kinetics of enzyme-catalyzed reaction with two or more substrates of product. III. Prediction of initial velocity and inhibition patterns by inspection.—*Biochim. Biophys. Acta*, 1963, **67**, 188.
75. Allende C. et al. The aminoacyl-tRNA synthetase.—*J. Biol. Chem.*, 1970, **245**, 93.
76. Berry S., Grunberg-Manago M. Yeast lysyl-tRNA synthetase. Complex formation and heat protection by substrates.—*Biochim. Biophys. Acta*, 1970, **217**, 83.
77. Papas T., Mehler A. Kinetic studies on the prolyl-tRNA synthetase of *E. coli*.—*J. Biol. Chem.*, 1971, **246**, 5924.
78. Myers G., Blank H., Söll D. Comparative study on the interactions of *E. coli* leucyl-, seryl- and valyl-tRNA synthetases with their cognate tRNAs.—*J. Biol. Chem.*, 1971, **246**, 4955.
79. McNell M. R., Schimmel P. R. Effect of tRNA on the rate law and mechanism of the adenosine-triphosphate-pyrophosphate isotope exchange reaction of an aminoacyl-tRNA synthetase.—*Arch. Biochem. Biophys.*, 1972, **152**, 175.
80. Hele P. et al. Hydroxylamine-dependent reactions catalyzed by a lysyl-tRNA synthetase of *E. coli* B.—*Biochim. Biophys. Acta*, 1973, **294**, 273.
81. Lottfield R., Eigner A. Mechanism of action of amino acid transfer RNA ligases.—*J. Biol. Chem.*, 1969, **244**, 1746.
82. Matsuzaki K., Takeda Y. Aminoacyl tRNA formation. III. Mechanism of aminoacylation stimulated by polyamines.—*Biochim. Biophys. Acta*, 1973, **308**, 339.
83. Eldred E., Schimmel P. Investigation on the transfer of amino acid from a tRNA synthetase-aminoacyl adenylate complex to RNA.—*Biochemistry*, 1972, **11**, 17.
84. Igarashi K., Takeda Y. Polyamines and protein synthesis. IV. Role of spermine in aminoacyl tRNA formation.—*Biochim. Biophys. Acta*, 1970, **213**, 240.
85. Kayne M., Cohn M. Cation requirements of isoleucyl-tRNA synthetase from *E. coli*.—*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1972, **46**, 1285.
86. Pastuszyn A., Lottfield R. Non-participation of aminoacyladenylates in the spermine catalyzed aminoacylation of tRNA.—*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1972, **47**, 775.
87. Takeda Y., Matsuzaki K. Aminoacyl tRNA formation. IV. Kinetic evidence of the concerted mechanism of isoleucyl tRNA formation stimulated by spermine.—*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1974, **59**, 1302.
88. Igarashi K., Matsuzaki K., Takeda Y. Aminoacyl tRNA formation. I. Absence of pyrophosphate-ATP exchange in aminoacyl-tRNA formation stimulated by polyamines.—*Biochim. Biophys. Acta*, 1971, **254**, 91.
89. Igarashi K. et al. Aminoacyl-tRNA formation.—*Biochim. Biophys. Acta*, 1972, **262**, 476.
90. Crothers D., Seno T., Söll D. Is there a discriminator site in transfer RNA?—*Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1972, **69**, 3063.
91. Dudock B. et al. The yeast phenylalanyl-tRNA synthetase recognition

- site: the region adjacent to the dihydrouridine loop.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1971, 68, 681.
92. Zschau H. G. Recognition of tRNAs by aminoacyl-tRNA synthetases.— In: *Funct. Units Protein Biosynth. Federat. Europ. Biochem. Soc. 7th Meet.*, Varna, 1971, 23. L.— N. Y., 1972, 93—101.
 93. Dube S. et al. tRNA-evidence for «three point» attachment to methionyl tRNA synthetase.— *Nature New Biol.*, 1973, 243, 103.
 94. Мирзабеков А. Д. Валиновая тРНК I. Структурная основа узнавания. Автореф. докт. дис. М., 1972.
 95. Seno T., Agris P., Söll D. Involvement of the anticodon region of *E. coli* tRNA^{Gln} and tRNA^{Glu} in the specific interaction with cognate aminoacyl-tRNA synthetase.— *Biochim. Biophys. Acta*, 1974, 349, 328.
 96. Ebel J. P. et al. Factors determining the specificity of the tRNA aminoacylation reaction.— *Biochimie*, 1973, 55, 547.
 97. Giege R., Kern D., Ebel J.-P. et al. Incorrect aminoacylation involving tRNAs or valyl-tRNA synthetase from *Bacillus stearothermophilus*.— *Europ. J. Biochem.*, 1974, 45, 351.
 98. Roe B. et al. New heterologous mischarging reactions with yeast phenylalanyl tRNA synthetase.— *Arch. Biochem. Biophys.*, 1971, 147, 176.
 99. Strickland J., Jacobson K. B. Heterologous charging of *Neurospora crassa* phenylalanine tRNA by *E. coli* valyl-tRNA synthetase.— *Biochim. Biophys. Acta*, 1972, 269, 247.
 100. Yarus M. Intrinsic precision of aminoacyl-tRNA synthesis enhanced through parallel systems of ligands.— *Nature New Biol.*, 1972, 239, 106.
 101. Yarus M. Solvent and specificity.— *Biochemistry*, 1972, 11, 2352.
 102. Bonnet J., Giere R., Ebel J. P. Lack of specificity in the aminoacyl-tRNA synthetase-catalyzed deacylation of aminoacyl-tRNA.— *FEBS Lett.*, 1972, 27, 139.
 103. Yarus M. Phenylalanyl-tRNA synthetase and isoleucyl-tRNA^{Phe}: a possible verification mechanism for aminoacyl-tRNA.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1972, 69, 1915.
 104. Yarus M. Verification of misacylated tRNA^{Phe} is apparently carried out only by phenylalanyl-tRNA synthetase.— *Nature New Biol.*, 1973, 245, 5.
 105. Bonnet J., Ebel J.-P. Correction of aminoacyl errors.— *FEBS Lett.*, 1974, 39, 259.
 106. Callender P., Berg P. The catalytic properties of tyrosyl-tRNA synthetase from *E. coli* and *Bacillus subtilis*.— *Biochemistry*, 1966, 5, 1690.
 107. Yarus M., Berg P. Recognition of tRNA by isoleucyl-tRNA synthetase. Effect of substrates on the dynamics of tRNA-enzyme interaction.— *J. Mol. Biol.*, 1969, 42, 171.
 108. Tscherne J., Weinstein I. Phenylalanyl-tRNA synthetase activity associated with rat liver ribosomes and microsomes.— *Biochemistry*, 1973, 12, 3859.
 109. Vennegoor C., Bloemendaal H. Occurrence and particle character of aminoacyl-tRNA synthetases in postmicrosomal fraction from rat liver.— *Europ. J. Biochem.*, 1972, 26, 462.
 110. Bonnet J., Ebel J. P. Interpretation of incomplete reaction in tRNA aminoacylation.— *Europ. J. Biochem.*, 1972, 31, 335.
 111. Ritter P., Jacobson K. Interaction of phenylalanyl-tRNA synthetase of *Neurospora crassa* with valyl-tRNA of *E. coli*.— *J. Biol. Chem.*, 1972, 247, 1703.
 112. Schreier A., Schimmel P. tRNA synthetase catalyzed deacylation of aminoacyl-tRNA in the absence of adenosine monophosphate and pyrophosphate.— *Biochemistry*, 1972, 11, 1582.
 113. Barnett W. E., Brown D. H. Evidence for the association of phenylalanine tRNA with *Neurospora mitochondria*.— *Science*, 1966, 154, 417.
 114. Barnett W., Epler J. Fractionation and specificities of two aspartyl-tRNA and two phenylalanyl-tRNA synthetases.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1966, 55, 184.

115. Taglag R., Waller J.-P., Befort N., Fasiolo F. Amino acylation du tRNA^{Val} de *E. coli* par la phenylalanyl-tRNA synthetase de levure.— *J. Biochem.*, 1970, 12, 550.
116. Giege R., Kern D., Ebel J.-P.— *FEBS Lett.*, 1971, 15, 281.
117. Jacobson K. Reaction of aminoacyl-tRNA synthetases with heterologous tRNA's.— *Progr. Nucleic Acid. Res.*, 1971, 11, 461.
118. Яковлев В. А.— В кн.: Кинетика ферментативного катализа. М., «Наука», 1965, 127.
119. Кнорре Д. Г. Кинетические уравнения образования аминоксил-гидроксаматов, катализируемых аминоксил-тРНК-синтетазами.— *Мол. биол.*, 1968, 2, 715.
120. Кнорре Д. Г. Кинетика и специфичность реакций, катализируемых АРСазами.— *Изв. АН СССР, сер. биол.*, 1970, 6, 838.
121. Linewiver H., Burk D.— *J. Amer. Chem. Soc.*, 1934, 56, 658.
122. Зиновьев В., Кнорре Д., Лаврик О. О механизмах стимулирующего действия тРНК на образование валилгидроксамата, катализируемого валил-тРНК-синтетазой.— *Мол. биол.*, 1970, 5, 673.
123. Семенова Н. О., Ельська А. В., Мацука Г. Х. Специфічність взаємодії тРНК і АРСаз, виділених із тканини молочної залози за різних функціональних станів.— *Укр. біохім. журн.*, 1968, 41, 326.
124. Ельская А. В., Семенова Н. А., Мацука Г. Х. К вопросу о функциональной специфичности тРНК и аминоксил-тРНК синтетаз.— В кн.: Тезисы симпозиальных сообщений II Всесоюзного биохимического съезда. Ташкент, 1969, 94.
125. Матіяш Ю. М., Ельська А. В. Вплив АТФ на початкову швидкість та рівень аміноацилювання тРНК молочної залози в гомо- й гетеросистемах.— *Укр. біохім. журн.*, 1972, 44, 64.
126. Ельська А. В., Назаренко І. І., Матіяш Ю. М. Вплив тРНК молочної залози на активацію метіоніну-S³⁵.— *Укр. біохім. журн.*, 1974, 46, 463.
127. Elska A., Zheltovska N., Gudzera O. Adaptation of tRNA and aminoacyl-tRNA synthetases pools to the biosynthesis of specific proteins.— In: *Abstracts of Communications FEBS. Budapest*, 1974, 453.

Глава 3

РОЛЬ ОЛИГОВАЛЕНТНЫХ КАТИОНОВ В РЕАКЦИИ АМИНОАЦИЛИРОВАНИЯ тРНК

В предыдущей главе упоминалось, что олиговалентные катионы играют существенную роль в реакциях образования аминоацил-тРНК. Однако участие олиговалентных катионов в каталитической функции аминоацил-тРНК-синтетаз, осуществляющих активацию аминокислот и присоединение их к тРНК, остается вопросом малоосвещенным, не всегда понятным и часто противоречивым [1, 2]. Этот вопрос заслуживает более подробного рассмотрения, так как во многих случаях изучение роли олиговалентных катионов в реакции аминоацилирования тРНК дает новые подходы к пониманию интимных механизмов этой реакции.

Исследователи, которые впервые описали аминоацил-тРНК-синтетазы [3, 4], установили, что процесс активации аминокислот происходит в присутствии ионов магния [1—4]. Однако значение этих и других ионов металлов в начальных процессах биосинтеза белка стали серьезно изучать после того, как Алленде и соавт. [5, 6] выделили комплекс: E—AK—AMФ, который образовался при инкубации смеси фермента с АТФ, аминокислотой и Mg^{2+} . Показано, что аминокислотный остаток из такого комплекса непосредственно переносится на тРНК. Таким образом, исследователи получили возможность изучить вторую стадию реакции аминоацилирования тРНК — реакцию переноса — независимо от первой.

Оказалось, что первая стадия реакции — активация аминокислот — почти всегда нуждается в присутствии ионов магния, в отличие от второй стадии — реакции переноса. В настоящее время известно, что многие синтетазы способны катализировать эту реакцию в отсутствие ионов магния [8—15]. В то же время некоторые исследователи сообщают об абсолютной необходимости магния или других олиговалентных катионов для катализа реакции переноса. Так, Алленде и соавт. [6] при исследовании треонил-тРНК-синтетазы печени крыс показали, что при предварительном диализе гомологичной тРНК против ЭДТА присутствие ионов Mg и Ca в реакции переноса становится абсолютно необходимым. Авторы объяснили разницу между своими результатами и данными других исследователей видовыми отличиями АРСаз микроорганизмов и животных. Это объяснение вызвало возражение некоторых ученых [2], так как известно, что удаление двухвалентных катионов из тРНК у некоторых дрожжевых тРНК приводит к появлению биологически неактивных форм, восстанавливающих свою активность при добавлении ионов

магния [16]. Показано также, что тРНК животного происхождения после обработки ЭДТА также могут обратимо переходить в биологически неактивную форму, восстанавливая свои биологические свойства при добавлении ионов магния [17].

Таким образом, двухвалентные катионы Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , стимулирующие реакцию переноса остатка треонина из комплекса E — АК — АМФ на тРНК в опытах Алленде и соавт. [6], могли влиять на поддержание биологически активной формы тРНК, а не на каталитическую функцию треонил-тРНК-синтетазы. Следует, однако, отметить, что данное возражение вовсе не исключает влияние ионов двухвалентных катионов, в частности магния, на реакцию переноса.

Исходя из того что аминоксил-тРНК-синтетазы разной аминокислотной специфичности и происхождения имеют существенные различия по физико-химическим свойствам (термостабильности, поведению на ионообменниках, молекулярному весу, первичной структуре) и другим показателям [2], можно было бы предположить, что необходимость в двухвалентных катионах в реакции переноса у разных ферментов не будет тождественной. Влияние ионов магния на реакцию переноса необходимо, по-видимому, изучать специально в каждом конкретном случае.

Из опубликованных данных известно, например, что изолейциновая синтетаза, изолированная из *Bacterium stearothermophilus* и *E. coli*, нуждается в Mg^{2+} для реакции переноса [18—19, 76]. Гроссен и соавт. [19] выделили изолейциновую синтетазу и очистили ее в 500 раз. Оптимум температуры для ПФ — АТФ-обмена составил 65° , а для реакции переноса — 45° . Интересно, что гомологичная тРНК оказывала протекторное действие на фермент при его тепловой инактивации. Защитный эффект тРНК при температурном воздействии на фермент в этом случае в значительной степени зависел от ионов магния. Авторы показали [19], что и для образования комплекса изолейциновой АРСазы и тРНК и его стабилизации необходимы ионы магния. В то же время при образовании комплекса аминоксиладенилата и фермента ионы магния необходимы только для образования комплекса, но не для стабилизации последнего.

В работе [19] показано, что ионы магния необходимы для реакции переноса остатка изолейцина на тРНК, которая совместно с Mg^{2+} индуцирует распад комплекса фермента и аминоксиладенилата. Этот вывод следует из того факта, что окисленная периодатом тРНК из *Bact. stearothermophilus* и *E. coli* в присутствии ионов магния полностью освобождает изолейцин из комплекса E — АМФ — АК. Авторы [19] предполагают, что ионы магния в большей мере влияют на изолейциновую синтетазу, чем на тРНК. Они считают, что тРНК совместно с ионами магния вызывает определенное конформационное изменение в синтетазе, что приводит к лабильности связи Иле — АМФ. Такая интерпретация находится в соответствии с результатами,

свидетельствующими о замене влияния нормальной и окисленной периодатом тРНК на скорость изолейцин-зависимого АТФ—ПФ-обмена, катализируемого изолейцил-синтетазой *Bact. stearothermophilus*.

Одновременно следует отметить, что данные, полученные на изолейцил-синтетазе *Bact. stearothermophilus*, об участии ионов магния в реакции переноса, очевидно, нельзя распространять на изолейциновые синтетазы иного происхождения. Тем более что результаты, полученные на изолейцил-синтетазе *E. coli*, довольно противоречивы. Ранее отмечалось [18, 19], что эта синтетаза катализирует реакцию переноса только в присутствии ионов магния, однако есть работы, в которых отрицается участие ионов магния в реакции переноса. Так, Ярус и Рашбаум [22] исследовали роль двухвалентных катионов в каталитических реакциях, осуществляемых изолейцил-синтетазой из *E. coli*. Авторы особо тщательно деионизировали воду после двойной дистилляции, удаляли двухвалентные катионы из фермента и тРНК, а также из фермент-аминоациладенилатного комплекса.

С целью использования радиоактивных ионов металлов авторы применили в опытах $^{54}\text{MnCl}_2$, предварительно установив, что ионы магния при аминоацилировании тРНК в присутствии изолейциновой синтетазы полностью могут быть заменены ионами марганца. После деионизации в 0,15 М ЭДТА при 50° тРНК уравнивали с 0,1 мМ $^{54}\text{MnCl}_2$ 4-кратным диализом. Количество $^{54}\text{Mn}^{2+}$, связанного с тРНК, определяли после гель-фильтрации. Было установлено, что величина, выражающая количество молей $^{54}\text{Mn}^{2+}$ на моль тРНК, зависела от концентрации Na^+ , используемого при уравнивании с $^{54}\text{Mn}^{2+}$, и от гель-фильтрации. При 0,2 М Na^+ это соотношение было $<0,004$, что свидетельствовало об отсутствии двухвалентных катионов в тРНК. Аналогичные исследования показали, что изолейциновая синтетаза содержит $<0,03$ моль, а комплекс фермента с аминоациладенилатом, синтезированный в присутствии $^{54}\text{MnCl}_2$, примерно 0,067 моль Mn^{2+} на 1 моль тРНК. Такой комплекс переносил изолейцин на деионизированную тРНК. Авторы показали, что процент переноса не увеличился при использовании Mg^{2+} вместо Mn^{2+} , а также при замене деионизированной тРНК необработанной. Результат не изменился и при увеличении концентрации двухвалентных катионов и замене изолейциновой тРНК на суммарный препарат. В присутствии 0,1 и 0,2 М ЭДТА фермент-аминоациладенилатный комплекс аминоацилировал тРНК даже в несколько большей степени. Основываясь на полученных данных, Ярус и Рашбаум [22] пришли к выводу, что двухвалентные катионы не требуются ни для рекогниции, ни для переноса изолейцина с комплекса на тРНК, ни для стабилизации изолейцил-тРНК-синтетазы *E. coli*. По мнению авторов, двухвалентные катионы необходимы лишь для синтеза комплекса фермента и изолейциладенилата. Они предполагают, что двухвалентные ка-

тионы не входят в статическую или динамическую структуру изолейциновой тРНК *E. coli*, необходимую для рекогниции и аминоацилирования [22].

В следующей работе Ярус [23] изучал константу ассоциации (K_a) изолейциновой тРНК из *E. coli* с изолейцил-тРНК-синтетазой в разных по ионной силе и составу растворителей, а также в присутствии различных концентраций ионов магния. Было отмечено, что в присутствии 10%-ного диоксана (оптимальная концентрация) значительно возрастает сродство субстрата к ферменту. В то же время добавление одно- и двухвалентных катионов вызывает снижение K_a , причем зависимость ее от концентрации двухвалентных катионов более резкая. Обнаружен оптимум концентрации: так, K_a значительно больше при 5×10^{-4} М Mg^{2+} , чем в отсутствие Mg^{2+} или при 10^{-2} М. В обычных условиях реакции аминоацилирования *in vitro* концентрация Mg^{2+} составляет примерно 10^{-2} М. Таким образом, константа ассоциации тРНК^{Иле} и изолейцин-тРНК-синтетазы существенно ниже возможной.

Ярус полагает, что величина K_a в определенной степени обусловлена электростатическими взаимодействиями, однако это не единственное объяснение, так как в условиях эксперимента изменяется также форма молекулы тРНК, о чем свидетельствует изменение величины $S_{20;w}^0$ при варьировании концентраций этанола или диоксана. Возрастание сродства при этом автор объясняет релаксацией конформации или «разрыхлением» молекулы тРНК. «Разрыхленная» молекула, по мнению Яруса, быстрее приспосабливается к поверхности изолейцил-тРНК-синтетазы. В нормальных растворителях специфичность взаимодействия между тРНК^{Иле} и изолейциновой синтетазой отчасти определяется, по мнению автора, наличием компактной структуры тРНК^{Иле}.

Приведенные результаты свидетельствуют о том, что двухвалентные катионы не существенны при функционировании изолейциновой синтетазы из *E. coli*. Этот вывод находит подтверждение и в работе Эльдред и Шиммеля [24], показавших, что при аминоацилировании тРНК^{Иле} из *E. coli* изолейциновой синтетазой ни на одной из стадий реакции не происходит каких-либо изменений в присутствии или в отсутствие 5 мМ Mg^{2+} . Данные, полученные Эльдредом и Шиммелем, находятся в некотором противоречии с результатами других исследователей [2], которые ранее показали необходимость ионов двухвалентных металлов в суммарной реакции аминоацилирования тРНК^{Иле}. Отсутствие Mg^{2+} угнетало реакцию АТФ — ПФ-обмена до 0,5%-ной активности. Кэйн и соавт. [25] определили, что исходная тРНК из *E. coli* содержала 2,5 моль Mg^{2+} на молекулу тРНК. Затем исходную тРНК подвергли двум видам деионизации: 1) хроматографии на сефадексе Г-100 с последующим диализом в течение 12 ч против Хелекса и 5 мМ хлорида тетраметиламмо-

ния; 2) нагреванию исходной тРНК до 60° в течение 8 мин в 20 мМ ЭДТА с последующим диализом против 0,02 М трис-НСI буфера при рН 8,0. В результате были получены тРНК₂ и тРНК₃, содержащие 0,4 моль Mg²⁺ на молекулу тРНК.

После этого был проведен сравнительный анализ влияния спермидина, Mg²⁺ и спермидина+ЭДТА на активность изолейцил-тРНК-синтетазы в реакции АТФ — ПФ-обмена. Отсутствие ионов магния угнетало эту реакцию до 0,5%-ной активности, независимо от присутствия спермидина. В реакции аминоацилирования активность фермента убывает соответственно при инкубации изолейцил-тРНК-синтетазы с Mg²⁺, спермидином, спермидином+ЭДТА как для тРНК₂, так и для исходной тРНК. Помимо этого было показано, что лантаноиды Nd³⁺ и Gd³⁺ активируют реакцию аминоацилирования тРНК₃ сильнее, чем Mg²⁺ в той же концентрации.

Анализ результатов, полученных при изучении влияния ионов магния на функционирование изолейцил-тРНК-синтетазы из *E. coli*, не дает пока однозначного ответа, хотя большинство исследований приходят к заключению, что ионы двухвалентных катионов, в частности магния, не существенны для образования изолейциладенилата и реакции переноса остатка изолейцина на тРНК. По-видимому, ионы магния необходимы лишь для образования комплекса (или комплексов) изолейцил-тРНК-синтетазы и субстратов, возникающих в процессе суммарной реакции аминоацилирования тРНК [22, 26]. Интересно, что влияние ионов магния на связывание субстратов с изолейцил-тРНК-синтетазой можно обнаружить только при одновременном добавлении изолейцил-тРНК-синтетазы, а также изолейцина и АТФ [26]. Ситуация, возникающая при образовании изолейцил-тРНК, довольно сложна для оценки роли ионов магния или других металлов. При этом следует, вероятно, учитывать тот факт, что изолейцил-тРНК-синтетаза катализирует деацилирование изолейцил-тРНК в отсутствие АМФ и ПФ при температуре 37° и рН 7,0. Неацилированная тРНК является конкурентным ингибитором этой реакции. Изолейцил, АТФ и изолейцил-АМФ также ингибируют деацилирование изолейцил-тРНК, но не полностью, а АМФ и ПФ не влияют на скорость деаминоацилирования [27].

Таким образом, ионы магния необходимы для функционирования изолейцил-тРНК-синтетазы и, по-видимому, для других синтетаз. В частности, метиониновая синтетаза из *E. coli* нуждается в ионах магния, по-видимому, на двух стадиях реакции [28, 29]. Показано, что образование комплекса метионил-тРНК-синтетазы и тРНК^{Мет} происходит при обязательном присутствии ионов магния [30]. тРНК^{Мет} и тРНК^{Мет}_ф требуют для максимального связывания с ферментом разных концентраций Mg²⁺: соответственно 1 и 4 мМ.

Аминоацилирование фенилаланиновой, лейциновой, валиновой, лизиновой и глутаминовой тРНК из печени крыс зависит от

pH, концентрации буфера и ионов магния в реакционной смеси [31].

Ионы магния необходимы для обеих стадий реакции образования гистидил-тРНК в системе из *S. typhimurium* [32]. Присутствие ионов магния было также обязательным при образовании комплекса тирозил-тРНК-синтетазы и тРНК^{Тир}. При этом связывание тРНК^{Тир} с синтетазой было специфическим. В аналогичных условиях связывание тРНК^{Иле} с изолейцил-тРНК-синтетазой было значительно меньше [33, 75]

В работе Чостермана и Шапвиля [34] показано, что тирозил-тРНК-синтетаза из *E. coli* образует тирозиладенилат-ферментные комплексы как в присутствии, так и без ионов магния в среде с той лишь разницей, что в присутствии магния скорость образования комплексов в 10 раз выше. Тирозил-тРНК-синтетаза для реакции АТФ — ПФ-обмена также необходимы ионы магния, однако эта реакция может протекать и без магния, но только при высоких концентрациях фермента и длительной инкубации. Авторы отметили, что в отсутствие ионов магния происходит гидролиз тирозиладенилата, а в присутствии — пирофосфоролиз и дальнейший перенос аминокислоты на тРНК. Аминоацилирование тРНК^{Тир} может происходить и в присутствии спермидина, однако скорость такой реакции в 16 раз меньше, чем с Mg²⁺. Следует подчеркнуть, что ионы магния во многих случаях могут быть заменены другими катионами и даже моновалентными. Так, Игараши и соавт. [35] наблюдали суммарный эффект Mg²⁺ и некоторых других ионов при образовании валил-, изолейцил- и фенилаланил-тРНК.

Образование валил-тРНК в отсутствие ионов магния могут стимулировать ионы NH⁺, Li⁺, Na⁺, K⁺, среди которых более эффективны NH₄⁺ и Li⁺. Оптимум концентрации 0,1—0,2 М. Ионы NH₄⁺, Li⁺ или K⁺ заметно стимулировали реакцию аминоацилирования лейциновой тРНК, при этом скорость ее была почти такой же, как и в присутствии оптимальной концентрации ионов магния. Однако образование изолейцил-тРНК стимулируется только NH₄⁺. В присутствии NH₄⁺, K⁺ или Na⁺ АТФ — ПФ-обмен и образование гидроксаматов аминокислот не наблюдается, но эти реакции происходят в присутствии Li⁺. В то же время NH₄⁺, Na⁺ и K⁺ стимулируют образование аминоацил-тРНК. Авторы [35] считают, что Mg²⁺ может быть заменен некоторыми ионами частично либо полностью.

Полученные данные создают впечатление, что у ионов металлов нет выраженной специфичности в отношении тех или других аминоацил-тРНК-синтетаз. По-видимому, ионы металлов создают благоприятные условия для оптимальных электростатических взаимодействий аминоацил-тРНК-синтетаз с субстратами и определенную компактную конформацию тРНК.

В настоящее время неясна роль ионов магния в функционировании валил-тРНК-синтетазы из *E. coli*. В одном случае [35] показано, что ионы магния и других металлов стимулируют образование валил-тРНК, а в другом — получены данные о том, что для связывания тРНК, валина или АТФ с ферментом ионы магния не нужны [36]. Показано, что валин, АТФ, Mg^{2+} и Mn^{2+} могут порознь связываться с ферментом [36]. Очень высокая чувствительность отмечена у валил- и лейцил-тРНК-синтетаз к ионному составу инкубационной среды у микроорганизмов из видов *Aesculus* [37].

Интересное наблюдение было проведено на валил-тРНК-синтетазах, выделенных из цитоплазмы и хлоропластов фасоли [38]. Валил-тРНК-синтетаза из цитоплазмы в реакции аминоацилирования тРНК^{Вал} более чувствительна к ингибированию избытком ионов магния, спермидина или меркаптоэтанола, чем фермент из хлоропластов. Ионы магния, необходимые в оптимальных концентрациях для функционирования валиновой синтетазы, могут быть заменены ионами кобальта, но не ионами кальция, а для фермента из хлоропластов наоборот: ионы магния заменяемы ионами Ca^{2+} , но не Co^{2+} . При изучении условий образования аминоацил-тРНК в бесклеточной системе из листьев фасоли показано, что оптимальное отношение концентраций АТФ и Mg^{2+} для включения смеси аминокислот равно 1 : 8. При этом для максимальной активации аминоацил-тРНК-синтетаза важна абсолютная концентрация этих компонентов в реакционной смеси [39]. Отмечено, что присутствие ионов калия резко стимулировало скорость образования аминоацил-тРНК в этой системе, а оптимум рН аминоацилирования тРНК разной специфичности резко отличался. Например, включение аланина в тРНК не происходило совсем при рН 6,4, а при рН 5,8 и 7,6 проходило с высокой скоростью [39].

Выясняя роль ионов металлов в отдельных реакциях и суммарной реакции аминоацилирования тРНК, важно учитывать и то обстоятельство, что при определенных концентрациях солей может происходить гидролиз сложноэфирной связи некоторых аминоацил-тРНК. Показано, что скорость гидролиза фенилаланил-тРНК и валил-тРНК из *E. coli* и печени крыс увеличивается примерно в два раза при увеличении концентрации $MgCl_2$ от 0 до 0,3—0,5 М в буфере (рН 8,8), а увеличение концентрации $MgCl_2$ от 0 до 10 мМ увеличивает скорость гидролиза валил-тРНК из *E. coli* более чем наполовину [40].

Влияние двухвалентных катионов на реакцию активации аминокислот и реакцию переноса изучали и на других аминоацил-тРНК-синтетазах. Так, в работе Шустермана и Шапвиля [41] установлено, что тирозил-тРНК-синтетаза из *E. coli* может катализировать образование тирозил-аденилата в отсутствие ионов магния, в то же время для АТФ — ПФ-обмена ионы магния необходимы. Наряду с этим авторы показали, что реакция амино-

ацилирования тРНК^{Тир} также нуждается в присутствии ионов магния. Интересно, что в присутствии 0,2 мг спермидина ход реакции аминокцилирования тРНК^{Тир}, обработанной ЭДТА, такой же, как и с обычной тРНК.

Робинсон и Циммерман [42] изучали зависимость реакции переноса, катализируемой фенилаланил-тРНК-синтетазой из пекарских дрожжей, от присутствия катионов. Они показали, что в условиях эксперимента (*трис*-ацетатный буфер рН 7,2; 21° С) реакция переноса полностью зависит от присутствия олиговалентных катионов. Низкие концентрации ионов магния (0,3 мМ), спермидина (15 мкМ) или спермина (6 мкМ) эффективно стимулировали образование фенилаланил-тРНК. Стимуляция реакции переноса в присутствии ионов магния, спермина и спермидина зависела и хорошо коррелировала с зависимым от концентрации этих соединений усилением флуоресценции тРНК^{Фен}. Последнее обстоятельство, как известно, связано с изменением конформации тРНК^{Фен} [43].

Реакцию переноса 0,1 М NaCl не стимулировал, а в присутствии ионов магния (0,3 мМ) 0,2 М NaCl сильно ингибировал скорость реакции переноса. Робинсон и Циммерман [43] показали, что разная эффективность переноса фенилаланина на тРНК в зависимости от присутствия катионов не связана с резкими изменениями стабильности фенилаланиладенилат-ферментного комплекса при разных ионных силах. Полученные результаты дали авторам возможность прийти к выводу, что индуцированные олиговалентными катионами конформационные изменения тРНК^{Фен} представляют собой переход в биологически активную форму, в основном за счет изменения третичной структуры молекулы. Другие исследователи [37] также подтвердили необходимость ионов магния на обеих стадиях образования фенилаланил-тРНК из *E. coli*. Довольно широкий спектр катионов был исследован в реакции образования комплекса АТФ и лейцил-тРНК-синтетазы из *E. coli*, который может образовываться в отсутствие лейцина [44]. Установлено, что для образования комплекса Е — АТФ необходимо присутствие ионов магния, марганца или кальция. При этом период полураспада комплекса был равен 68, 48 и 22 мин при 0° и зависел от того, какой ион был использован в реакции. соответственно — магний, марганец или кальций. Эти катионы нужны также для переноса остатка лейцина из комплекса Е-лейциладенилата на тРНК; при этом эффективность переноса остатка аминокислоты неравнозначна: наибольшее влияние оказывали ионы магния, наименьшее — ионы кальция. Авторы [37], изучавшие роль других катионов в данной реакции, показали, что в присутствии NH₄⁺ и К⁺ скорость реакции и максимальный выход лейцил-тРНК увеличивались, в то же время ионы натрия несколько снижали эти показатели. Очевидно, влияние различных катионов на аминокцилирование тРНК сильно отличается в зависимости от биологического объекта и специфичности амино-

ацил-тРНК-синтетазы. В качестве иллюстрации весьма показательно результаты, полученные Нарашима и соавт. [45] на печени крыс. В инкубационную смесь с оптимальными условиями для аминоацилирования, в которой находились ионы магния в концентрации 5 мМ, добавляли ионы кальция. Это привело к резкому снижению акцепторной активности ряда тРНК. Концентрирование ионов кальция в 5 мМ Mg^{2+} ингибировало аминоацилирование тРНК_{Ала} на 98%, тРНК_{Фен} — на 81 и тРНК_{Гли} — на 76%. На аминоацилирование остальных тРНК Ca^{2+} оказывал более слабое влияние, а аминоацилирование тРНК_{Тре} даже несколько повышалось в присутствии ионов кальция.

Было проведено довольно обстоятельное изучение лизиновой синтетазы из *E. coli* [46]. NH_4Cl ингибирует образование АТФ-ферментного комплекса, тогда как ионы магния стимулируют образование $E-ATP$ и $E-AMF$ — Лиз. При изучении переноса остатка лизина с $E-AMF$ — Лиз на тРНК была обнаружена довольно сложная зависимость. Моновалентные катионы, особенно NH_4^+ , ингибировали образование лизил-тРНК, если в инкубационной смеси присутствовали лизин, тРНК, АТФ-ферментный комплекс или АТФ. Синтез зависел только от присутствия Mg^{2+} . Однако в присутствии лизил-АМФ-Е-комплекса и тРНК образование лизил-тРНК стимулировалось моновалентными катионами и NH_4^+ , тогда как ионы магния ингибировали реакцию. На основании полученных данных авторы [46] сделали заключение, что лизил-тРНК-синтетаза *E. coli* катализирует образование лизил-тРНК двумя различными механизмами, один из которых не включает аденилатный путь, о чем уже упоминалось в главе 2 [47, 48].

Это предположение возникло на основании фактического материала, определенную часть которого занимают данные о влиянии катионов на первую и вторую стадии реакции образования аминоацил-тРНК. Так, Игараши и Такеда [49] показали на фенилаланил-тРНК из *E. coli*, что полиамины (спермин, путресцин) оказывают стимулирующее действие на образование аминоацил-тРНК в отсутствие ионов магния. Спермин связывается с тРНК, а не с ферментом. В то же время в присутствии 20 мМ Mg-ацетата только 60% спермина связывается с тРНК, а в присутствии 10 мМ Mg-ацетата — 77%.

Таким образом, связывание ингибировалось ионами магния. В присутствии постоянных количеств тРНК увеличение количества спермина вызывало увеличение выхода фенилаланил-тРНК. Авторы [49] предполагают, что спермин и ионы магния играют одну и ту же роль, стабилизируя вторичную структуру тРНК и стимулируя образование аминоацил-тРНК. В последующих работах [50, 51, 77] сравнивали механизмы образования изолейцил-тРНК из *E. coli* в присутствии полиаминов (спермина, спермидина, путресцина) и ионов магния. В присутствии ионов магния происходил зависимый от изолейцина АТФ — ПФ-обмен и обра-

зование гидроксамата аминокислоты. В присутствии полиаминов обе реакции не наблюдались. Показано также, что полиамины не стимулировали образования аминоацил-АМФ-ферментного комплекса. В то же время ионы магния и полиамины стимулировали реакцию переноса аминокислоты с предварительно образованного аминоацил-АМФ-ферментного комплекса на тРНК. Таким образом, в присутствии полиаминов фермент не катализировал первой реакции — образования комплекса аминоациладенилата и фермента.

Авторы [50, 51] рассматривают полученные данные как подтверждение существующей гипотезы «концертного» механизма образования аминоацил-тРНК [48]. Суть этого механизма заключается в том, что все три субстрата — аминокислота, АТФ и тРНК — связываются с ферментом и взаимодействуют одновременно, без формирования промежуточных продуктов реакции, в частности аминоациладенилата. Пастузин и Лофтфильд [52] получили аналогичные результаты на валил-тРНК-синтетазе из *E. coli*. Они обнаружили, что скорость АТФ — ПФ-обмена в присутствии спермина, но без ионов магния в 12 раз меньше скорости образования валил-тРНК и в 10 раз меньше магнийзависимого АТФ — ПФ-обмена в сравнимых условиях. Авторы [52] считают эти данные несовместимыми с обязательным участием аминоациладенилат-ферментного комплекса как промежуточного продукта при ферментативном катализе аминоацил-тРНК. Они считают, что полученные данные согласуются с гипотезой «концертного» механизма. Изучая этерификацию глутамил-тРНК печени крыс под влиянием салициловой кислоты, Бурлей и Смит [53] показали, что салициловая кислота полностью ингибирует реакцию АТФ — ПФ-обмена, являясь простым конкурентным ингибитором для глутаминовой кислоты и смешанным конкурентно-неконкурентным ингибитором для АТФ и тРНК. Полученные данные дали авторам возможность полагать, что синтез глутамил-тРНК происходит при сопряженном взаимодействии глутаминовой кислоты, АТФ и тРНК. Это исключает образование связанного с ферментом глутамиладенилатного комплекса. Лофтфильд [62] приводит ряд данных, свидетельствующих в пользу гипотезы «концертного» механизма образования некоторых аминоацил-тРНК, среди которых такие, как неэффективность *d*-формы АТФ в суммарной реакции образования аминоацил-тРНК, полная неспособность некоторых аминоацил-тРНК-синтетаз стимулировать АТФ — ПФ-обмен, что становится возможным лишь в присутствии интактных тРНК, кинетические данные, показывающие случайное присоединение трех субстратов — АТФ, аминокислоты и тРНК — к некоторым синтетазам и кинетические доказательства того, что перенос аминокислоты от комплекса Е — АМФ — аминокислота на тРНК происходит очень медленно по сравнению с синтезом аминоацил-тРНК в системе, содержащей АТФ, АК и тРНК.

Изучая влияние тРНК на активацию АК с помощью АТФ — ПФ-обмена на примере изолейцил-тРНК-синтетазы, Макнеил и Шиммель [54] пришли к заключению, что тРНК практически не влияет на механизм активации аминокислоты. Авторы считают, что субстраты присоединяются к ферменту беспорядочно, независимо от присутствия тРНК. Такое предположение следует из факта, что комплексы $E - АТФ$ и $E - Иле$ существуют независимо друг от друга, т. е. фермент может связываться с АТФ или с изолейцином независимо от второго субстрата. Аналогичные результаты на изолейцил-тРНК-синтетазе *E. coli* получены группой японских исследователей [55, 56], которые показали, что полиамины стимулировали образование Иле — тРНК и заменяли ионы магния при аминоацилировании тРНК. В то же время в отсутствие тРНК различные полиамины не стимулировали реакцию АТФ — ПФ-обмена и не способствовали образованию комплекса Иле — АМФ — Е. Однако в присутствии ионов магния эти реакции происходили. Полученные результаты дали основание авторам прийти к выводу, что образование изолейцил-тРНК происходит по «концертному» механизму, без образования промежуточного продукта АК — АМФ — Е. В пользу случайного присоединения субстратов к синтетазе свидетельствуют и данные, полученные на фенилаланил-тРНК-синтетазе *E. coli* [57, 58]. АТФ при этом была активной лишь в виде $Mg - АТФ$.

Некоторые авторы приводят кинетические доказательства несостоятельности гипотезы «концертного» механизма [10]. Наряду с синтетазами, беспорядочно присоединяющими субстраты [59, 60], имеется ряд синтетаз, для которых существует кинетические доказательства строгой очередности присоединения субстратов, о чем упоминалось в предыдущей главе. Например, изучен порядок присоединения субстратов к пролил-тРНК-синтетазе из *E. coli* [61]. Полученные данные соответствуют теоретически разработанной схеме Келланда [62], предполагающей порядок присоединения субстратов по типу «би-юни-юни-би-пинг-понг», согласно которой к ферменту вначале присоединяются два субстрата (би) — АТФ и аминокислота, образуя в результате комплекс $E - АТФ - АК$ (первой присоединяется АТФ). После этого высвобождается пиросфат (юни) и присоединяется тРНК (юни), давая комплекс фермента АМФ — АК и тРНК, который затем распадается на аминоацил-тРНК и свободный фермент (би). Высвобождение одного из продуктов реакции — ПФ до присоединения последнего субстрата — тРНК, по номенклатуре Келланда, определяется как «пинг-понг-механизм». Кстати, для работы пролил-тРНК-синтетазы *E. coli* необходимы ионы магния, как для активации аминокислот, так и для реакции переноса [63]. Образование аминоацил-тРНК по механизму «би-юни-юни-би-пинг-понг» показано также для треонил-тРНК-синтетазы из печени крыс [64] (первой присоединялась к ферменту АТФ) и для

лейцил-, серил- и валил-тРНК-синтетазы из *E. coli* (порядок присоединения субстратов: АК, АТФ и тРНК) [65].

Определенная последовательность субстратов к триптофановой синтетазе поджелудочной железы коров была показана также в работе В. В. Зиновьева и соавт. [66]. Авторы пришли к заключению, что наибольшую вероятность имеет механизм, в котором наряду с присоединением Трп к комплексу Е — АТФ происходит образование комплекса Трп — Е, не приводящее к реакции обмена. На основании изучения скорости обмена АТФ — ПФ, катализируемого Трп-тРНК-синтетазой [66], авторы считают, что наиболее вероятна такая последовательность присоединения субстратов к ферменту : АТФ, Трп.

Для серил-тРНК-синтетазы *E. coli* также показано упорядоченное присоединение субстратов, причем первой присоединяется АТФ [67]. В этом случае АТФ была активна только в форме мономагниевого соли, как и в случае с метиониновой синтетазой из *E. coli* [68]. Каталитические свойства метиониновой синтетазы *E. coli* [68] были подвергнуты тщательному кинетическому и флуориметрическому анализу, который показал, что возможен только случайный порядок присоединения субстратов к ферменту. Результаты, полученные с помощью метода флуориметрического анализа, который был использован для изучения взаимодействия фермента с метионином, АТФ и АТФ — Mg^{2+} , хорошо совпали с данными кинетического анализа.

Таким образом, порядок присоединения субстратов к ферменту, по-видимому, в каждом случае следует изучать специально. Аминоацил-тРНК-синтетазы, пожалуй, самый «неудобный» объект исследований для того, чтобы на основе полученных данных можно было сделать широкое обобщение. Это, вероятно, касается всех аспектов исследования ферментов данного класса, в том числе и такого, как влияние олиговалентных катионов на отдельные реакции синтеза аминокислот.

В некоторых случаях, однако, исследователи пытаются найти объяснения явно противоречивым данным. Так, Циммерман и Робинсон [69], анализируя тот факт, что одни синтетазы катализируют реакцию переноса в отсутствие ионов магния, а другие — при обязательном их присутствии, предполагают, что разные данные получаются вследствие неидентичных условий реакции. Авторы показали, что ионы магния, необходимые фенилаланин-тРНК-синтетазе из пекарских дрожжей для катализа реакции переноса, могут быть элиминированы, если вместо *трис*-ацетатного буфера (10 мМ, рН 7,2) использовать 50 мМ Na-какодилатный, цитратный или сукцинатный буфер. Эти буферные системы высоко активны в реакции переноса аминокислоты на тРНК в отсутствие ионов магния. При изучении реакции переноса в Na-какодилатном буфере образование фенилаланил-тРНК стимулировалось как увеличением концентрации буфера, так и снижением его рН до 6,2. В *трис*-ацетатном буфере реакция переноса без ионов

магния не происходила. Циммерман и Робинсон [69] высказывают предположение, что другие синтетазы могут вести себя аналогичным образом по отношению к ионам магния, необходимым для реакции переноса. Это, вероятно, даст возможность примирить две противоположные точки зрения относительно роли ионов магния в данной реакции. Следовательно, буферы нельзя рассматривать во всех случаях как инертные соединения, поддерживающие рН реакционной смеси, на что обратили внимание Ритер и соавт. [70], показав, что аминоацилирование валиновой тРНК из *E. coli* гетерологичным ферментом чрезвычайно чувствительно к условиям реакции, а выход конечного продукта и скорость его образования в значительной степени зависят от выбранного буфера и значения рН.

Последнее обстоятельство, разумеется, вовсе не означает, что ионы металлов, и в частности магния, совершенно не играют роли в образовании аминоацил-тРНК. Следует подчеркнуть, что ионы магния могут взаимодействовать как с субстратами, так и с продуктами реакции, в результате чего могут образовываться биологически активные и инертные соединения. Так, показано, что $Mg-AT\Phi^{2-}$ и $Mg-P_2O_7^{2-}$ являются единственными субстратными формами АТФ и ПФ при рН 8,0 [71]. Анализ показал, что $Na-AT\Phi^{2-}$, $H-AT\Phi^{3-}$, $AT\Phi^{4-}$, $Na-P_2O_7^{3-}$ и $(Mg)_2P_2O_7$ полностью или в значительной степени не могут служить субстратами и, по-видимому, ингибиторами в условиях эксперимента. Уменьшение скорости активации изолейцина, катализируемой высокоочищенной изолейцил-тРНК-синтетазой из *E. coli*, при высоких концентрациях ионов магния обусловлено снижением содержания $Mg-P_2O_7^{2-}$ за счет образования инертного $(Mg)_2P_2O_7$. При низком содержании ионов магния АТФ ингибирует реакцию, отнимая металл от ПФ и тем самым препятствуя образованию $Mg-P_2O_7^{2-}$ [58]. Известно, что ферменты при катализе аминоацилирования тРНК требуют оптимальных соотношений $AT\Phi/Mg^{2+}$ в реакционной смеси. Эти соотношения для каждого фермента следует определять отдельно, так как они могут существенно отличаться [73—75]. Ионы магния необходимы также при ферментативном деаминоацилировании ряда аминоацил-тРНК [72].

В заключение следует подчеркнуть, что в настоящее время одним из фундаментальных вопросов является выяснение, каким образом аминоацил-тРНК-синтетазы специфически распознаются и отбирают такие субстраты, как аминокислоты и тРНК, создавая условия для декодирования матричных РНК. Ответ требует знания различий структуры разных аминоацил-тРНК-синтетаз, особенностей катализа и условий аминоацилирования тРНК. Аминоацил-тРНК-синтетазы, несмотря на многие общие свойства и черты, отличаются в то же время таким множеством признаков, что необходимо избегать аналогий и обобщений. Каждый фермент требует отдельного детального изучения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Киселев Л. Л., Фаворова О. О. Аминоацил-тРНК-синтетазы.— Усп. биол. хим., 1970, 11, 39.
2. Киселев Л. Л. и др. Молекулярные основы биосинтеза белка. М., «Наука», 1971.
3. Hoagland M. An enzymic mechanism for amino acid activation in animal tissues.— Biochim. Biophys. Acta, 1955, 16, 288.
4. Hoagland M., Keller E., Zamecnik P. Enzymatic carboxylic activation of amino acids.— J. Biol. Chem., 1956, 218, 345.
5. Allende C., Allende J., Gatica M., Celis I., Mora G., Matamala M. Properties of the threonyl-adenylate enzyme complex.— J. Biol. Chem., 1966, 241, 2245.
6. Allende I., Mora G., Gatica M., Allende C. The role of metal ions in the formation of threonyl-tRNA from threonyl-adenylate enzyme complex.— J. Biol. Chem., 1965, 240, 3229.
7. Lagerkvist U., Rymo L., Waldenström J. Structure and function of transfer ribonucleic acid.— J. Biol. Chem., 1966, 241, 5391.
8. Hele P., Barber R. Lysyl-tRNA synthetase of *E. coli* B: formation of ATP-enzyme and lysyl-AMP-enzyme complexes.— Biochim. Biophys. Acta, 1972, 258, 319.
9. Waldenström I. Some properties of lysyl ribonucleic acid synthetase from *E. coli*.— Europ. J. Biochem., 1968, 5, 239.
10. Eldred E., Schimmel P. Investigation of the transfer of amino acid from a transfer ribonucleic acid synthetase—aminoacyl-adenylate complex to transfer ribonucleic acid.— Biochemistry, 1972, 11, 17.
11. Yarus M., Berg P. On the properties and utility of a membrane filter assay in the study of isoleucyl-tRNA synthetase.— Anal. Biochem., 1970, 35, 450.
12. Baldwin A., Berg P. Transfer ribonucleic acid-induced hydrolysis of valyl-adenylate bound to isoleucyl ribonucleic acid synthetase.— J. Biol. Chem., 1966, 241, 839.
13. Kuo T., DeLuca M. Requirement of different sulfhydryl groups in the activation and transfer reactions of isoleucyl transfer ribonucleic acid synthetase.— Biochemistry, 1969, 8, 4762.
14. Kondo M., Woese C. Specificity of aminoacyl transfer ribonucleic acid synthetase from *E. coli* K 12.— Biochemistry, 1969, 8, 4177.
15. Parin A., Savelyev E., Kisselev L. Complexes of the tryptophanyl tRNA synthetase with adenosinetriphosphate and triptophanyl-adenylate.— FEBS Lett., 1970, 9, 163.
16. Lindahl T., Adams A., Fresco I. Renaturation of tRNA through site binding of magnesium.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1966, 55, 941.
17. Мадука Г. Х. Биологически активные и неактивные тРНК животных тканей. Автореф. докт. дис. Киев, 1972.
18. Grosjean H., Charlier I., Vanhumbrecht I. Magnesium requirement in the transacylation reaction catalyzed by isoleucyl-tRNA synthetase of *Bacillus stearothermophilus*.— Biochem. Biophys. Res. Commun., 1968, 32, 935.
19. Grosjean C., Grosjean H. Ile-tRNA synthetase from *Bacillus stearothermophilus*.— Europ. J. Biochem., 1972, 25, 163.
20. Charlier I., Grosjean H. Isoleucyl-tRNA-synthetase from *Bacillus stearothermophilus*.— Europ. J. Biochem., 1972, 25, 163.
21. Bluestein H., Allende C., Allende E., Cantoni L. Seryl transfer ribonucleic acid synthetase from Baker's yeast.— J. Biol. Chem., 1968, 243, 4693.
22. Yarus M., Rashbaum S. Divalent cations in transfer ribonucleic acid and tRNA synthetase function and structure.— Biochemistry, 1972, 11, 2043.
23. Yarus M. Binding of isoleucyl-tRNA by isoleucyl tRNA synthetase: solvents the strength of interaction and a proposed source of specificity.— Biochemistry, 1972, 11, 2050.

24. Eldred E., Schimmel P. Investigation of the transfer of amino acid from a tRNA synthetase—aminoacyl adenylate complex to tRNA.—*Biochemistry*, 1972, **11**, 17.
25. Kayne M., Cohn M. Cation requirements of isoleucyl-tRNA synthetase from *E. coli*.—*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1972, **46**, 1285.
26. Penzer G., Bennett E., Calvin M. Isoleucyl-tRNA synthetase. A fluorescence study of the binding properties of the synthetase from *E. coli*.—*Europ. J. Biochem.*, 1971, **20**, 1.
27. Schreier A., Schimmel P. tRNA synthetase catalyzed deacylation of aminoacyl tRNA in the absence of adenosine monophosphate and pyrophosphate.—*Biochemistry*, 1972, **11**, 1582.
28. Blanquet S., Fayat G., Waller I., Imatsumo M. The mechanism of reaction of methionyl-tRNA synthetase from *E. coli*. Interaction of the enzyme with ligands of the aminoacid-activation reaction.—*Europ. J. Biochem.*, 1971, **24**, 461.
29. Lawrence F., Blanquet S., Poiret M., Robert-Gero M., Waller I. The mechanism of action of methionyl-tRNA synthetase. Ion requirements and methionine transfer reactions catalyzed by the native and trypsin-modified enzymes.—*Europ. J. Biochem.*, 1973, **36**, 234.
30. Blanquet S., Imatsumo M., Waller I. The interaction of methionyl tRNA synthetase and tRNA^{Met}.—In: 9th Intern. Congr. Biochem., Stockholm, 1973, Abstr. Stockholm, 1973, 160.
31. Vargas R., Castaneda M. Inhibition of aminoacyl-tRNA synthetase from rat liver by reducing agents.—*Canad. J. Biochem.*, 1973, **51**, 1537.
32. Di Natale P., Cimio F., De Lorenzo F. Histidyl-tRNA synthetase from *Str. typhimurium*: The pyrophosphate exchange reaction.—In: 9th Intern. Congr. Biochem., Stockholm, 1973, Abstr. Book. Stockholm, 1973, 198.
33. Scoemaker H., Schimmel P. Photo-induced joining of tRNA with its cognate aminoacyl-tRNA synthetase.—*J. Mol. Biol.*, 1974, **84**, 503.
34. Chousterman S., Chapeville F. Tyrosyl-tRNA synthetase of *E. coli* B. Role magnesium ions in the reaction catalyzed by the enzyme.—*Europ. J. Biochem.*, 1973, **35**, 46.
35. Igarashi K., Yoh M., Takeda Y. Replacement of Mg²⁺ by monovalent cations in aminoacyl tRNA formation.—*Biochim. Biophys. Acta*, 1971, **238**, 314.
36. Helene C., Brun F., Yaniv M. Fluorescence studies of interactions between *E. coli* valyl-tRNA synthetase and its substrates.—*J. Biol. Chem.*, 1971, **58**, 349.
37. Anderson I., Fowden L. Properties and substrate specificity of the leucyl-, the threonyl- and the valyl-tRNA synthetases from *Aesculus species*.—*Biochem. J.*, 1970, **119**, 691.
38. Burkard G., Guillemaut P., Weil I. Comparative studies of the tRNA's and the aminoacyl-tRNA synthetases from the cytoplasm and chloroplasts of *Phaseolus vulgaris*.—*Biochim. Biophys. Acta*, 1970, **224**, 184.
39. Tao K., Hall T. Factors controlling aminoacyl-tRNA synthesis in vitro by a plant system.—*Biochem. J.*, 1971, **121**, 495.
40. Novogradsky A. The enhancing effect of ionic strength and MgCl₂ on the rate of the nonenzymic hydrolysis of N-blocked aminoacyl-tRNA's.—*Biochim. Biophys. Acta*, 1971, **228**, 686.
41. Chousterman S., Chapeville F. *E. coli* tyrosyl-tRNA synthetase. Influence of magnesium ions on the enzymatic activity.—*FEBS Lett.*, 1971, **17**, 153.
42. Robinson B., Zimmerman T. Cation dependence of the transfer reaction catalyzed by Phe-tRNA synthetase from Baker's yeast.—*J. Biol. Chem.*, 1971, **246**, 4664.
43. Robinson B., Zimmerman T. A conformational study of yeast phenylalanine transfer ribonucleic acid.—*J. Biol. Chem.*, 1971, **246**, 110.
44. Santi D., Danenberg P., Satterly P. Phenylalanine tRNA synthetase from *E. coli*. Reaction parameters and order of substrate addition.—*Biochemistry*, 1971, **10**, 4804.

45. Narasimha R., Smet M., Bygrave F. Inhibition by calcium of tRNA aminoacylation in preparations from rat liver.—FEBS Lett., 1974, **41**, 185.
46. Hele P., Barber R. Lysyl tRNA synthetase of *E. coli* B: formation and reaction of ATP-enzyme and lysyl-AMP-enzyme complexes.—Biochim. Biophys. Acta, 1972, **258**, 319.
47. Ravel I., Shu-Fong Wang, Heinemayer C., Shive W. Glutamyl and glutaminyl ribonucleic acid synthetase of *E. coli* W.—J. Biol. Chem., 1965, **240**, 432.
48. Loftefield, Eigner E. Mechanism of action of amino acid transfer ribonucleic acid ligases.—J. Biol. Chem., 1969, **244**, 1746.
49. Igarashi K., Takeda Y. Polyamines and protein synthesis. VI. Role of spermine on aminoacyl-tRNA formation.—Biochim. Biophys. Acta, 1970, **213**, 240.
50. Igarashi K., Matsuzaki K., Takeda Y. Amino acyl tRNA formation. Absence of PP-ATP exchange in aminoacyl-tRNA formation.—Biochim. Biophys. Acta, 1971, **254**, 91.
51. Igarashi K., Matsuzaki K., Takeda Y. Comparison of the mechanisms of aminoacylations stimulated by polyamines and Mg^{2+} .—Biochim. Biophys. Acta, 1972, **262**, 476.
52. Pastuszyn A., Loftefield R. Non-participation of aminoacyl adenylates in the spermine catalyzed aminoacylation of tRNA.—Biochem. Biophys. Res. Commun., 1972, **47**, 775.
53. Burleigh M., Smith M. The mechanism of action of rat liver glutamyl-tRNA synthetase.—Biochem. J., 1970, **119**, 69.
54. McNeil M., Simmel P. Effect of tRNA on the rate low and mechanism of adenosine triphosphate-pyrophosphate isotope exchange reaction of an aminoacyl-tRNA synthetase.—Arch. Biochem. Biophys., 1972, **152**, 175.
55. Matsuzaki K., Takeda Y. Aminoacyl tRNA formation. Mechanism of aminoacylation stimulated by polyamines.—Biochim. Biophys. Acta, 1973, **308**, 339.
56. Takeda Y., Matsuzaki K., Igarashi K. Isoleucyl-tRNA formation stimulated by polyamines.—In: 9th Intern. Congr. Biochem., Stockholm, 1973, Abstr. Book. Stockholm, 1973, 199.
57. Holler E., Hanke T., Kosakowski H. Phenylalanyl-tRNA synthetase from *E. coli*: synergistic coupling between the sites for binding of L-phenylalanine and ATP.—Biochem. Biophys. Res. Commun., 1973, **53**, 1205.
58. Kosakowski H., Holler E. Phe-tRNA synthetase from *E. coli* K 10. Synergistic coupling between the sites for binding of L-Phe and ATP.—Europ. J. Biochem., 1973, **38**, 274.
59. Satterly P., Santi V., Danenberg V. Phenylalanyl transfer ribonucleic acid synthetase from *E. coli*. Reaction parameters and order of substrate addition.—Biochemistry, 1971, **10**, 4804.
60. Santi D., Penavan A. Order of substrate binding to tyrosyl-tRNA synthetase of *E. coli* B.—FEBS Lett., 1971, **13**, 157.
61. Papas T., Mehler A. Kinetic studies of the propyl tRNA synthetase of *E. coli*. Order of addition of substrates and release of products.—J. Biol. Chem., 1971, **246**, 5924.
62. Cleland W. The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products. Nomenclature and rate equations.—Biochim. Biophys. Acta, 1963, **67**, 104.
63. Papas T., Mehler A. Analysis of the amino acid binding to the proline tRNA-synthetase of *E. coli*.—J. Biol. Chem., 1970, **245**, 1588.
64. Allende C., Chaimovich H., Gatica M., Allende E. The aminoacyl transfer ribonucleic acid synthetase.—J. Biol. Chem., 1970, **245**, 93.
65. Myers G., Blank H., Söll D. A comparative study of the interactions of *E. coli* leucyl-, seryl-, and valine-tRNA synthetases with their cognate tRNA.—J. Biol. Chem., 1971, **246**, 4955.
66. Зиновьев В. В., Киселев Л. Л., Кнорре Д. Г., Кочкина Л. Л., Малыгин Э. Г., Слинко М. Г., Тимошенко В. И., Фаворо-

- в а О. О. Кинетическая схема и кинетические параметры реакции обмена АТФ — ^{32}P -пирофосфат, катализируемой триптофанил-тРНК-синтетазой из поджелудочной железы быка.— Мол. биол., 1974, 6, 380.
67. Воеcker E., Cantoni G. Seryl tRNA synthetase of *E. coli* B, enzyme-substrate interactions.— Biochemistry, 1973, 12, 2384.
 68. Fayat G., Waller I. The mechanism of action of methionyl-tRNA-synthetase from *E. coli*. Equilibrium dialysis studies on the binding of methionine, ATP and ATP-Mg $^{2+}$ by the native and trypsin modified enzymes.— Europ. J. Biochem., 1974, 44, 335.
 69. Zimmerman T., Robinson B. Effect of assay conditions on the magnesium requirement of the transfer reactions catalyzed by Phe-tRNA synthetase from Baker's yeast.— Biochem. Biophys. Res. Commun., 1972, 47, 1138.
 70. Ritter P., Kull F., Jacobson K. Aminoacylation of *E. coli* valine tRNA by *Neurospora crassa* phenylalanyl tRNA synthetase in tris aminomethan hydrochloric acid and potassium cocodilate buffers.— J. Biol. Chem., 1970, 245, 2114.
 71. Cole F., Schimmel P. Isoleucyl tRNA synthetase. The role of magnesium in amino acid activation.— Biochemistry, 1970, 16, 3143.
 72. Sourgoutchov A., Blanquet S., Fayat G., Waller I. Enzymatic deacylation of methionyl-tRNA $^{\text{Met}}$ phenylalanyl-tRNA synthetases.— Europ. J. Biochem., 1974, 46, 431.
 73. Rubin I., Kellers A., Goldstein G. The determination of transfer ribonucleic acid by aminoacylation.— Anal. Biochem., 1967, 20, 533.
 74. Shearn A., Horowitz N. A study of transfer ribonucleic acid in *Neurospora* I. The attachment of amino acids and amino acid analogs.— Biochemistry, 1969, 8, 295.
 75. Shristopher C., Jones M., Stafford D. Phe-tRNA-synthetase from *Drosophila melanogaster*. I. L-phenylalanine activation optima for pH, temperature and Mg $^{2+}$ estimation of molecular weight.— Biochim. Biophys. Acta, 1971, 228, 682.
 76. Rouget P., Chapeville F. Leucyl-tRNA synthetase. Mechanism of leucyl-tRNA formation.— Europ. J. Biochem., 1971, 23, 443.
 77. Holler E. Isoleucyl tRNA synthetase of *E. coli* B. Effect of magnesium and spermine on the amino acid activation reaction.— Biochemistry, 1973, 12, 1142.

Глава 4

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ И НЕАКТИВНЫЕ тРНК

В 1966 г. в лаборатории Фреско [1] и Сусеоки [2] одновременно были обнаружены так называемые биологически неактивные формы тРНК у дрожжей и *E. coli*. Фреско и сотр. [3] при фракционировании тРНК противоточным методом обнаружили, что одна из изоакцепторных лейциновых и аргининовых тРНК дрожжей (тРНК₃^{Leu}, тРНК₁^{Arg}) и четыре или пять тРНК *E. coli* (глутаминовая, гистидиновая, триптофановая, N-глутаминовая и, вероятно, лейциновая) теряли способность акцептировать аминокислоты. Эти тРНК были названы «денатурированными» несмотря на то, что они проявляли типичный гипохромизм в условиях умеренной ионной силы и температуры. Аналогичное явление было отмечено Гартландом и Сусеокой [2] при изучении аминоацилирования триптофаной тРНК *E. coli*. Транспортные РНК, полученные в условиях, полностью исключающих воздействие таких денатурирующих агентов, как фенол и дистиллированная вода, получили название нативных [4]. Однако названия «денатурированные» и «нативные» тРНК сразу же стали употребляться параллельно с названиями «неактивные» и «активные» тРНК [5, 6]. В последующем изложении будут использованы те и другие термины.

Линдаль и сотр. [1], обнаружив неактивные тРНК, показали, что неактивные (денатурированные) тРНК могут быть полностью переведены в активные (ренатурированные) инкубацией при 60° в течение 5 мин в присутствии 20 мМ Mg²⁺ с последующим охлаждением раствора до 25°. В то же время было показано, что активную тРНК, обработанную в таких же условиях, можно перевести в неактивную форму, если вместо ионов магния добавить в инкубационную смесь небольшое количество версена. Таким образом, было установлено, что процесс ренатурации и денатурации тРНК полностью обратим. В дальнейшем было показано, что добавленный магний не влиял на ренатурацию неактивной тРНК во время реакции аминоацилирования [3]. Ренатурированную тРНК можно снова подвергать быстрой денатурации, если ее выдержать с таким сильно хелатирующим агентом как версен. Ренатурация идет также в присутствии цитрата, который является слабым хелатирующим агентом, но менее быстро.

В лаборатории Фреско было установлено [3], что отсутствие акцепторной способности неактивных тРНК не обусловлено агрегацией молекул. На основании полученных данных Фреско с сотрудниками пришли к заключению, что один или несколько ионов

двухвалентных металлов являются интегральными компонентами активной формы молекул тРНК или, по крайней мере, тех молекул, которые способны обратимо переходить в неактивную форму. Фреско и сотр. [3] обнаружили у дрожжей всего четыре изоакцепторные лейциновые тРНК, одна из которых может переходить из активного состояния в неактивное, и наоборот. Работая с очищенной неактивной формой лейциновой тРНК₃, они заметили, что переход из одной формы в другую практически не зависит от концентрации тРНК.

Установлено, что коэффициент седиментации и характеристическая вязкость для нативной формы соответственно равны 4,5 S и 0,044 дЛ/г, а для денатурированной — 4,1 S и 0,059 дЛ/г. Рассчитанный на основании этих величин молекулярный вес обеих форм тРНК соответствовал 30 600 для денатурированной и 29 800 для нативной формы. Исходя из этих данных, авторы [3] сделали вывод, что нативная форма более компактна, чем денатурированная. Небольшие, но воспроизводимые различия обнаружены также в спектре ультрафиолетового поглощения и дисперсии оптического вращения между двумя формами тРНК₃^{Leu}. Однако различия эти были недостаточными для того, чтобы решить, за счет чего они возникают: являются ли они результатом более стабильных структурных изменений или обусловлены тем, что нативная форма имеет на два-три спаренных основания больше, чем денатурированная.

Изучена также специфичность других двухвалентных металлов в ренатурационном процессе при температуре 60°. Ионы Mg²⁺ при переводе неактивной тРНК₃^{Leu} в активную заменяли Mn²⁺, Ca²⁺, Co²⁺ и Zn²⁺, среди которых Mn²⁺ и Ca²⁺ более эффективны, чем Co²⁺ и Zn²⁺. Исследовали также полиамины: этилендиамин, пропандиамин, путресцин, спермидин и гистамин, которые в низких концентрациях давали положительный результат ренатурации неактивной тРНК₃^{Leu}. Такой же эффект вызывают одновалентные катионы Na⁺, K⁺, Li⁺, но в очень высоких концентрациях (около 1 M). Однако ни полиамины, ни одновалентные металлы не дают таких количественных изменений ренатурации неактивной тРНК, как двухвалентные катионы. Если проводить ренатурацию 1 M Na⁺, то всего лишь 25% переходит в активную форму тРНК, а 75% остается в неактивной.

Данные об активных и неактивных формах тРНК дали возможность Фреско и сотр. [1, 3] высказать предположение о существовании трех форм тРНК₃^{Leu}: нативной, денатурированной и нестабильной, у которых разный барьер энергии активации. При нейтральном pH, умеренной ионной силе и температуре нативная форма является стабильной в присутствии ионов магния, а денатурированная форма может быть «заморожена» на относительно длинный период времени, хотя в действительности она нестабильна и может быстро перейти в активную форму. При температуре

60° барьер энергии активации легко преодолим и переход из неактивной формы в активную происходит в течение 2 мин, однако при комнатной температуре, когда барьер энергии активации высок, такой переход растягивается до двух суток. В отсутствие ионов магния при низкой или умеренной ионной силе активная форма переходит в неактивную менее чем за минуту. Фреско и сотрудники пришли к мысли о том, что в условиях, приводящих к уменьшению барьера энергии перехода одного состояния тРНК в другое, некоторые другие тРНК могут вести себя, как и тРНК₃^{Leu}. С этой целью были выполнены следующие эксперименты. Суммарную тРНК растворяли в сильно разбавленном буфере, в котором отсутствовали Mg²⁺, охлаждали до 0° и исследовали акцепторные свойства по 17 аминокислотам при этой же температуре. Акцепторная способность по таким аминокислотам, как аланин, глутамин, лизин, серин и триптофан, полностью или частично отсутствовала. Однако после кратковременного прогревания в присутствии Mg²⁺ при 30° акцепторная способность, которую снова исследовали при 0°, восстанавливалась по всем аминокислотам. Обращает на себя внимание то обстоятельство, что в данных условиях эксперимента далеко не все тРНК переходили в неактивную форму.

Авторы работ [1, 3] изучали также способность ацилированной тРНК₃^{Leu} переносить аминокислоты в полипептидную цепь, используя бесклеточную систему Матеи и Ниренберга [7]. Они установили, что нативная тРНК переносит свою аминокислоту в полипептид, когда в качестве матрицы используется поли-УГ [1, 2], в то время как денатурированная ацилированная тРНК практически не функционировала в этой системе.

В последующей работе [8] были получены более точные сведения относительно адапторной функции неактивной тРНК₃^{Leu}. Аминоацилированная активная форма тРНК₃^{Leu} включала 47% лейцина, а неактивная — лишь 5—7%. Такой низкий уровень переноса лейцин-¹⁴C от аминоацил-тРНК в строящийся полипептид на матрице поли-УГ наблюдали при двух концентрациях Mg²⁺: 0,01 и 0,003 М. Авторы, однако, считают, что полученные результаты не исключают возможности считывания неактивной аминоацил-тРНК редко встречающихся кодонов. В этой же работе было показано, что тРНК₃^{Leu} в неактивной форме не является субстратом для лейциновой аминоацил-тРНК-синтетазы. Фермент не узнает неактивную форму тРНК. В то же время тРНК-нуклеотидилтрансфераза узнает неактивную форму тРНК₃^{Leu}, включая аденозин в концевое положение молекулы, однако фермент явно предпочитает нативную форму тРНК: в денатурированную тРНК включается всего лишь 0,4% концевого аденозина по сравнению с нативной тРНК.

Установлено, что денатурированная форма тРНК₃^{Leu} более

чувствительна к воздействию панкреатической рибонуклеазы, чем нативная [9]. Это свидетельствует о конформационном различии двух форм. Среди неактивных форм обнаружены также дрожжевые тРНК^{Сер} и тРНК^{Фен}, которые могут иметь две разные конформации [10, 11]. Указанные индивидуальные тРНК подвергали частичному Т₁-рибонуклеазному гидролизу с последующим электрофорезом гидролизатов в полиакриламидном геле. Авторы обнаружили, что денатурированная тРНК^{Сер}, в первую очередь, расщепляется по дополнительной S-петле, а тРНК^{Фен} — по дигидроуридиловой петле. Нативные формы этих тРНК не расщепляются Т₁-рибонуклеазой в данных участках, что указывает на их недоступность для нуклеазы вследствие разной пространственной конфигурации нативной и денатурированной форм тРНК.

Кроме упомянутых тРНК₃^{Лей} и тРНК₁^{Арг}, обнаруженных в неактивном состоянии у дрожжей при фракционировании тРНК методом противотоочного разделения, были выявлены также тРНК₁^{Мет} и тРНК^{Глу} в денатурированной форме, способные переходить в активную форму при прогревании в присутствии Mg²⁺ [12].

Таким образом, у дрожжей обнаружены следующие тРНК, обладающие способностью обратимо переходить в неактивную форму: лейциновая, метиониновая, аргининовая, глутаминовая, аланиновая, лизиновая, фенилаланиновая, сериновая и триптофановая [3, 10—12]. Следует подчеркнуть, что среди лейциновых, метиониновых и аргининовых тРНК переходят в неактивную форму лишь по одной тРНК: тРНК₃^{Лей}, тРНК^{Мет} и тРНК₁^{Арг}; остальные тРНК такими свойствами не обладают. Изоакцепторные тРНК других упомянутых выше тРНК не подвергались детальному изучению.

В лаборатории Фреско [13, 14] была изучена первичная структура тРНК₃^{Лей} дрожжей. Этот факт, несомненно, представляет особый интерес для дальнейшего исследования конкретной разницы в пространственной конфигурации активной и неактивной форм тРНК₃^{Лей}. Веб и Фреско [16] отметили, что у тРНК₃^{Лей} дигидроуридиловая и ТψУ петли имеют комплементарные последовательности с антикодоновой петлей. Авторы предположили, что антикодоновая петля денатурированной формы тРНК₃^{Лей} связана, возможно, водородными связями с комплементарной последовательностью ТψС-петли. Предположение нашло экспериментальное подтверждение [17] при анализе спектров ЯМР нативной и денатурированной тРНК₃^{Лей}, показавшем, что денатурированная форма не имеет структуры «клеверного листа».

Сравнение интенсивности резонансов нативной и денатурированной тРНК₃^{Лей} в области, где дают сигналы протоны спаренных оснований, показывает, что денатурированная форма имеет

18 спаренных оснований, а нативная — 22. Общее число пар нативной тРНК₃^{Лей} соответствует структуре, укладываемой в клеверный лист [18]. Вторичная структура тРНК₃^{Лей} предположительно выглядит так, как показано на рис. 10 [17]. В процессе ренатурации вторичная структура денатурированной тРНК₃^{Лей}

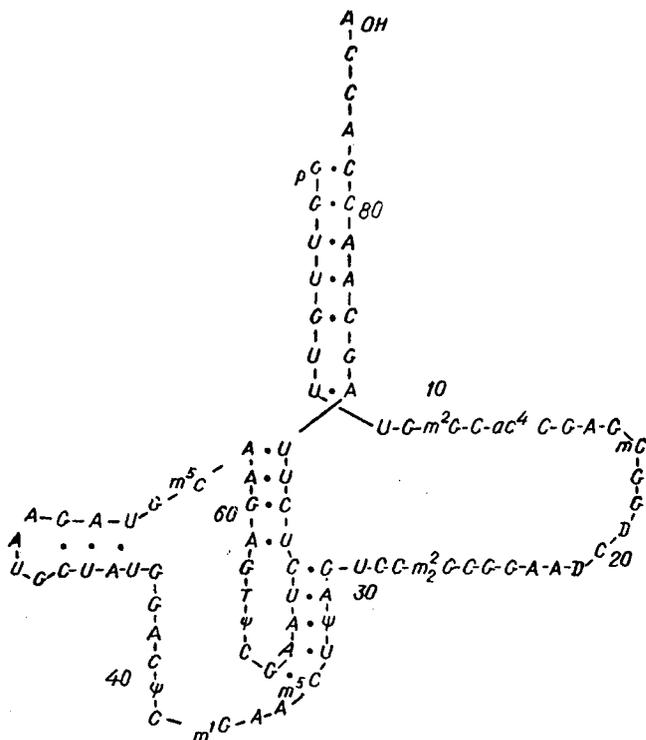


Рис. 10. Схема вторичной структуры денатурированной формы лейциновой тРНК из дрожжей.

изменяется, о чем можно судить по кинетике тритиевого обмена при переходе из одной формы в другую [16].

В лаборатории Суеoka изучали обнаруженную неактивную форму триптофановой тРНК *E. coli*. При фракционировании Три-тРНК на МАКе выявлены два пика изоакцепторных тРНК. Однако относительное количество этих двух тРНК^{Три} широко варьировало от препарата к препарату. Аномальное поведение тРНК^{Три} удалось объяснить существованием двух взаимопереходящих форм тРНК^{Три} — активной и неактивной [2, 15]. Среди других исследованных 11 аминоксил-тРНК: Ала-, Мет-, Фен-, Вал-, Тир-, Лей-, Иле-, Арг-, Сер-, Про- и Лиз-тРНК неактивных форм не было

обнаружено. Переход одной формы тРНК^{Три} в другую может быть вызван рядом факторов, независимо от того, находится ли тРНК в аминокислотированной или деаминоацилированной форме. Переход активной тРНК в неактивную может проходить в относительно мягких условиях, например в таких, как инкубация при нейтральном рН в отсутствие ионов магния. Превращение проходит приблизительно в течение 20 мин при температуре 37°. При этих же условиях остается всего лишь 10% активной формы. Активная форма стабильна в течение 20 мин при нейтральном рН в присутствии 5 мМ или 20 мМ магния. Переход активной формы в неактивную во время реакции аминокислотирования во многом зависит от концентрации ионов магния при 37°. Если эта реакция проходит в присутствии 2 мМ АТФ, то при хроматографии на МАКе можно обнаружить лишь активную форму. Однако с увеличением концентрации АТФ до 6 мМ основное количество тРНК^{Три} элюируется в неактивной форме. Суеока с сотрудниками предполагают, что это явление обусловлено хелатирующими свойствами АТФ, так как и другие нуклеотидтрифосфаты проявляют аналогичное действие.

Показано [2, 15], что проведение реакции аминокислотирования в присутствии 2 мМ АТФ при одновременном добавлении в реакционную смесь 4 мМ ЦТФ или ГТФ до обработки фенолом ведет к превращению основного количества тРНК^{Три} в неактивную форму. Добавление АТФ до концентрации 4 мМ образует примерно равное количество смеси активной и неактивной форм. В то же время добавление АМФ не оказывает никакого эффекта.

Обычный метод получения неактивной формы сводится к добавлению 4 мМ ЭДТА к реакционной смеси после 20-минутной реакции аминокислотирования тРНК^{Три} в присутствии 2 мМ АТФ. ЭДТА добавляется непосредственно перед фенольной депротенизацией. Этот метод, по данным Суеока и сотр. [2, 15], дает 90%-ный выход аминокислотированной неактивной тРНК^{Три}.

Неактивная форма тРНК^{Три} стабильна при нейтральном рН и 37° в отсутствие ионов магния. Активирование неактивной формы идет с незначительной скоростью. При 20-минутном суспендировании неактивной формы при нейтральном рН в присутствии 20 мМ магния, при 37° образуется только 20% активной формы тРНК. При других условиях активная форма полностью восстанавливается. Например, это можно наблюдать при диализе неактивной тРНК^{Три} против дистиллированной воды в течение 12 ч при 4° с последующим суспендированием в 0,05 М Na-фосфатном буфере, содержащем 0,35 М NaCl. Такой же переход в активную форму из неактивной происходит при инкубации тРНК при 37° в Na-ацетатном буфере (0,1 М, рН 3,5 и рН 4,1) с последующим суспендированием в фосфатном буфере. В последнем случае скорость перехода в активную форму очень высока. Выше отмечалось, что присутствие 5 мМ ионов магния в инкубационной среде для аминокислотирования тРНК крайне слабо способствует

восстановлению активной формы, однако встряхивание раствора с водонасыщенным фенолом вызывает полный переход неактивной формы дрожжевой триптофановой тРНК в активную [15].

Отмечено [2, 15], что неактивная форма тРНК^{Три} стабильна в дистиллированной воде при температуре 37° в течение короткого периода времени. Однако добавление к неактивной тРНК 5 мМ Mg²⁺ или 1 мМ путресцина после 20-минутной инкубации приводит к переходу неактивной тРНК в активную. Эта реакция, по-видимому, специфична, так как путресцин нельзя заменить 1,3-диаминопропаном, кадаверином или спермидином.

Различные условия, способствующие обратимому переходу активной тРНК^{Три} *E. coli* в неактивную, а также условия, стабилизирующие обе формы, представлены в суммированном виде [2]. Условия, способствующие переходу активной формы в неактивную: 1) 0,1 М Na-ацетатный буфер, рН 5,6 *; 2) 0,1 М Na-фосфатный буфер, рН 7,0 *. Условия, способствующие переходу неактивной формы в активную: 1) 0,1 М Na-ацетатный буфер, рН 4,1 или 3,5 *; 2) диализ против дистиллированной воды, 12 ч, 4°. Условия, стабилизирующие обе формы: 1) инкубационная смесь для аминокислотирования тРНК (0,1 М трис-НСl; 4,8×10⁻³ М Mg-ацетат; 4×10⁻³ М восстановленный глутатин; 2×10⁻³ М АТФ; 20 мин, 37°); 2) буфер для элюции с колонки МАК; 0,35—1,2 М NaCl в 0,5 М Na-фосфатном буфере, рН 6,7 24°; 3) 0,1 М Na-фосфатный буфер, рН 7,0, содержащий 0,02 М Mg-ацетат *; 4) среда для связывания тРНК рибосомами; 0,05 М трис-ацетатный буфер, рН 7,2; 0,05 М К-ацетат; 0,02 М Mg-ацетат; инкубация 15 мин, 24°.

При дальнейшем изучении влияния рН, Mg²⁺, ЭДТА и Na⁺ на акцепторную способность тРНК^{Три} *E. coli* [19] было показано, что длительная инкубация тРНК^{Три} (17 ч) при 27° разных значений рН оказывает неодинаковый эффект на обратимый переход из одной формы в другую. В то же время неактивная форма тРНК переходила в активную между значениями рН 3—5, но не выше. Максимальная акцепторная способность наблюдалась после инкубации при рН 3,5. Инкубация неактивной формы при рН 7,3 в течение 17 ч при 24° в присутствии ионов магния, превышающих концентрацию 0,001 М, повышала акцепторную способность триптофановой тРНК, как и инкубация с Na⁺, концентрация которого превышала 0,25 М.

Отмечено, что инкубация (рН 7,3) неактивной формы в присутствии ионов магния (0,01 М) в течение 5 мин не изменяет акцепторной способности тРНК^{Три} при повышении температуры до 35°. Резкий подъем акцепторных свойств тРНК наблюдался

* Условия инкубации: активную или неактивную тРНК^{Три} инкубировали в указанном буфере в течение 20 мин, затем буфер разводили в 20 объемах 0,35 М NaCl, содержащегося в 0,05 М Na-фосфатном буфере, рН 6,7, при температуре 10° и пропускали через колонку МАК.

между 35 и 50°. Наряду с этим, быструю потерю акцепторных свойств активной формы тРНК в присутствии ЭДТА (0,001 М) наблюдали между 30 и 45°. Этот факт, несомненно, свидетельствует о том, что ионы магния стабилизируют активную форму тРНК^{Три}. На акцепторные свойства неактивной формы тРНК в условиях любой температуры при инкубации в течение 5 мин 0,4 М Na⁺ не оказывает никакого действия.

Литературные данные, касающиеся превращения одних форм тРНК в другие под влиянием различных денатурирующих воздействий, требуют специального рассмотрения. Эта необходимость диктуется опасением некоторых исследователей, что обычные методы выделения тРНК из тканей могут приводить к образованию неактивных форм тРНК. Такое опасение возникло на основании экспериментальных данных, свидетельствующих, например, о том, что тРНК в растворе дистиллированной воды проявляет иногда небольшой гипохромизм [20]. Известно также, что тРНК при определенном тепловом воздействии может денатурироваться, однако после охлаждения полностью восстанавливает первоначальный гипохромизм, акцепторную и адапторную функции [21, 22]. Подобное явление наблюдается и после денатурирующего воздействия 8 М мочевины [19]. Серьезные опасения вызывает фенол, который, по данным Левина и соавт. [23], приводит к денатурации полинуклеотидов, образующих спиральную структуру. Таким образом, обычные препаративные методы выделения тРНК, включающие экстракцию водонасыщенным фенолом, диализ против дистиллированной воды или температурное воздействие могут, казалось бы, вести к денатурации молекулы тРНК, т. е. образованию ее биологически неактивной формы. Репутация фенола была спасена в специальном исследовании Суеока и сотр. [15], по данным которых встряхивание раствора неактивной формы тРНК^{Три} в водонасыщенном феноле приводит к полному восстановлению активности тРНК^{Три}. Следовательно, фенольная обработка не может разрушать вторичную или третичную структуру тРНК и, более того, способствует сохранению нативной структуры. В работе [15] показано, что диализ раствора тРНК^{Три} против дистиллированной воды и растворение этой тРНК в дистиллированной воде не приводят к образованию неактивной формы молекулы, а, наоборот, способствуют ренатурации неактивной формы.

Линдаль и Адамс [4] провели специальное исследование, в котором сравнили обычный фенольный метод выделения (с последующим диализом тРНК против дистиллированной воды) с методом, который не содержал в себе элементов выделения тРНК, приводящих к денатурации. Авторы попытались выделить препарат тРНК в условиях, сохраняющих, вероятно, ту макромолекулярную структуру, которая существует *in vivo*. Линдаль и Адамс пришли к заключению, что обычный фенольный метод выделения тРНК совершенно не влияет на образование неактив-

ных форм тРНК. Более того, анализ имеющихся литературных данных приводит к убеждению, что зафиксировать неактивные формы при выделении тРНК из клеток обычным методом с использованием фенольной депротеинизации более сложно, чем получить тРНК в активной форме.

Можно считать, что обнаружение неактивных форм тРНК является либо результатом их существования *in vivo*, либо они образуются вследствие каких-то воздействий, предшествующих выделению тРНК из клеток. Во всяком случае, обычные методы выделения не имеют, по всей вероятности, отношения к образованию биологически неактивных форм тРНК, если не считать тех специально подобранных условий, при которых можно получить неактивные формы тРНК из активных [2, 15]. В пользу данной точки зрения свидетельствует и тот факт, что тРНК в неактивной форме обнаружены в довольно ограниченном количестве только у дрожжей и бактерий, а у животных до настоящего времени не найдены, за исключением случаев, когда создавались особые условия [24, 32]. Несомненно, неактивные формы тРНК были бы давно обнаружены в препаратах животного происхождения, если бы этому способствовали обычные методы выделения, применяемые в равной мере для бактериальных, животных и растительных объектов в различных вариантах.

Разные профили элюции неактивной и активной аминокислотированных форм тРНК^{Три} на колонке МАК доказывают, что они конформационно отличны. В пользу этого свидетельствует также тот факт, что неактивная форма тРНК^{Три} теряет способность аминокислотироваться и деаминокислотироваться специфической аминокислот-тРНК-синтетазой в соответствующих условиях.

Аминокислот-тРНК при инкубации в присутствии фермента, избытка АМФ и пирофосфата обычно деаминокислотируется. Эта реакция была использована Гартландом и Суекой [2, 33] для определения степени сродства фермента к двум формам тРНК^{Три}. Триптофанил-тРНК в активной форме быстро деаминокислотировалась. Аминокислот-тРНК теряла приблизительно 75% тирозина за 2 мин. Неактивная форма за то же время теряла всего 20% аминокислоты. При неферментативном гидролизе потеря аминокислоты у обеих форм незначительна. Гартланд и Суека [2] считают, что 20%-ная потеря аминокислоты у неактивной формы тРНК^{Три} обусловлена ее загрязнением активной формой.

Обе формы тРНК^{Три} *E. coli* — активная и неактивная — поразному взаимодействуют с соответствующими искусственными матрицами и рибосомами. Установлено [34], что активная форма связывается с рибосомами в присутствии тринуклеотида УГГ и поли-УГ, но не с поли-АЦ. В то же время неактивная форма не взаимодействует с поли-УГ, но реагирует с поли-АЦ в присутствии и в отсутствие рибосом при pH 7,2. Неактивная форма, связанная с поли-АЦ, в отсутствие рибосом может быть разобщена с полимером при pH среды 7,8. Авторы показали, что неактивная

форма прочно связывается с рибосомами в отсутствие матрицы при значениях рН 7,2 и 7,8. Активная форма включает аминокислоту в полипептиды *in vitro* в присутствии поли-УГ, а неактивная форма не выполняет своей функции ни с поли-УГ, ни с поли-АЦ в оптимальных условиях связывания с рибосомами. Таким образом, неактивная форма тРНК^{Три} *E. coli* фактически является биологически инертной и конформационно отличной от активной формы.

Ишида и Суюэка [35] на основании проведенных исследований по плавлению очищенной тРНК^{Три} *E. coli* в разных условиях пришли к заключению, что при переходе из одной формы в другую затрагивается вторичная структура тРНК. Они предполагают, что активная форма тРНК отличается от неактивной приблизительно пятью спаренными основаниями. Такое заключение следует также из данных о том, что переход в активную форму происходит при температуре 50°, когда частично затрагивается и вторичная структура тРНК. Свободная энергия при переходе в неактивную, денатурированную форму тРНК уменьшается с понижением концентрации катионов и повышением температуры [36]. Изменение энтальпии и энтропии денатурации и активации для двух состояний тРНК имеют положительный знак, что, вероятно, также свидетельствует [36] об изменении структуры второго порядка при переходе одной формы тРНК в другую.

Неактивная форма тРНК^{Три} *E. coli* в свободном и аминокислотированном состоянии была открыта Мюнчем [37, 38]. Полученные результаты полностью совпали с данными Суюэка и сотрудников, приведенными выше. Было показано, что хлорохин может изменять конфигурацию неактивной тРНК^{Три}, превращая ее в активную форму [37, 38]. Мюнч и Софилд [39] установили, что все пять тРНК^{Три}, обнаруженные у *E. coli*, могут существовать в активной и неактивной конформациях. Другие тРНК клеток *E. coli* в неактивной форме авторами не обнаружены.

В условиях ферментативного аминокислотирования триптофановые тРНК *E. coli* могут переходить из неактивной формы в активную. Однако этот переход осуществляется с незначительной скоростью: 10% за 30 мин. Добавление хлорохина ведет к почти мгновенному переходу из неактивной в активную форму. Интересно, что аминокислотированная тРНК^{Три} переходит из неактивного в активное состояние в присутствии 10⁻³ М ЭДТА и фенола при 23°. Это лишний раз свидетельствует о том, что фенол не оказывает денатурирующего действия на тРНК. Мюнч и соавт. [40] показали, что некоторые аналоги 4-аминохинолина: йодированный и бромированный хлорохин, аминоксидиахин, 7-хлоро-4-аминохинолин и многие другие действуют аналогично хлорохину. Аналоги триптофана — триптамин и серотонин — при концентрации, в 10 раз превышающей оптимальную концентрацию хлорохина, также активируют тРНК^{Три}. Одновременно с этим установлено, что такие соединения, как путресцин, кадаверин, спермин, спер-

мидин, профлавин и хинокрин не способны переводить неактивную тРНК^{Три} *E. coli* в активную форму. Как показали спектрофотометрические измерения [40], очищенная тРНК^{Три} и суммарная тРНК из *E. coli* характеризуются одинаковым числом мест связывания хлорохина на молекулу.

Суеока с сотрудниками в работах [2, 19, 36, 41] высказывают предположение, что ионы магния не являются интегральной частью молекулы тРНК, как считают Фреско и сотр. [1, 3]. Такое предположение вытекает из сравнительного изучения влияния ионов двух- и одновалентных металлов на процесс взаимного перехода активной формы тРНК^{Три} в неактивную. Прежде всего, было отмечено, что низкие концентрации моновалентных катионов (Li^+ , Na^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ , NH_4 и *трис*, 0,1—0,4 М) способствуют сохранению неактивной денатурированной формы тРНК^{Три} и ингибируют образование активной формы в присутствии ионов магния. В то же время двухвалентные катионы (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Cu^{2+}) в концентрации 1—4 мМ способствуют образованию активной формы и тормозят образование неактивной тРНК^{Три} низкими концентрациями моновалентных катионов. Некоторые диамины (этилендиамин, 1,3-пропандиамин) также образуют активную форму из неактивной. Высокие концентрации (1—2 М) моновалентных катионов (за исключением триса) способствовали образованию активной формы. Переход одной формы тРНК в другую определяли по максимальной акцепторной активности тРНК после прогревания при температуре 50° в течение 10 мин в присутствии 10 мМ Mg-ацетата [36, 41].

Как известно, полинуклеотиды РНК и ДНК являются анионными полиэлектролитами в пределах рН 5—9 [12, 42, 43]. На отталкивание заряженных фосфатных групп двойной спирали ДНК сильное действие оказывают катионы при ионной силе ниже 0,1, в то время как на отталкивание зарядов в одноцепочечной ДНК катионы действуют даже при ионной силе, которая выше 0,1 [44, 45].

Поскольку тРНК имеет спаренные или неспаренные основания, отталкивание заряженных фосфатных групп может быть крайне чувствительным к солевой концентрации, ионная сила которой выше и ниже 0,1. Следовательно, часть молекулы тРНК, имеющая спаренные участки, должна стабилизироваться катионами, взаимодействующими таким же образом, как это имеет место с синтетическими полинуклеотидами [45, 46] и ДНК [47, 49]. Поэтому двухвалентные катионы более эффективны для стабилизации двойной спирали ДНК, чем одновалентные [48, 49]. Ишида и Суеока [35] на основании полученных данных считают, что первичным фактором в конформационном изменении тРНК является уменьшение отталкивания между отрицательно заряженными фосфатными группами, что достигается катионами. Низкие концентрации моновалентных катионов закрывают отрицательные заряды фосфатных групп тРНК^{Три} и уменьшают отталкива-

ние, что приводит к связыванию фосфатных остатков таким образом, что неактивная форма тРНК может существовать в метастабильном конформационном состоянии. Дальнейшее уменьшение отталкивания отрицательных фосфатных групп с помощью увеличения концентрации моновалентных катионов приводит к стабильной конформации, которой обладает активная форма тРНК. Двухвалентные катионы могут связывать фосфатные группы активной формы тРНК более упорядоченно, чем моновалентные катионы. Однако, по мнению Ишида и Суюэка [35], двухвалентные катионы больше стабилизируют ионную атмосферу, а не связываются с определенными участками молекулы тРНК, как предполагают Линдаль и соавт. [1]. Такая точка зрения помогает авторам объяснить, почему стабилизация активной формы ионами магния конкурентно ингибируется адекватной концентрацией моновалентных катионов, а стабилизация активной формы моновалентных катионов тРНК^{Три} зависит не от соотношения Mg^{2+} и тРНК, а от пропорции Mg^{2+} и Na^+ (или триса) в растворе.

Высокая температура лишь ускоряет процесс перехода неактивной тРНК в активную [1]. Однако, как отмечают Ишида и Суюэка [19], в опытах с прогреванием тРНК нельзя было полностью выяснить роль ионов магния хотя бы потому, что тестом на переход одной формы тРНК в другую служило определение способности этих тРНК акцептировать аминокислоту в присутствии ионов магния. Авторы попытались обойти это затруднение, используя хроматографию на МАКе. Неактивную форму тРНК^{Три} прогревали в 1—2 М NaCl в отсутствие двухвалентных катионов, а затем фракционировали на указанной колонке, которая четко разделяет две формы тРНК [19, 41]. Прогревание неактивной тРНК при высоких концентрациях NaCl привело к ее переходу в активную форму. На основании этого факта было сделано заключение, что ионы магния не являются абсолютно необходимыми для стабилизации биологически активной конформации тРНК^{Три} [41].

Таким образом, авторы [19, 41] попытались подтвердить свою идею о том, что роль ионов в основном сводится к стабилизации ионной атмосферы, в которой существует определенная форма тРНК. По-видимому, этот вывод недостаточно обоснован, так как для образования активной структуры тРНК^{Три} в условиях ренатурации нужны совершенно разные концентрации ионов двух- и моновалентных катионов: 0,02 М Mg^{2+} и 2 М Na^+ , которые неадекватны по ионной силе. В настоящее время известно, что молекулы тРНК имеют определенные участки сильного и слабого связывания двухвалентных ионов [50, 52]. Прочносвязанные ионы двухвалентных металлов в специфичных участках тРНК имеют существенное значение для формирования определенной конформации молекулы тРНК. Так, изучая комплексообразование тРНК с ионами марганца методами протонной магнитной

релаксации и электронного парамагнитного резонанса (ЭПР), Беккер и Молин [50] показали, что существует два типа комплексов ионов марганца с тРНК, различающихся константами устойчивости и релаксационными характеристиками. Прочные комплексы, по мнению авторов, образуют нуклеотиды, которые не связаны водородными связями, возможно, образующими с ионами марганца хелатные комплексы. Такой вид комплексообразования назван авторами первым местом координации Mn^{2+} на тРНК. Второму месту координации соответствуют фосфатные группы спирализованных участков, образующие непрочные комплексы с Mn^{2+} . Беккер и Молин установили, что ионы магния полностью вытесняют ионы марганца из комплексов с тРНК. Этот факт особенно интересен, так как дает возможность считать, что ионы магния имеют большее сродство к молекуле тРНК, чем ионы Mn^{2+} , и что ионы магния связываются с азотистыми основаниями тРНК, образуя прочные комплексы.

Кон и соавт. [51], исследуя комплексообразование тРНК с ионами марганца методом протонной магнитной релаксации, установили, что молекулы тРНК имеют примерно шесть-семь участков сильного связывания Mn^{2+} или 0,08 участка на одну фосфатную группу. В то же время количество участков слабого связывания составляет приблизительно 0,22 участка на одну фосфатную группу или 17—18 участков на всю молекулу. Показано, что нефракционированная тРНК *E. coli* и очищенная тРНК ^{32}P *E. coli* обладают одготипными участками связывания.

Другие исследователи [52] с помощью метода ЭПР получили совпадающие результаты. В ходе определения установлено, что нефракционированные тРНК *E. coli* содержат 10 сильных участков связывания ионов марганца и 21 участок слабого связывания. Минимальное расстояние между участками сильного связывания равно, по данным авторов [52], 15 Å, из чего следует, что эти участки не соприкасаются друг с другом.

Исходя из экспериментальных результатов Мелика и соавт. [53], можно заключить, что антикодоновый участок фенилаланиновой тРНК дрожжей, включающий додекануклеотид с флуоресцирующим основанием Y, содержит один участок сильного связывания ионов магния и много участков слабого связывания. Полученные данные [53] свидетельствуют о решающей роли основания Y в поддержании «стекинга» между нуклеотидами антикодоновой области. Ионная сила магния при этом оказывает стабилизирующий эффект.

Таким образом, существует достаточно оснований считать, что двухвалентные катионы постоянно связаны с молекулой тРНК. Если учесть, что комплексы двухвалентных катионов тРНК в участках сильного связывания имеют значения констант устойчивости и релаксационные характеристики, близкие к соответствующим значениям для комплекса хелатного типа АТФ— Mn^{2+}

[50, 54], то можно предположить, что двухвалентные катионы, в частности Mg^{2+} , образуют хелатные мостики между отдельными участками молекулы тРНК [52]. Это обстоятельство может быть существенным для стабилизации структуры тРНК в активной форме.

Следует отметить, что существование специфических участков связывания двухвалентных катионов на молекуле тРНК ничего не говорит о том, на каком уровне возможна стабилизация: на уровне вторичной или третичной структуры молекулы. Однако некоторые исследователи считают, что двухвалентные катионы, фиксированные в участках сильного связывания, ответственны за стабилизацию третичной, а не вторичной структуры [51, 52], предполагая, что эти катионы не участвуют в процессе перехода активной формы тРНК в неактивную. Такое независимое положение двухвалентных катионов трудно себе представить при изменении конформации молекулы тРНК в процессе превращения одной формы в другую. Если обратимый переход активной формы тРНК в неактивную захватывает в определенной степени и вторичную структуру, то прежде всего должна изменяться третичная структура и нарушаться те связи, которые ее стабилизируют [3]. В настоящее время нет никаких оснований отбросить предположение о том, что двухвалентные катионы, локализованные в участках сильного связывания, оказывают влияние на стабилизацию биологически активной формы тРНК.

Ривс и сопр. [55] считают, что вторичная структура тРНК занимает ведущее место в образовании биологически активной молекулы тРНК. В ходе изучения влияния ионов магния на конформацию двух высокоочищенных изоакцепторных аланиновых тРНК дрожжей — $tRNA_{1}^{Ala}$ и $tRNA_{2}^{Ala}$ — эти исследователи сравнивали кривые плавления спектров ультрафиолетового поглощения, спектров циркулярного дихроизма, гидродинамические свойства (гельфильтрация и ультрацентрифугирование) и обратимый переход этих тРНК из активной в неактивную форму в присутствии и в отсутствие ионов магния.

Наблюдения показали, что $tRNA_{1}^{Ala}$ и $tRNA_{2}^{Ala}$ имеют очень сходную структуру. Обе тРНК в отсутствие ионов магния содержат до 66% спаренных оснований. Добавление Mg^{2+} приводило к одинаковым конформационным изменениям, включающим увеличение спаренных оснований на 33% и уменьшение объема молекулы. Несмотря на указанное сходство, $tRNA_{1}^{Ala}$ и $tRNA_{2}^{Ala}$ отличались спектрами циркулярного дихроизма и ультрафиолетового поглощения, а также денатурационными свойствами. Акцепторная способность $tRNA_{1}^{Ala}$ почти полностью исчезала после добавления Mg^{2+} к «безмагниевому» раствору тРНК при 0° , однако $tRNA_{2}^{Ala}$ при обработке в аналогичных условиях не теряла акцепторных свойств. Денатурированная

(неактивная) тРНК^{Ала}₁ восстанавливала 80% активности при повышении температуры до 37° в присутствии ионов магния. Авторы [55] объясняют описанное явление следующим образом: для создания биологически активной конформации тРНК при добавлении Mg²⁺ необходимо, чтобы прежде всего образовалась определенная вторичная структура клеверного листа молекулы тРНК до процесса укладки в третичную структуру. Если процесс укладки в третичную структуру происходит с какой-либо другой, предварительно образовавшейся, вторичной структурой тРНК, то формируется неактивная форма тРНК.

Таким образом, обратимый процесс перехода тРНК из активной в неактивную форму, по мнению Ривса и сотр. [55], зависит прежде всего от изменений во вторичной структуре, а третичная структура исполняет лишь подсобную роль. Авторы, правда, делают оговорку, что конформацию тРНК^{Ала}₁ и тРНК^{Ала}₂ в отсутствие ионов магния нельзя уподобить денатурированной, неактивной форме тРНК^{Лей}₃, которую описали Фреско и сотр. [8]. Утверждение сделано на основании того, что в отсутствие ионов магния тРНК^{Ала} дрожжей, изучаемые Ривсом и сотр. [55], содержат меньше спаренных оснований, чем неактивная дрожжевая тРНК^{Лей}₃. При этом, однако, не учитывается то обстоятельство, что такое различие может быть результатом разной первичной структуры индивидуальных тРНК.

Ривс и сотр. [55] на основании полученных результатов подчеркивают, что третичная структура молекулы не имеет значения для акцепторной способности тРНК. Третичная структура, по их предположению, лишь стабилизирует ту часть молекулы, которая ответственна за акцепторные свойства тРНК. Такая точка зрения вряд ли выдерживает критику, так как, с одной стороны, цитируемые авторы отвергают необходимость третичной структуры для акцепторной функции тРНК, а с другой, — отводят третичной структуре второстепенную роль стабилизатора части молекулы тРНК, ответственной за акцептирование аминокислот. Третичная структура в этом случае может иметь решающее значение для акцепторной функции тРНК, так как, очевидно, акцепторная способность тРНК не проявляется без стабилизации третичной структуры.

Механизм конформационного обратимого перехода тРНК^{Ала}₁, предложенный Ривсом и сотр. [55], находится в некотором несоответствии с данными других исследователей, которые показали, что небольшие изменения в третичной структуре тРНК являются существенной помехой при взаимодействии с активирующим ферментом (К, Ф. 6.1.1) [56]. При исследовании зависимости акцепторных свойств тРНК^{Лей} *E. coli* от температуры в перекрестной системе с термостабильной лейцил-тРНК-синтетазой из *Vac. stearothermophilus* было показано, что акцепторная способность начинает снижаться с увеличением гиперхроизма нефрак-

ционированной тРНК всего на 2—3%. Результаты, полученные Хенли и соавт. [57]), а также Сариним и соавт. [58], свидетельствуют о том, что некоторые физико-химические свойства тРНК изменяются между 20 и 40°. Это изменение в основном гидродинамического характера, так как изменения ультрафиолетового поглощения в этом температурном интервале малы. Данные исследования свидетельствуют в пользу того, что нарушения третичной структуры при тепловой денатурации большинства тРНК наступают в температурном промежутке 20—40°. Известно, что вторичная структура начинает плавиться при температуре выше 40° [57]. В отдельных случаях третичная и вторичная структуры изменяются одновременно. Данные цитируемых авторов согласуются с результатами Крамера и соотр. [59], показавших, что третичная структура тРНК^{Сер} дрожжей при тепловой денатурации начинает изменяться в температурном интервале 37—40°. В то же время тРНК^{Фен} дрожжей довольно стабильна к тепловому воздействию. Вторичная и третичная структуры этой тРНК плавятся при температуре выше 60°.

Рейснер и соотр. [60], изучая конформационные переходы в дрожжевой тРНК^{Фен} при тепловой денатурации, показали, что плавление тРНК происходит стадийно. Вначале разрушается третичная структура тРНК и молекула приобретает структуру «клеверного листа», а затем происходит плавление акцепторной и антикодонной шпилек. Отмечено, что рибозилтимидиновая и гидроуридилловая петли диссоциируют независимо. По-видимому, тепловая денатурация тРНК проходит неодинаково для всех тРНК в пределах низких температур (до 40—50°). Если учесть, что неактивная форма тРНК^{Ала} дрожжей может переходить в активную при 25° [8], то выводы Ривса и соотр. [55] выглядят довольно необоснованно. Крамер и соавт. [59] считают, что жесткая третичная структура необходима для узнавания фермента и, следовательно, для акцепторной функции тРНК. Рейснер и соотр. [61] и Ромер и соотр. [62], исследуя структурные переходы очищенных препаратов дрожжевой тРНК^{Ала} спектрофотометрическим методом, установили, что при плавлении тРНК^{Ала} существует четыре конформационных перехода, которые наблюдаются в пределах 30—70°. Изменение скорости седиментации при различных температурах показало, что третичная структура тРНК заметно меняется лишь при 55°. Следовательно, прогревание тРНК^{Ала} при температуре 37° в присутствии Mg²⁺, которое проводили Ривс и соотр. [55], возможно, не затрагивает вторичной структуры.

Суеока и соотр. [63] провели широкое исследование с целью обнаружения неактивных тРНК у *E. coli*, специфичных не только к триптофану, но и к остальным девятнадцати аминокислотам. Помимо *E. coli* был исследован ряд других бактерий, у которых авторы пытались обнаружить триптофановые тРНК в неактивной форме. Препараты тРНК выделяли из клеток, находящихся

в логарифмической фазе роста. В этом исследовании были проверены данные Фреско и сотр. [3], которые показали, что у *E. coli* помимо тРНК^{Три} существует тРНК в неактивной форме, специфичные к глутамину, гистидину, глутаминовой кислоте и, возможно, лейцину. Было установлено [63], что тРНК, специфичные для глутамина и лейцина, не обнаруживаются в неактивной форме. Триптофановая тРНК в двух формах, помимо *E. coli*, обнаружена также у *Salmonella typhimurium*, *Shigella dysenteriae*, *Aerobacter aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*. В то же время у *B. cereus*, *B. subtilis*, *Serratia mancegensis* и *Micrococcus lysodeicticus* тРНК^{Три} существует только в активной форме.

Более тщательные исследования биологически неактивных тРНК [64] показали, что денатурированные формы молекул можно обнаружить у всех изученных тРНК из *E. coli* В, если аминокислотирование проводить при низких температурах. При этом обнаружено, что оптимальная концентрация магния при ренатурации тРНК различна для отдельных специфических тРНК. В некоторых случаях после ренатурации индивидуальных тРНК удалось получить максимальную акцепторную активность при низких концентрациях магния. Это обстоятельство дало Б. Белчеву [64] основание предположить, что присутствие ионов магния при реакциях аминокислотирования более необходимо для поддержания определенной структуры тРНК, чем для действия аминокислот-синтетаз.

В настоящее время практически ничего не известно о механизме появления в клетке биологически неактивных форм тРНК, хотя некоторые попытки изучить этот процесс были предприняты. На основании экспериментальных данных высказано предположение, что денатурированные формы тРНК, возможно, являются предшественниками нативных тРНК. Так, Бардон [63] в ходе изучения возможных предшественников тРНК в опухолевых клетках Кребс-2, применяя импульсную метку ³Н и ¹⁴С, показал, что такие «предшественники», по-видимому, могут появляться в цитоплазме [66]. Они элюируются с колонки (сефадекс Г-100) между 5 S- и 4 S-молекулами. На основании этого было высказано предположение, что «предшественники» имеют более развернутую структуру, чем нативные тРНК [67], что свидетельствует о возможной структурной связи с биологически неактивными тРНК, у которых структура более развернута и, вероятно, более асимметрична [1, 2]. Как отмечалось выше, превращение неактивной формы в активную достигается прогреванием тРНК при 60° в присутствии Mg²⁺. Бардон использовал это для сравнения «предшественников» тРНК с неактивной формой тРНК [65]. Вначале импульсно меченную цитоплазматическую РНК фракционировали на колонке с сефадексом Г-100. Радиоактивность распределялась между фракциями, которые соответствовали рибосомальной РНК, 5 S- и 4 S-компоненту РНК. Между 5 S- и 4 S-компонентами элюировался радиоактивный пик, соответству-

ющий «предшественнику» тРНК с относительно высокой радиоактивностью. Однако после прогревания тРНК в присутствии 20 мМ $MgCl_2$ радиоактивность элюируемой фракции «предшественника» тРНК сдвигалась в сторону 4 S-компонента и почти совпадала с ним. Положение остальных фракций не изменялось. Данные о влиянии прогревания в присутствии ионов магния на совпадение пиков четвертого компонента и «предшественника» тРНК при элюции с колонки дали Бардону возможность сделать предположение о том, что неактивная форма тРНК представляет собой некий «полуфабрикат», из которого образуется функционирующая молекула тРНК в опухолевых клетках Кребс-2. Следует, однако, иметь в виду, что в работе Бардона нет доказательств того, что в клетках Кребс-2 существуют биологически неактивные тРНК. Акцепторная функция «предшественника» тРНК не проверялась ни до, ни после прогревания. Наблюдаемое при элюции смещение фракции предшественника тРНК в сторону 4 S-компонента после прогревания не может быть принято как серьезное доказательство в пользу истинного присутствия биологически неактивной формы тРНК. Нельзя исключить того, что «предшественник» тРНК может каким-то образом менять свою структуру после прогревания, а это, в свою очередь, может приводить к смещению пика при хроматографии. Предшественники тРНК, как известно, содержат больше нуклеотидов, чем нативная молекула [68, 70]. В то же время биологически неактивная форма тРНК отличается от активной в своей пространственной структуре, что и лишает ее акцепторной способности.

Уже отмечалось, что тРНК в биологически неактивной форме не были найдены у животных, находящихся в нормальном физиологическом состоянии. Однако неактивные формы тРНК можно обнаружить у животных после определенного периода полного голодания. Показано, что после десятидневного голодания кроликов и трехдневного голодания крыс и морских свинок, суммарная тРНК, выделенная из печени, значительно ниже акцептирует тирозин, глицин, метионин, лейцин, аланин, серин, лизин и фенилаланин. В то же время прогревание тРНК тканей голодавших животных в присутствии ионов двухвалентных металлов в условиях, описанных Линделем и соавт. [1], повышает акцепторные свойства этих тРНК [24—32]. Аналогичные результаты были получены на тРНК мозга животных (по метионину) [71]. Прогревание тРНК тканей нормальных животных в этих же условиях не влияет на ее акцепторные свойства [24]. Исследования показали, что тРНК животных после указанного периода голодания не теряет своей нативности [29, 30]. Следует отметить, что прогревание препаратов тРНК голодавших животных без добавления ионов двухвалентных металлов (с последующим быстрым охлаждением) не приводит к увеличению акцепторной способности, равно как и добавление двухвалентных металлов без прогревания [24, 25].

Установлено, что переход биологически неактивных форм тРНК животных в активные происходит в узком температурном интервале — между 30 и 40°. Кривая перехода имеет S-образную форму, что свидетельствует о кооперативном характере структурной перестройки молекул тРНК (рис. 11). Энергия активации этого перехода составляет примерно 30 000 кал на 1 моль тРНК. Описанные условия перехода в активную форму характерны для тирозиновой, метиониновой, глициновой, лейциновой и лизиновой тРНК (рис. 11). Максимальная температура перехода достигает лишь 40°. В этих температурных пределах, как известно [57, 59], происходят изменения в основном на уровне третичной структуры. Можно считать, что это относится и к конформационным изменениям тРНК голодавших животных.

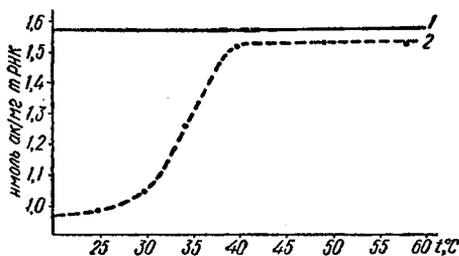


Рис. 11. Зависимость уровня аминокислотирования тРНК от температуры прогрева тРНК нормальных (1) и голодавших (2) животных по тирозину, метионину и лизину.

Биологически неактивные формы тРНК обнаружены также у 3—4-недельных крыс [28, 30]. Из четырех тРНК — тирозиновой, лизиновой, метиониновой и сериновой — в составе суммарного препарата первые три обнаружены в биологически неактивной форме.

Необходимость ионов двухвалентных металлов для ренатурации биологически неактивных форм тРНК бактерий, дрожжей и животных приводит к логическому заключению, что устранение этих металлов из нормально функционирующих молекул тРНК должно вести к появлению денатурированных форм тРНК. Экспериментальные исследования в этом направлении впервые были предприняты Ишида и Суюока [36] на коммерческой тРНК *E. coli* В. Авторы получили так называемую безмагниевою тРНК при прогревании препарата, растворенного в 50 мМ трис-НСI буфере (рН 7,5), содержащем 2 мМ ЭДТА при 50° в течение 10 мин с последующим диализом этого раствора. После описанной обработки суммарная тРНК значительно снижала способность акцептировать триптофан. Однако последующее прогревание этой тРНК при 50° в течение 10 мин в присутствии 10 мМ ацетата магния восстанавливало утраченную акцепторную активность. Таким образом, обратная трансформация активной формы тРНК в неактивную оценивалась лишь по ее акцепторным свойствам до и после обработки версеном. Ишида и Суюока [36] считают, что изменение акцепторных свойств тРНК после прогревания с Mg^{2+} является вполне удовлетворительным тестом на присутствие денатурированных форм тРНК. При соблюдении чи-

стоты и нативности тРНК, а также при отсутствии димеров такой тест вполне достаточен, так как при описанных условиях прогревания увеличение акцепторных свойств тРНК возможно только в случае перехода неактивной формы в активную. Аналогичные результаты были получены на тРНК животных [24, 32]. Устранение двухвалентных металлов приводит к снижению акцепторных свойств тРНК нормальных животных и не изменяет и без того низкую акцепторную активность тРНК голодавших животных. Однако если обе тРНК (активную и неактивную), обработанные версеном, прогреть в присутствии ионов магния, наблюдается восстановление их акцепторных свойств.

Необходимость присутствия ионов металлов при переходе неактивных тРНК в активные, а также данные о влиянии ЭДТА на акцепторные свойства функционирующей тРНК ведут к логическому выводу о том, что содержание ионов магния тРНК должно коррелировать с состоянием, в котором находится молекула. Можно было предположить, что биологически неактивные тРНК содержат меньше двухвалентных катионов по сравнению с контрольными препаратами, вследствие чего осуществляется переход в неактивную форму. Такая же ситуация возникает и в случае с тРНК, обработанной версеном. Определение содержания одно- и двухвалентных катионов в биологически активных и неактивных препаратах тРНК животных проведено на тРНК животного происхождения [31, 71] с использованием химического [72] и спектрографического [73] методов. Оба метода дали совпадающие результаты. Однако полученные данные о содержании ионов магния в неактивной тРНК голодавших животных не совпали с предположением, высказанным выше. Транспортная тРНК голодавших животных (табл. 5) содержит в два раза больше магния, чем тРНК нормальных. Такие результаты были получены для тРНК кроликов, крыс и морских свинок [31, 71]. Для объяснения этих данных интересно было знать, как меняется содержание ионов магния в ткани печени голодавших животных. Исследования показали, что содержание ионов магния в печени при применяемых сроках полного голодания животных не изменялось [67]. На основании полученных результатов можно предположить, что при голодании вначале магний устраняется из молекулы тРНК и она переходит в денатурированную форму. По-видимому, ионы магния, количественно не уменьшаясь в клетке, перераспределяются при разрушении ткани. В процессе выделения препаратов тРНК голодавших животных, имеющая, по-видимому, более развернутую структуру, связывает магний в количестве, которое существенно выше, чем у тРНК нормальных животных. Таким образом, высокое содержание магния в выделенных препаратах тРНК голодавших животных, вероятно, является следствием предварительной денатурации молекул.

Факты о содержании магния в тРНК и в печени животных могут иметь и другое толкование, так как для полного ответа на

Таблица 5
Спектральный анализ препаратов тРНК печени нормальных и голодавших кроликов, % к 10 мкг сухого веса тРНК

Препарат	Mg ¹	Mn	Ca	Cu	Fe	Al	Ti	Si	Ni	Cr	Mo
тРНК печени нормальных животных	0,1	0,001	0,03	0,0004	0,001	0,003	0,003	0,03	—	следы	0,0001
тРНК печени голодавших животных	0,3	0,003	0,1	0,0005	0,001	0,003	0,003	0,05	0,001	0,003	—

Таблица 6
Акцепторная способность тРНК печени животных до и после обработки периодатом натрия с последующим прогреванием, амоль аминокислоты/мг тРНК

Вид тРНК	Аминокислота	До обработки		После обработки	
		до прогревания	после прогревания	до прогревания	после прогревания
тРНК печени нормальных животных	¹⁴ C-лизин	0,51 ± 0,01 (6)*	0,48 ± 0,01 (3)	0,21 ± 0,02 (6)	0,20 ± 0,02 (3)
	¹⁴ C-метионин	0,87 ± 0,05 (6)		0,33 ± 0,04 (6)	
	¹⁴ C-лизин	0,25 ± 0,03 (6)	0,54 ± 0,04 (4)	0,12 ± 0,01 (6)	0,12 ± 0,02 (4)
тРНК печени голодавших животных	¹⁴ C-метионин	0,37 ± 0,03 (7)		0,18 ± 0,02 (6)	

* Здесь и в табл. 7—10 в скобках указано число определений.

вопрос необходимы специальные исследования, проливающие свет хотя бы на локализацию ионов магния в клетке при исследуемых состояниях организма. Приведенные данные не дают основания считать, что структура тРНК, обработанной ЭДТА, и структура неактивных тРНК животных полностью идентичны. Биологически активная и неактивная тРНК животных, обработанные ЭДТА и пропущенные через колонку с сефадексом Г-50, не содержат ионов магния. Однако после прогревания такой тРНК с Mg^{2+} содержание последнего в обоих препаратах, во-первых, ниже, чем до обработки ЭДТА, во-вторых, тРНК голодавших животных снова содержит в два раза больше магния по сравнению с нормой [74].

Интересно отметить и то обстоятельство, что избыточные ионы магния, очевидно, фиксируются на молекуле тРНК голодавших животных в участках слабого связывания [50, 51]. Такое заключение следует из того факта, что содержание магния в тРНК нормальных и голодавших животных изменяется по-разному после 48-часового диализа этих препаратов против 0,005 М ЭДТА с несколькими сменами воды. При указанных условиях диализа тРНК голодавших животных в значительной степени обедняется магнием, тогда как содержание магния в тРНК нормальных животных не изменяется.

Обращает на себя внимание также и тот факт, что почти удвоенное содержание магния в неактивных тРНК животных по сравнению с активными не играет никакой роли при переходе денатурированной формы в ренатурированную в ходе прогревания тРНК, если не добавлять ионы магния [24, 25]. Это вполне понятно, так как содержание магния в неактивных тРНК животных не оптимально для перехода в активную форму. Как отмечено выше, переход из одной формы в другую осуществляется при концентрации 20 мМ Mg^{2+} на 1 мг тРНК. В то же время концентрация магния, связанного с неактивной тРНК, составляет всего лишь 0,16 мкМ на 1 мг тРНК.

Исходя из того, что для рекогниции, вероятно, необходима жесткая или, точнее, определенная геометрия третичной структуры [59], можно думать, что эта жесткость (определенность), в первую очередь, должна соблюдаться для функциональных участков тРНК. По-видимому, понятие жесткости третичной структуры относительно, так как она, очевидно, стабильна лишь в определенных условиях. В зависимости от ионной силы, тРНК, вероятно, может существовать в нескольких конформациях, переходящих друг в друга, о чем сообщили Оплеби и соавт. [75] и Гольдштейн и соавт. [76].

При средней ионной силе (0,1 М) существует набор конформаций тРНК, которые по скорости обмена и числу медленно обменивающихся водородов совпадают со структурой «клеверного листа». Предполагается, что для всех тРНК существует «фазовая диаграмма» перехода конформаций, как функция соле-

вой концентрации. Очевидно, магний, входящий в структуру тРНК, и ионная сила среды [2, 15] являются теми факторами, которые существенно влияют на формирование пространственной конфигурации тРНК. Количество ионов магния, связанных с тРНК, может в определенной степени характеризовать конформационное состояние тРНК. Вероятно, это зависит от локализации и степени конформационных изменений тРНК.

О содержании ионов магния в неактивных формах тРНК дрожжей и бактерий сообщений нет. По-видимому, такие определения вообще не проводились. В то же время высокое содержание магния у неактивных тРНК животных, очевидно, отображает более развернутую структуру неактивных тРНК. Полученные данные согласуются с выводами Сандера и Тео [77], которые отмечают, что конформация нуклеиновых кислот является важным условием для связывания ионов магния. Виллик и соавт. [78] показали, что у разных индивидуальных тРНК добавление Mg^{2+} по-разному влияет на форму участка молекулы, в котором находится 4-тиоурацил. Авторы считают, что добавление к молекуле тРНК Mg^{2+} вызывает специфический конформационный переход. Предполагая, что молекулы могут находиться только в двух состояниях, Виллик и соавт. рассчитали, что для конформационного превращения требуется связывание трех ионов магния. По-видимому, не все ионы магния, фиксированные на молекуле тРНК, вносят равноценный вклад в образование пространственной геометрии нативной тРНК. Как отмечено выше, магний тРНК голодавших кроликов легко устраняется при 48-часовом диализе против 0,005 М ЭДТА, тогда как содержание магния в тРНК нормальных животных при этих условиях не изменяется. Это дает основание считать, что в первом случае магний в основном фиксирован в участках слабого, а во втором — в участках сильного связывания. Вероятно, в формировании конформации нативных тРНК участвуют ионы магния, фиксированные в участках сильного связывания.

По-видимому, из трех катионов — Mg^{2+} , Mn^{2+} и Ca^{2+} — магний наиболее предпочтителен для структуры тРНК [50, 52], хотя все три катиона взаимозаменяемы в условиях перехода неактивной формы в активную [3, 74].

Следует, однако, отметить, что эффективность связывания двухвалентных катионов препаратами тРНК может быть различной в участках сильного и слабого связывания. Данчин [79] с помощью равновесного диализа ЭПР и ЯМР показал, что тРНК кооперативно связывает двухвалентные катионы при очень низких концентрациях. Была определена зависимость числа участков связывания от температуры и константы связывания. Природа ионов по-разному влияла на связывание с тРНК в зависимости от участка молекулы. Для кооперативного процесса, когда двухвалентные катионы присоединялись к сильным участкам

связывания, зависимость была такой: $>Co^{2+} > Mg^{2+} > Mn^{2+}$, а для участков слабого связывания — $>Mn^{2+} > Co^{2+} > Mg^{2+}$.

Ионы двухвалентных металлов играют, по-видимому, определенную роль не только в фиксации третичной структуры тРНК [51, 52]. Они, вероятно, могут индуцировать конформационные изменения некоторых тРНК в биологически активную форму главным образом за счет образования третичной структуры [80].

ОБРАЗОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ НЕАКТИВНЫХ тРНК

В литературе, посвященной изучению биологически неактивных форм тРНК, до последнего времени не было сведений о проведении исследований, которые бы однозначно доказывали существование неактивных форм тРНК непосредственно в клетках. Первым доказательством такого рода следует, очевидно, считать работы Ковальского и соавт. [14] и Чанга и соавт. [81], в которых дана расшифрованная первичная структура дрожжевой тРНК^{Leu}₃, способной к ренатурации. Первичная структура тРНК^{Leu}₃, установленная в лаборатории Фреско, существенно отличалась от той, которую расшифровали Чанг и соавторы. Оказалось, что в дрожжах имеется два типа тРНК^{Leu}₃, из которых вторая тРНК^{Leu}₃, обнаруженная Чангом и соавт. [81], является, по их мнению, предшественником тРНК, описанной Фреско. Четкие различия, обнаруженные в нуклеотидной последовательности этих двух тРНК^{Leu}₃, являются одновременно доказательством и того, что тРНК^{Leu}₃, способная к денатурации, существует в дрожжах и не может возникнуть в процессе выделения или каких-либо других воздействий. Вопрос о существовании биологически неактивных тРНК непосредственно в тканях был подробно изучен на животных, которых подвергали предварительному голоданию [31, 74].

Авторы [82—85] исходили из предположения, что присутствие денатурированных форм тРНК в тканях должно прежде всего отразиться на степени аминоацилирования тРНК *in vivo*, если принять во внимание, что при голодании концентрация свободных аминокислот в общем не претерпевает существенных изменений. Уровень аминоацилирования тотальной тРНК печени голодавших животных *in vivo* определяли методом Алена и соавт. [86]. Суть метода заключается в том, что большую часть аминоацил-тРНК можно выделить в том количестве, в котором они образовались в тканях, применяя для экстракции фенол с низкими значениями pH. После этого полученные препараты, представляющие собой смесь свободных и аминоацилированных тРНК, обрабатывали периодатом натрия. Периодат натрия, как известно, атакует в тРНК концевую рибозу по месту двух соседних гидроксильных групп. Дальнейшее деаминоацилирование и последующая нагрузка аминокислотой дают возможность судить об

уровне аминокцилирования данной тРНК в клетке. Результаты проведенных опытов (табл. 6) показали, что уровень аминокцилирования окисленной и неокисленной периодатом тРНК голодавших животных значительно ниже уровня аминокцилирования тРНК нормальных животных.

Полученные данные, разумеется, не являются однозначным свидетельством того, что *in vivo* тРНК голодавших животных находится в неактивной форме. Однако при рассмотрении этих результатов в совокупности с другими они могут быть приняты в качестве одного из подтверждений существования денатурированных тРНК. Исходя из того что тотальная тРНК при голодании неполностью теряет свои акцепторные свойства, можно сделать предположение, что эта тРНК представляет собой смесь биологически активной и неактивной тРНК. При такой ситуации в ткани печени неактивные тРНК не должны акцептировать аминокислоты и ОН-группы акцепторного конца молекул должны быть свободными. Следовательно, при обработке тотальной тРНК периодатом ОН-группы всех неактивных тРНК должны окисляться. В результате этого последующее прогревание тРНК голодавших животных в присутствии ионов магния не должно приводить к повышению акцепторных свойств. Из табл. 6 видно, что обработанные периодатом натрия тРНК печени нормальных и голодавших животных после прогревания не повысили своих акцепторных свойств. В то же время тРНК голодавших кроликов, не обработанные периодатом натрия, восстановили свою акцепторную активность.

Полученные данные, вероятно, не свободны от критических замечаний и могут быть интерпретированы несколько иначе, так как нельзя полностью исключить влияние окисления периодатом на процесс восстановления акцепторной активности тРНК при прогревании. Это опасение стимулировало проведение новых серий опытов, направленных на выяснение поставленного вопроса. Животным вводили радиоактивные аминокислоты (метионин-³⁵S и глицин-¹⁴C) из расчета 20 000 *имп* на 1 г живого веса за 30 мин до забоя. Аминокцил-тРНК получали по методу Алена и соавт. [86] при многократном переосаждении спиртом для освобождения от радиоактивных примесей. После деаминокцилирования полученные препараты тРНК были нерадиоактивными, что свидетельствовало о том, что введенные за 30 мин аминокислоты не вносили метку в нуклеиновую кислоту и радиоактивность аминокцил-тРНК обуславливалась лишь аминокислотами. Проведенные исследования свидетельствуют, что в печени голодавших животных аминокцилирование тРНК проходит значительно слабее, чем у нормальных животных (табл. 7). В то же время выделенные препараты содержат неактивные формы тРНК, так как после деаминокцилирования и последующего прогревания акцепторная активность тРНК голодавших животных возрастала, а тРНК нормальных — не изменялась (табл. 8). Следова-

тельно, *in vivo* аминоацилировались только активные тРНК и аминоацилирование не было максимальным из-за присутствия денатурированных тРНК.

Таблица 7

Радиоактивность аминоацил-тРНК печени нормальных и голодавших крыс после введения животным меченых аминокислот

Вид тРНК	Аминокислота	тРНК, имп/мин на 1 мг
тРНК печени нормальных крыс	¹⁴ C-глицин	1350 ± 70 (4)
	³⁵ S-метионин	620 ± 30 (4)
тРНК печени голодавших крыс	¹⁴ C-глицин	650 ± 27 (4)
	³⁵ S-метионин	340 ± 37 (4)

Таблица 8

Акцепторная активность тРНК печени крыс после деаминоацилирования аминоацил-тРНК, синтезированных *in vivo*, и последующего прогревания с Mg²⁺, нмоль аминокислоты на 1 мг тРНК

Аминокислота	тРНК нормальных животных		тРНК голодавших животных	
	до прогревания	после прогревания	до прогревания	после прогревания
³⁵ S метионин	0,73 ± 0,12 (3)	0,74 ± 0,10 (3)	0,35 ± 0,06 (3)	0,78 ± 0,1 (3)
¹⁴ C-тирозин	0,64 ± 0,11 (3)	0,62 ± 0,11 (3)	0,30 ± 0,06 (3)	0,54 ± 0,07 (3)

Полученные результаты не исчерпывают всех возможных доказательств образования биологически неактивных тРНК непосредственно в клетках организма. Однако, если это действительно так, то следовало бы ожидать, что смешивание ткани печени нормальных и голодавших животных в разных соотношениях должно приводить к соответствующему усреднению акцепторной активности выделяемого препарата тРНК в равной мере, как и смешивание самих препаратов. Постановка опыта была следующей. У нормального и подопытного животного брали половину печени (по весу) и из каждой половины выделяли тРНК. Оставшиеся части ткани смешивали, выделяли тРНК и определяли акцепторные свойства. Транспортные РНК, полученные отдельно из печени нормальных и голодавших животных, смешивали в разных соотношениях, а затем определяли акцепторные свойства. Результаты показали, что чем больше тРНК голодавших животных находится в смеси, тем ниже ее акцепторные свойства. Аналогичные данные были получены при смешивании ткани печени нормальных и голодавших животных (табл. 9).

К этому следует добавить, что акцепторные свойства тРНК животных утрачиваются постепенно в соответствии со степенью

Акцепторная активность тРНК после предварительного смешивания ткани выделенных препаратов тРНК, нмоль лизина на 1 мг тРНК

тРНК объединенного гомогената печени нормальных и голодавших животных	тРНК нормальных животных	тРНК голодавших животных
0,40 ± 0,018 (6)	0,70 ± 0,02 (6)	0,33 ± 0,02 (6)

голодания. Известно, что центральная нервная система, в особенности головной мозг, при голодании страдает в последнюю очередь. И тем не менее тРНК мозга голодавших кроликов также могут находиться в биологически неактивной форме [71] (табл. 10), что наводит на мысль о том, что при голодании биологически неактивные тРНК образуются во всех тканях.

Совокупность приведенных данных позволяет заключить, что биологически неактивные тРНК образуются в тканях животных при голодании и не являются артефактом.

Очевидно, что биологически неактивные тРНК дрожжей [3] и бактерий [15] также образуются *in vivo*. Это обстоятельство вызывает вопрос о том, как появляются неактивные тРНК и каков биологический смысл их возникновения в клетке. Следует отметить, что вопрос о существовании неактивных тРНК в клетках дрожжей и бактерий никто серьезно не исследовал. Было лишь показано, что рутинные методы фенольно-водной экстракции не вызывают денатурации нативных тРНК [4]. Некоторые авторы тем не менее без достаточных оснований считают, что неактивные формы появляются именно в процессе выделения тРНК из клеток. Так, Хирш [87], исследуя нуклеотидную последовательность тРНК^{Три} из *E. coli* CA244 и супрессорного штамма CA164, обнаружил, что тРНК^{Три} из штамма SU⁻ находится в денатурированном виде, а из штамма SU⁺ — в нативной форме. Денатурированная тРНК после прогревания с ионами магния в 4—5 раз увеличивала акцепторную активность по триптофану. Несмотря на одинаковый метод получения обеих тРНК, автор считает, что неактивная тРНК образуется в процессе выделения. Возникает вопрос, почему тот же метод выделения не приводит к денатурации тРНК из клеток штамма SU⁺. Между тем тРНК одного штамма отличается от тРНК другого не только способностью к обратимой денатурации, но также и первичной структурой. Разницу составляет одно основание в положении 24 дигидроуридиловой петли: Г в штамме CA244 и А в штамме CA164. Таким образом, есть больше оснований объяснить появление тРНК^{Три} в денатурированной форме не «процессом выделения», а самой структурой этой тРНК, предопределяющей способность к денатурации.

Однако другие исследователи, изучая обратимую денатурацию тРНК из двух штаммов *E. coli* — CA244 и CA164 [88], не рассматривают метод выделения тРНК^{Три} как причину образования

Таблица 9

печени нормальных и голодавших животных и после смешивания отдельно

тРНК, норма 50%; тРНК, голод 50%	тРНК, норма 25%; тРНК, голод 75%	тРНК, норма 75%; тРНК, голод 25%
0,49 ± 0,03 (6)	0,37 ± 0,02 (6)	0,55 ± 0,02 (6)

денатурированной формы, а считают тРНК^{Три} из штамма SU мутантной.

Уже упоминавшиеся исследования Ишида и соавт. [63] и Белчева [64] свидетельствуют о том, что процесс выделения тРНК из клеток нескольких видов бактерий не имеет отношения к образованию неактивных тРНК, хотя авторы и не обсуждают этого вопроса.

Кларксон и Руннер [89] считают, что неактивные тРНК существуют *in vivo*. Они используют этот постулат как одно из объяснений наблюдаемого увеличения акцепторных свойств тРНК^{Фен} клеток HeLa, возникающего после инфицирования вирусом. Авторы высказывают предположение, что вирусная инфекция может индуцировать активацию неактивных форм тРНК в клетках.

Таблица 10

Аминоацилирование тРНК мозга нормальных и голодавших кроликов до и после прогревания в присутствии ионов магния, *n*моль метионина-¹⁴С на 1 мг тРНК

тРНК мозга кроликов в норме		тРНК мозга кроликов при голодании	
до прогревания	после прогревания	до прогревания	после прогревания
1,3 ± 0,2 (4)	1,2 ± 0,15 (4)	0,6 ± 0,07 (4)	1,1 ± 0,15 (4)

Причины появления биологически неактивных тРНК в клетках одноклеточных организмов и в тканях животных не ясны. По-видимому, неактивные тРНК бактерий и дрожжей и неактивные тРНК животных неодинаковы по глубине конформационных изменений. Интервал температуры, в пределах которого происходит увеличение акцепторных свойств тРНК голодавших животных, лежит между 35—40° (см. рис. 11) [31]. В то же время неактивные тРНК бактерий и дрожжей [1—3] в одних случаях переходят в активную форму при 25° [8], а в других — при 60° [2]. Этот факт, по-видимому, однозначно свидетельствует о том, что в одних случаях происходят изменения на уровне главным образом

третичной структуры, а в других — в значительной степени затрагивается вторичная структура тРНК. Как указывалось, вторичная структура в основном начинает плавиться при температуре выше 40° [57, 59].

Важным условием перехода одной формы тРНК животных в другую является значение рН, при котором прогревают неактивные тРНК в присутствии Mg^{2+} . Такой переход *in vitro* возможен только при рН 8. Это объясняет, почему при физиологических температурах не происходит перехода одной формы тРНК в другую при инкубации в пробирке при других значениях рН.

Образование неактивной формы тРНК *in vivo*, несомненно, оказывает влияние на интенсивность биосинтеза белка. Голодание, очевидно, является сильным экстремальным состоянием организма, при котором большинство тРНК могут появляться в неактивном состоянии. При этом причин образования неактивных тРНК может быть, по крайней мере, две. Денатурированные тРНК образуются либо вследствие устранения ионов магния из нативных тРНК, либо при голодании формирование многих тРНК не доводится до окончательной пространственно завершенной структуры. При голодании появление неактивных тРНК в клетках животных приводит, по-видимому, к снижению интенсивности биосинтеза белка, что позволяет организму экономно расходовать аминокислоты на строительство белков. В то же время свободные аминокислоты, образующиеся за счет распада белков организма, могут быть использованы как энергетическое сырье, дефицит которого при голодании составляет главную проблему. Следовательно, появление неактивных форм тРНК можно рассматривать как один из механизмов адаптации организма к условиям голодания. В присутствии неактивных форм тРНК процессы биосинтеза белка как бы переключаются на режим экономии в условиях максимального использования имеющихся ресурсов для обеспечения жизнедеятельности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lindahl T., Adams A., Fresco J. Renaturation of tRNA through site binding of magnesium.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1966, 55, 941.
2. Gartland W., Sueoka N. Two interconvertible forms of tryptophanyl sRNA in *E. coli*.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1966, 55, 948.
3. Fresco J., Adams A., Ascione R., Henley D., Lindahl T. Tertiary structure in tRNA.— Cold Spring Harbor Symp. Quon. Biol., 1966, 31, 527.
4. Lindahl T., Adams A. Native and renatured tRNA.— Science, 1966, 152, 512.
5. Кочетков Н. К.— В кн.: Органическая химия нуклеиновых кислот. М., «Химия», 1970, 296.
6. Киселев Л. Л.— В кн.: Молекулярные основы биосинтеза белка. М., «Наука», 1971, 180.
7. Matthaei J., Nirenberg M. Characteristic and stabilization of DNA-case-sensitive protein synthetase in *E. coli* extracts.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1961, 47, 1580.

8. Lindahl T., Adams A., Geroch M., Fresco J. Selective recognition of the native conformation of tRNA by enzymes.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1967, 57, 178.
9. Adams A., Lindahl T., Fresco J.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1967, 57, 1684.
10. Adams A., Zachau H. Serine specific tRNA. Some properties of the aggregates from serine specific tRNA.— Europ. J. Biochem., 1968, 5, 558.
11. Streck R., Zachau H. Conformational differences between the native and denaturated forms of tRNA^{Ser} and tRNA^{Phe} from yeast.— FEBS Lett., 1971, 13, 329.
12. Lindahl T., Adams A., Fresco J. Isolation of «renaturable» tRNA.— J. Biol. Chem., 1967, 242, 3129.
13. Kovalski S., Fresco J. Preparation of highly labeled (P³²) nucleic acid from yeast isolation of «denaturable» leucine acceptor tRNA.— Science, 1971, 172, 384.
14. Kovalski S., Yamane T., Fresco J. Nucleotide sequence of the «denaturable» leucine tRNA from yeast.— Science, 1972, 172, 385.
15. Sueoka N., Kano-Sueoka T., Gartland W. Modification of sRNA and regulation of protein synthesis.— Cold Spring Harbor Symp. Quon. Biol., 1966, 31, 571.
16. Webb P., Fresco J. Tritium exchange studies of tRNA in native and denaturated conformations.— J. Mol. Biol., 1973, 74, 387.
17. Kearns D., Wong Y., Hawkins E., Chang S. Model for the secondary structure of the denaturated conformer of yeast tRNA₃^{Leu}.— Nature, 1974, 247, 541.
18. Wong Y., Kearns D., Shulman R., Yamane T., Chang S., Chirakjan J., Fresco J. High resolution nuclear magnetic resonance study of base pairing in the native and denaturated of tRNA.— J. Mol. Biol., 1973, 74, 403.
19. Ishida T., Sueoka N. Reorganization of the secondary structure of tryptophan sRNA in *E. coli*.— Proc. Nat. Acad. Sc. USA, 1967, 58, 1080.
20. Tissieres A. Some preparations of soluble RNA from *E. coli*.— Science, 1960, 1, 365.
21. Berg P. Specificity in protein synthesis.— Ann. Rev. Biochem., 1961, 30, 293.
22. Takanami M., Okamoto T., Watanabe I. Effect of urea and heat treatments on the activity of sRNA.— J. Mol. Biol., 1961, 3, 476.
23. Levine L., Gordon J., Jencks W. Relationship of structure to the effectiveness of denaturing agents for DNA.— Biochemistry, 1967, 2, 168.
24. Мацука Г. Х., Бабий Т. П., Сквирская Э. Б., Коваленко М. И., Семенихин В. И. О возможности существования в тканях животных разных конформационных форм тРНК, отличающихся способностью акцептировать аминокислоты.— Укр. біохім. журн., 1970, 42, 24.
25. Мацука Г. Х., Бабий Т. П., Сквирская Э. Б., Коваленко М. И., Ельская А. В., Недовесова З. П., Овчаренко Г. В. Функциональные и структурные особенности тРНК в биосинтезе белка при некоторых физиологических состояниях.— Укр. біохім. журн., 1970, 42, 217.
26. Овчаренко Г. В., Бабий Т. П., Мацука Г. Х. Влияние голодания на содержание аминоксил-тРНК в печени кроликов.— Укр. біохім. журн., 1971, 43, 708.
27. Мацука Г. Х., Семенихин В. И., Бердинских Н. К., Козак В. В., Хоменко А. К. Воздействие голодания на биологическую активность суммарной тРНК печени крыс и морских свинок.— Укр. біохім. журн., 1971, 43, 629.
28. Мацука Г. Х., Сквирская Э. Б., Бабий Т. П., Батурина И. Д., Позднякова Т. М., Хоменко А. К. Акцепторная активность тРНК при голодании.— Укр. біохім. журн., 1968, 40, 115.
29. Мацука Г. Х., Бабий Т. П., Сквирская Э. Б., Коваленко М. И. Некоторые данные об изменении способности тРНК печени кро-

- ликов акцептировать аминокислоты при голодании.— Укр. біохім. журн., 1969, 41, 665.
30. Мацука Г. Х., Полякова Л. Л., Сквирская Э. Б., Сухинин В. Биологически неактивное тРНК печени молодых крыс.— Укр. біохім. журн., 1972, 44, 217.
 31. Мацука Г. Х., Бабий Т. П., Сквирская Э. Б., Овчаренко Г. В., Семенихин В. И. Биологически неактивные тРНК печени животных.— Биохимия, 1973, 38, 1221.
 32. Бабий Т. П., Овчаренко Г. В., Сквирская Э. Б., Мацука Г. Х. Влияние содержания магния в препаратах тРНК на их акцепторную способность.— Укр. біохім. журн., 1972, 44, 320.
 33. Berg P., Bergman F., Ofengand E., Dieckmann M. The mechanism of leucyl-valyl-isoleucyl-, and methionyl-RNA formation.— J. Biol. Chem., 1961, 236, 1726.
 34. Gartland W., Ishida T., Sueoka N., Nirenberg M. Coding properties of two conformations of triptophanyl-tRNA in *E. coli*.— J. Mol. Biol., 1969, 44, 403.
 35. Ishida T., Sueoka N. The use of conformational changes to purify tryptophan tRNA from *E. coli*.— Biochim. Biophys. Acta, 1970, 217, 209.
 36. Ishida T., Sueoka N. Effect of ambient conditions on conformations of tRNA^{Trp} of *E. coli*.— J. Biol. Chem., 1968, 243, 5329.
 37. Muench K. Chloroquine and synthesis of aminoacyl-tRNA. Conformational changes in tryptophanyl and tryptophan tRNA.— Biochemistry, 1969, 8, 4880.
 38. Muench K. Chloroquine-mediated conversion of tRNA of *E. coli* from an inactive to an active state.— Cold Spring Harbor Symp. Quon. Biol., 1966, 31, 539.
 39. Muench K., Saffille A. tRNA in *E. coli*. Multiplicity and variation.— Biochemistry, 1968, 7, 2799.
 40. Muench K., Deldin M., Pita J. Effect of chloroquine and ribonucleic acids.— In: Progr. Molec. and Subcell. Biol., 2, Berlin, 1971, 103.
 41. Ishida T., Sueoka N. Elimination of magnesium ions as an absolute requirement for the native conformation of tryptophan tRNA.— J. Mol. Biol., 1968, 37, 313.
 42. Josse J., Eigner J. Physical properties of DNA.— Ann. Rev. Biochem., 1966, 35, 789.
 43. Studier F. Sedimentation studies of the size and shape of DNA.— J. Mol. Biol., 1965, 11, 373.
 44. Eigner J., Doty P. The native denaturated and renaturated yeast of DNA.— J. Mol. Biol., 1965, 12, 549.
 45. Inman R., Baldwin R. Helix-random coil transition in synthetic DNA of altering sequence.— J. Mol. Biol., 1962, 5, 172.
 46. Riley M., Maling B., Chamberlin M. Physical and chemical characterization of two and three stranded A-taud A-U Homopolymers complexes.— J. Mol. Biol., 1966, 20, 359.
 47. Marmur J., Doty P. Determination of the base composition of DNA from thermal denaturation temperature.— J. Mol. Biol., 1962, 5, 109.
 48. Mehrotra B., Mahler H. The effect of diamines on helical polynucleotides.— Biochim. Biophys. Acta, 1964, 91, 78.
 49. Lyons J., Kotin L. The effect of magnesium ion on the secondary structure of DNA.— J. Amer. Chem. Soc., 1965, 87, 1781.
 50. Беккер Ж. М., Молин Ю. Н. Изучение комплексообразования тРНК с ионами Mg²⁺ радиоспектроскопическими методами.— Мол. биол., 1969, 3, 3.
 51. Cohn M., Danchin A., Grunberg-Manago M. Proton magnetic relaxation studies of manganous complexes of tRNA and related compound.— J. Mol. Biol., 1969, 39, 199.
 52. Danchin A., Gueron M. Comparative binding of manganese to tRNA.— Europ. J. Biochem., 1970, 16, 532.

53. Maelicka A., Haar F., Gramer F. Spectroscopic properties of oligonucleotides excised from the anticodon region of phenylalanine tRNA from yeast.— *Biopolymers*, 1973, 12, 27.
54. Phillips R. Adenosine and adenine nucleotides. Ionization metal complex formation and conformation in solution.— *Chem. Rev.*, 1966, 66, 501.
55. Reeves R., Cantor C., Chambers R. Effect magnesium ions on the conformation of two highly purified yeast alanine tRNA.— *Biochemistry*, 1970, 9, 3993.
56. Lurquin P. The effect of heart on the interactions between leu-tRNA-synthetases and tRNA's.— *Experientia*, 27, 131, 1971.
57. Henly D., Lindahl T., Fresco J. Hydrodynamic changes accompanying the thermal denaturation of tRNA.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1966, 55, 191.
58. Sarin P., Zamecnik P., Berquist P., Scott J. Conformational differences among purified samples of tRNA from yeast.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1966, 55, 579.
59. Cramer F., Deopner H., Haar F., Schimme E., Seidel H. On the conformation of tRNA.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1968, 61, 1384.
60. Reisner D., Maass G., Reiner T., Peter P., Hans Z. The conformational transitions in yeast tRNA^{Phe} as studied with tRNA^{Phe} fragments.— *Europ. J. Biochem.*, 1973, 36, 76.
61. Reisner D., Römer R., Maass G. Thermodynamic properties of the three conformational transitions of alanine specific tRNA from yeast.— *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1969, 35, 369.
62. Römer R., Reisner D., Coutts S., Masse G. The coupling of conformational transitions in alanine specific tRNA from yeast studies by a modified differential absorption technique.— *Europ. J. Biochem.*, 1970, 15, 77.
63. Ishida T., Snyder D., Sueoka N. The interconvertibility of various bacterial tRNA between an active and inactive stable conformation.— *J. Biol. Chem.*, 1971, 246, 5965.
64. Белчев Б. Разлики в условията за ренатуриране и натоварване на специфични тРНК от *E. coli* В.— *Изв. Ин-та биохимия Бълг. АН*, 1973, 4, 81.
65. Burdon R. Molecular configuration of cytoplasmic tRNA precursor.— *J. Mol. Biol.*, 1967, 30, 571.
66. Lal B., Burdon R. Maturation of low molecular weight tRNA in tumor cells.— *Nature*, 1967, 213, 1134.
67. Burdon R., Martin B., Lal B. Synthesis of low molecular weight RNA in tumor cells.— *J. Mol. Biol.*, 1967, 28, 357.
68. Bernhardt D., Darnel J. tRNA synthesis in Hela cells: a precursor to tRNA and the effect of methionine starvation on tRNA synthesis.— *J. Mol. Biol.*, 1969, 42, 43.
69. Kay J., Cooper H. Rapidly labeled cytoplasmic RNA in normal and phytohaemagglutinin-stimulated human lymphocytes.— *Biochim. Biophys. Acta*, 1969, 186, 62.
70. Mowshowitz D. Formation of tRNA from a precursor in vitro and formation of pseudouridine.— *J. Mol. Biol.*, 1970, 50, 143.
71. Семенихин В. И. Сравнительное изучение функциональных свойств тРНК при голодании животных. Автореф. канд. дис. Киев, 1972.
72. Индиченко Л. Н. Спектральный анализ минеральных веществ. М., 1960.
73. Orange M., Rein H. Microestimation of magnesium in body fluids.— *J. Biol. Chem.*, 1951, 189, 379.
74. Овчаренко Г. В. Изучение биологически активных и неактивных тРНК печени кроликов. Автореф. канд. дис. Киев, 1972.
75. Appleby D., Goldstein R., Kallenbach N. Dependence of denaturation temperature and structural parameters on salt concentration.— *In: Biophys. Soc. Program. and Abstr. 15th Ann. Meet. New Orleans, New York*, 1971, 17.

76. Goldstein R., Stefanovic S., Kallenbach N. On the conformation of tRNA in solution: dependence of denaturation temperature and structural parameters of mixed and *E. coli* tRNA_{F^{Met}} on sodium ion concentration.— *J. Mol. Biol.*, 1972, **69**, 217.
77. Sander C., Ts'o P. Binding of magnesium ions by nucleic acid.— *J. Mol. Biol.*, 1971, **55**, 1.
78. Willick C., Kay C. Magnesium-induced conformational change in tRNA as measured by circular dichroism.— *Biochemistry*, 1971, **10**, 2216.
79. Danchin A. tRNA structure and binding sites for cations.— *Biopolymers*, 1972, **11**, 1317.
80. Robinson B., Zimmerman T. Cation dependence of the transfer reaction catalyzed by phenylalanyl transfer ribonucleic acid synthetase from Baker's yeast.— *J. Biol. Chem.*, 1971, **246**, 4664.
81. Chang S., Miller N., Harmon C. Nucleotide sequence of «renaturable» leucine tRNA.— *FEBS Lett.*, 1971, **17**, 265.
82. Schurr P., Thompson H., Henderson L., Williams J., Elvenjem C. The determination of free amino acid in rat tissues.— *J. Biol. Chem.*, 1950, **182**, 39.
83. Thompson H., Schurr P., Henderson L., Elvenjem C. The influence of fasting and nitrogen deprivation on the concentration of free amino acids in rat tissues.— *J. Biol. Chem.*, 1950, **182**, 47.
84. Williamson D., Lopees-Viera O. Concentration of free glucogenic amino acid in liver of rats subjected to various metabolic stresses.— *Biochem. J.*, 1967, **104**, 497.
85. Burns L., Meghal S., Koeppe R. The effect of fasting and several hyperglycemic agents on the free amino acids of rat liver.— *Life Sci.*, 1970, **9**, 1045.
86. Allen R., Raines P., Regen D. Measurements of charging levels in livers of chow-fed rats, fasting rats, and rats fed balanced of imbalanced mixture of amino acids.— *Biochim. Biophys. Acta*, 1969, **190**, 323.
87. Hirsh D. Tryptophan tRNA as the UGA suppressor.— *J. Mol. Biol.*, 1971, **58**, 439.
88. Buckingham R., Danchin A., Grunberg-Manago M. Denaturation of UGA suppressor tRNA^{TRP} from *E. coli*.— *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1974, **56**, 1.
89. Clarkson S., Runner M. Transfer RNA changes in HeLa cells after vaccinia virus infection.— *Biochim. Biophys. Acta*, 1971, **238**, 498.

Глава 5

КОНФОРМАЦИОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ тРНК, НЕ ВЛИЯЮЩИЕ НА ЕЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

Наблюдения, проведенные из фенилаланиновых тРНК, показали, что они могут изменять свою конформацию под влиянием ионов магния и других катионов. Однако наблюдаемые конформационные сдвиги, по-видимому, в этом случае не связаны с переходом тРНК в биологически неактивную форму. Конформационные изменения такого рода представляют интерес потому, что они происходят под влиянием Mg^{2+} и носят локальный характер. Было обнаружено, что фенилаланиновая тРНК дрожжей, проростков пшеницы, печени быка и печени крысы [1—4] содержит сильно флуоресцирующее основание У. Природа этого основания была установлена Наканиши и сотр. [5] и подтверждена другими авторами [6]. Этот необычный нуклеотид расположен в 3'-положении относительно антикодона фенилаланиновой тРНК дрожжей [7] и проростков пшеницы [8]. Основание У настолько типично для тРНК^{Фен}, что для количественного определения фенилаланиновой тРНК было предложено измерение интенсивности флуоресценции. Оказалось, однако, что интенсивность флуоресценции зависит от конформации тРНК^{Фен}, которая изменяется при определенных концентрациях Mg^{2+} . Таким образом, флуоресценция стала своеобразным тестом на конформационные изменения фенилаланиновой тРНК, выделенной из разных источников. Так, Циммерман и соавт. [9], работая с очищенной тРНК^{Фен} печени быка, наблюдали четырехкратное увеличение интенсивности флуоресценции после добавления низких концентраций ионов магния (0,3—1,0 М). Интересно, что высокие концентрации NaCl (2 М) в определенной степени (61%) заменяют действие низких концентраций Mg^{2+} на флуоресценцию тРНК^{Фен}. Было показано, что NaCl конкурентно тормозит усиление флуоресценции тРНК^{Фен} ионами магния. Циммерман и соавторы показали, что усиление флуоресценции тРНК^{Фен} под влиянием ионов магния обратимо, а также чувствительно к рибонуклеазному воздействию. Эти исследователи [9] также установили, что тРНК^{Фен} дрожжей, очищенная до 50%, изменяет флуоресценцию при добавлении ионов магния подобно тРНК^{Фен} печени быка. Флуоресценцию фенилаланиновой тРНК дрожжей изучали и другие исследователи [10—12], получившие аналогичные результаты. Авторы указанных работ считают, что ионы магния индуцируют глубокие конформационные изменения в области антикодона тРНК^{Фен}. Показано, что концентрация ионов магния, которая наполовину изменяет интенсивность флуоресценции, равна

2×10^{-3} М в растворе, содержащем $0,75 \times 10^{-3}$ М тРНК, что составляет приблизительно 3 иона магния на молекулу тРНК [12]. По-видимому, Mg^{2+} не связывается с основанием Y, так как флуоресценция гексануклеотида из тРНК^{Фен}, содержащего это основание, не зависит от прибавления ионов магния [10]. Флуоресценция тРНК^{Фен} в отсутствие Mg^{2+} усиливается также тяжелой водой — D₂O. Бердслей и сотр. [10] предлагают следующий механизм, объясняющий усиление флуоресценции тРНК^{Фен} в присутствии низких концентраций магния: флуоресценция гасится в водном растворе тРНК, так как Y контактирует с водой. В присутствии магния конформация изменяется таким образом, что флуоресцирующее основание ограждается от раствора, в результате чего и наблюдается увеличение интенсивности флуоресценции. Аналогичные результаты получены при изучении фенилаланиновой тРНК проростков пшеницы [10]. Пожалуй, к такому же типу конформационных изменений, которые не отражаются на биологической активности, как и в случае с фенилаланиновыми тРНК, можно отнести структурные отличия тРНК, обнаруженные Тангом и сотр. [13]. Авторы использовали полинуклеотидфосфоорилазу для изучения конформации тРНК в растворе. Как известно, этот фермент в присутствии ортофосфата производит деградацию полинуклеотидной цепи. При этом образуются полирибонуклеотиды из всех естественных и синтезированных полирибонуклеотидов. Исключением является тРНК, которая может фосфорилироваться при низкой температуре. Было показано, что при определенной температуре часть молекул тотальной тРНК *E. coli* полностью деградирует с 3'-ОН конца, тогда как оставшиеся молекулы являются резистентными и их 3'-ОН-терминальный аденозин остается интактным. Установлено, что реакция останавливается не из-за инактивации фермента, а из-за отсутствия субстрата — тРНК. Оставшаяся часть тРНК, которая не подвергается фосфоролизу в присутствии полинуклеотидфосфоорилазы, не образовывала агрегатов, устойчивых к ферменту. Танг и сотр. [13] исключали также возможность предпочтительного фосфоролиза определенных видов тРНК, показав, что аналогичные явления наблюдаются и с другими суммарными тРНК дрожжей и крыс. Полученные данные дали возможность предположить существование двух классов тРНК с различной конформацией, но биологически активных. В специальных исследованиях было показано, что измененная форма тРНК, которую не узнает полинуклеотидфосфоорилаза, не имеет ничего общего с биологически неактивной (денатурированной) формой тРНК, не способной акцептировать аминокислоты. О существовании, по крайней мере, двух конформационных состояний нативной молекулы тРНК сообщают также Шахау и соавт. [14], которые обнаружили этот факт, используя полинуклеотидфосфоорилазу.

Кроме основания Y тРНК содержат флуоресцирующее основание 4-тиоуридин, которое в присутствии ионов магния увеличи-

вает флуоресценцию [15]. Однако спермидин вдвое увеличивает флуоресценцию по сравнению с магнием. Установлено, что спермидин вызывает конформационные изменения тРНК, затрагивающие дигидроуридиловую петлю и ЦЦА-шпильку. Присутствие ионов магния и спермидина приводит к тому, что область, в которой находится 4-тиоуридин, становится менее доступной воздействию различных реагентов. В упоминавшейся работе Виллика и соавт. [16] также показано, что у различных индивидуальных тРНК добавление ионов магния по-разному влияет на форму участка молекулы, в котором находится 4-тиоуридин. При этом для изменения конформации тРНК требуется связывание трех ионов магния. Виллик и соавт. [16] также считают, что тРНК могут находиться в двух конформационных состояниях, не теряя при этом акцепторных свойств. К такому же заключению приходят Фаркаш и сотр. [17], изучавшие деградирующее действие ионов свинца на тРНК. Авторы считают, что существуют две конформации тРНК, одна из которых подвержена деградации ионами свинца, а вторая — нет. Виллик и соавт. [18] изучали влияние некоторых двухвалентных катионов на конформацию области тРНК, характерную для серусодержащих миноров, с помощью метода кругового дихроизма (КД). В присутствии Mg^{2+} , Li^{2+} и Ca^{2+} спектры были одинаковыми, исключение составлял только Mn^{2+} . При сравнении спектров КД для различных ионов оказалось, что только Ca^{2+} способен замещать Mg^{2+} без видимых нарушений в конформации тРНК. Химен и соавт. [19] обнаружили, что в присутствии ионов магния одна из изоакцепторных тРНК *Bacillus subtilis* может находиться в двух конформационных формах, способных аминоацилироваться. В присутствии ионов магния обнаружена только одна форма.

Таким образом, биологически активные молекулы тРНК, по-видимому, могут иметь несколько различных конформаций в растворе. Эти конформационные различия, вероятно, носят локальный характер. В одних случаях они не затрагивают функционально важные участки и локальное изменение конформации не отражается на функции молекул тРНК, в других — конформационный сдвиг захватывает участки тРНК, важные для рекогниции, и молекула переходит в биологически неактивную форму. В связи с этим интересно отметить тот факт, что при кристаллизации суммарной тРНК животных в кристалл входят не все тРНК, находящиеся в растворе, а только часть их [20]. Происходит как бы отбор только тех тРНК, которые близки по своей конформации и вследствие этого кристаллизуются совместно. Акцепторная активность тРНК, попавших в кристалл, выше, чем до кристаллизации, а многие тРНК по акцепторной активности в кристалле не обнаруживаются. Можно высказать и другое предположение: некоторые тРНК, возможно, при кристаллизации переходят в неактивную форму, однако это предположение не проверилось.

Биологически неактивные тРНК, очевидно, также имеют свои разновидности, если судить по разной температуре прогревания при переходе из неактивной формы в активную. Можно считать, что биологически активная структура транспортных РНК требует, по-видимому, обязательного присутствия ионов двухвалентных металлов, и особенно магния. Это требование может оказаться не обязательным для всех индивидуальных тРНК, однако подавляющее число молекул тРНК в отсутствие ионов магния, вероятно, не могут принимать биологически активную конформацию. Интересно, что некоторые индивидуальные тРНК, разделенные на фрагменты методом разрезанных молекул [21], требуют обязательного присутствия ионов магния для последующей самосборки [22—27]. Смешивание, например, двух половинок тРНК^{Ала} дрожжей в присутствии Mg^{2+} восстанавливает акцепторную активность этой тРНК. Однако при удалении ионов магния в разбавленных солевых растворах при 25° активный комплекс спонтанно диссоциирует на два фрагмента [22]. В то же время образование активного комплекса из фрагментов тРНК^{Вал} пивных дрожжей не требует добавления Mg^{2+} [28]. Это обстоятельство может свидетельствовать о том, что тРНК^{Вал} не нуждается в магнии при самосборке, или о том, что при расщеплении молекулы с помощью T_1 — РНК^{азы} ионы магния остаются прочно связанными с фрагментами тРНК и принимают участие в процессе последующей самосборки молекулы.

Образование биологически активного комплекса тРНК из отдельных фрагментов молекулы в присутствии магния представляет интерес с точки зрения роли Mg^{2+} в образовании третичной структуры тРНК и ее стабилизации, так как молекулы могут быть биологически активными именно на этом уровне организации. Очевидно, образующийся комплекс в процессе самосборки, в присутствии ионов магния приобретает пространственную конфигурацию, очень близкую к нативной молекуле тРНК, что проявляется в способности этого комплекса акцептировать аминокислоты. В настоящее время известна роль магния в стабилизации вторичной структуры тРНК [29—38]. Однако ионы магния, по-видимому, стабилизируют и третичную структуру [22, 39], что может быть немаловажным обстоятельством в процессе обратимого перехода тРНК из активной формы в неактивную, если такой переход осуществляется только на уровне третичной структуры.

Следует отметить, что ионы двухвалентных металлов, и особенно Mg^{2+} , играют существенную роль не только в формировании структуры транспортных РНК. Олиговалентные катионы необходимы также для нормального хода реакций начальных этапов биосинтеза белка. Этот вопрос заслуживает специального рассмотрения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dudok B., Katz G., Taylor E., Holley R. Primary structure of wheat germ tRNA^{Phe}.—Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1969, **62**, 941.
2. Fink L., Goto T. Rat liver tRNA^{Phe}: column purification and fluorescence studies.—Biochem. Biophys. Res. Commun., 1968, **32**, 963.
3. Raj Bhandary U., Chang S., Stuart A., Faueknor R., Hoskinson R., Khorana H. The primary structure of yeast tRNA^{Phe}.—Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1967, **57**, 751.
4. Yoshikami G., Katz G., Keller E., Dudok B. A fluorescence assay for phenylalanine tRNA.—Biochim. Biophys. Acta, 1968, **166**, 714.
5. Nakanishi K., Furutachi N., Funamizu M., Grunberg D., Wenstein I. Structure of the fluorescent Y-base from yeast phenylalanine tRNA.—J. Amer. Chem. Soc., 1970, **92**, 7617.
6. Thiobe R., Zachau H. Acceptor activity in homologous and heterologous combinations and half molecules from tRNA^{Phe}_{yeast} and tRNA^{Phe}_{wheat}.—Biochem. Biophys. Res. Commun., 1969, **36**, 1024.
7. Raj Bhandary U., Chang S., Stuart A., Faueknor R., Hoskinson R., Khorana H. The primary structure of yeast tRNA^{Phe}.—Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1967, **57**, 751.
8. Yot P., Pinck M., Heanni A., Duranton H., Chapeville F. Valino-specific tRNA-like structure in turnip yellow mosaic virus RNA.—Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1970, **67**, 1345.
9. Zimmerman T., Robinson B., Gibbs J. Fluorescence as a conformational probe of beef liver tRNA^{Phe}.—Biochim. Biophys. Acta, 1970, **209**, 151.
10. Beardsley K., Tao T., Cantor C. Studies on the conformation of the anticodon loop of tRNA^{Phe}. Effect environments of the fluorescence of the base.—Biochemistry, 1970, **9**, 3524.
11. Eisinger I., Feuer B., Yamane T. Luminescence and binding studies on tRNA^{Phe}.—Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1970, **65**, 638.
12. Tao T., Nelson J., Cantor C. Conformation studies of tRNA. Fluorescence lifetime and nonsens-codon depolarization measurements on bound ethidium bromide.—Biochemistry, 1970, **9**, 3514.
13. Thang M., Beltchev B., Grunberg-Manago M. Phosphorolysis of tRNA. Multiple conformational states of tRNA in solution.—Europ. J. Biochem., 1971, **19**, 184.
14. Zachau H., Streeck R., Hanggi U. Conformational states of tRNA. Gene expression and regulation.—In: Proc. 11th Internat. Amer. Symp. La Plata, 1971. New York—London, 1973, 217.
15. Pochon F., Chen S. 4-Thiouridine and the conformation of *E. coli* tRNA induced by spermidine.—Biochem. Biophys. Res. Commun., 1972, **4**, 720.
16. Willick C., Kay C. Magnesium-induced conformational change in tRNA as measured by circular dichroism.—Biochemistry, 1971, **10**, 2216.
17. Farkas W., Hewins S., Welch J. Effect of plumbum ion on some functions of tRNA.—Chem. Biol. Interact., 1972, **5**, 191.
18. Willick G., Oikama K., Kay C. Circular dichroism studies on the conformation of tRNA in presence of different divalent cations.—Biochemistry, 1973, **12**, 899.
19. Heyman T., Leider J., Menichi B. Chromatographic separation of two ionic strength dependent conformations of valine tRNA of *Bacillus subtilis*.—Biochemie, 1973, **55**, 127.
20. Мадука Г. Х., Осика В. Д., Бабий Т. П., Горячева Л. А., Коваленко М. И. Кристаллизация суммарной тРНК животного происхождения.—Укр. біохім. журн., 1973, **45**, 284.
21. Баев А. А., Фодор И., Мирзабеков А. Д., Аксельрод В. Д., Казаринова Л. Я. Функциональные свойства фрагментов молекул валиновой тРНК.—Мол. биол., 1967, **1**, 859.
22. Imura N., Schwab H., Chambers R. Reconstruction of alanine accep-

- tor activity from fragments produced by specific cleavage of tRNA^{Ala} at its anticodon.—Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1969, 62, 1203.
23. Oda K., Kimura F., Haroda F., Nishimura S. Restoration of valine acceptor activity by combining oligonucleotide fragments dependent from *B. subtilis* ribonuclease digest of *E. coli* valine tRNA.—Biochim. Biophys. Acta, 1969, 179, 97.
 24. Schmidt J., Reid B. Reconstruction of yeast tRNA^{Phe} after fragmentation with ribonuclease T₁.—Biochim. Biophys. Acta, 1970, 213, 539.
 25. Seno I., Nishimura S. Cleavage of *E. coli* tRNA^{Tyr} in the S-region and its effects on the structure and function of the reconstructed molecules.—Biochim. Biophys. Acta, 1971, 228, 141.
 26. Seno T., Kobayashi M., Nishimura S. Recovery of tRNA functions by combining oligonucleotide fragments from *E. coli* tRNA^{Tyr}.—Biochim. Biophys. Acta, 1969, 182, 280.
 27. Thibe R., Zachau H. Acceptor activity in homologous and heterologous combinations and half molecules from tRNA^{Phe}_{yeast} and tRNA^{Phe}_{wheat}.—Biochim. Biophys. Res. Commun., 1969, 36, 1024.
 28. Мирзабеков А. Д., Казаринова Л. Я., Баев А. А. Акцепторная активность некоторых разрезанных молекул дрожжевой тРНК₁^{Вал}.—Мол. биол., 1969, 3, 879.
 29. Киселев Л. А., Фролова Л. Ю., Борисова О. Ф. Макромолекулярная структура тРНК. О внутримолекулярной локализации нуклеотидов, не участвующих в водородных связях.—В кн.: Молекулярная биофизика. М., «Наука», 1965, 128.
 30. Arca M., Calvori C., Frontali L., Tecce G. Chemical denaturation and amino acid binding ability of sRNA.—Biochem. Biophys. Res. Commun., 1963, 10, 117.
 31. Cox R., Littauer U. Properties of low molecular weight RNA from *E. coli*.—J. Mol. Biol., 1963, 2, 166.
 32. Fresco J., Alberts B., Doty P. Some molecular details of the secondary structure of RNA.—Nature, 1960, 188, 98.
 33. Grunberg-Manago M. Enzymatic synthesis of nucleic acids.—Ann. Rev. Biochem., 1962, 31, 301.
 34. Mahler H., Dutton G., Mehrotra B. Effect of deuterium on thermal transition of nucleic acids.—Biochim. Biophys. Acta, 1963, 68, 199.
 35. Nishimura S., Novelli G. Dissociation of amino acid acceptor function of sRNA from its transfer function.—Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1965, 53, 178.
 36. Tsuboi M., Higuchi S., Kyogoku Y., Nishimura S. Infrared spectra of tRNA's. II. F-tRNA from *E. coli* in aqueous solution.—Biochim. Biophys. Acta, 1969, 195, 23.
 37. Yoshida M., Ukita T. Studies of the reaction rates of acrylonitrile with uridine residues in RNA.—J. Biochem., 1965, 58, 191.
 38. Zubay G., Marciello R. A chemical method for studying the detailed secondary structure of RNA.—Biochem. Biophys. Res. Commun., 1963, 11, 79.
 39. Danchin A., Gueron M. Cooperative binding of manganese to tRNA.—Europ. J. Biochem., 1970, 16, 532.

Глава 6

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О РЕГУЛЯТОРНОЙ ФУНКЦИИ тРНК НА УРОВНЕ ТРАНСЛЯЦИИ

Почти сразу после открытия тРНК начали появляться работы, из которых следовало, что роль тРНК в процессе биосинтеза белка, по всей вероятности, не ограничивается акцепторной и адапторной функциями. Многочисленные данные свидетельствовали о вовлечении тРНК в регуляцию белкового синтеза и других метаболических процессов в клетке. Значительным прогрессом в этой области ознаменовались последние 3—4 года благодаря совершенствованию применяемых биохимических и генетических методов. К настоящему времени в зарубежных и отечественных изданиях опубликовано несколько обзорных статей [1—4], в которых довольно детально обсуждается проблема участия тРНК, а позднее и АРСаз в процессах регуляции.

Не касаясь вопросов участия тРНК в супрессии и роли тРНК и АРСаз в регуляции биосинтеза ряда ферментных систем, которые подробно рассмотрены в обзоре Литтауэра [4], остановимся более детально на современных представлениях о роли тРНК в регуляции биосинтеза белка на уровне трансляции.

Гетерогенность тРНК. Изучение регуляторной функции тРНК тесно связано с открытием их гетерогенности [5], наличием так называемых изоакцепторных фракций, присоединяющих одну и ту же аминокислоту. Их существование обнаружено с помощью разнообразных методов, в том числе методом противоточного распределения [5], колоночной хроматографией на МАКе [6—9], ДЭАЭ-целлюлозе и сефадексе [10, 11], гидроксипатите [12, 14], в обращенной фазе [15—18], на сефадексе Г-25 в двухфазной системе растворителей [19].

Изоакцепторные тРНК были найдены во всех исследованных объектах микробного, растительного и животного происхождения [4, 6, 7, 20—23]. Наиболее изучены в этом отношении тРНК *E. coli*, в которых для 20 аминокислот существует, по крайней мере, 56 видов индивидуальных молекул тРНК [19], причем максимальной гетерогенностью отличаются лейциновые, триптофановые, пролиновые и сериновые тРНК (по 4—5 фракций) [19, 24, 25]. Вначале наличие набора изоакцепторных тРНК связывали с вырожденностью генетического кода. Действительно, изучение кодового «ответа» [26—30], а в дальнейшем сравнение первичных структур [31, 32] показало, что в ряде случаев гетерогенность тРНК объясняется различиями в антикодоне. Однако наряду с этими результатами были получены данные, показывающие, что строгий корреляции между гетерогенностью тРНК и

вырожденностью генетического кода не существует. Обнаружено, например, что одна тРНК^{Фен} дрожжей может транслировать более одного кодона, а две тРНК^{Гли} взаимодействуют с одним и тем же кодоном [33]. Изоакцепторные тРНК, соответствующие одному и тому же кодону, могут отличаться первичной структурой вне антикодона, что впервые продемонстрировали Цахау и сотр. [34] на примере двух сериновых тРНК дрожжей. Иногда совсем незначительные различия, например отсутствие концевого нуклеотида, приводят к разделению тРНК в хроматографических системах. Анализ первичных структур ряда изоакцепторных тРНК (табл. 11) показал, что число отличающихся нуклеотидов довольно значительно варьирует в зависимости от вида и происхождения тРНК [35—37].

Таблица 11

Анализ первичных структур некоторых изоакцепторных тРНК

Показатель	тРНК дрожжей				тРНК <i>E. coli</i>		
	арг 2,3	лиз 1,2	сер 1,2	сер 1,3	гли 1,2	лей 1,2	тир 1,2
Длина цепи	76	76	85	88 ₁ , 93 ₃	76	87	85
Количество отличающихся нуклеотидов	27	2	3	41	22	22	3

Однако в последнее время стали известны случаи, когда гетерогенность тРНК связана с различиями не в первичной, а в пространственной структуре [38—40]. Не исключено, что конформационная гетерогенность не исчерпывается наличием нативных и денатурированных форм тРНК. Описана, например, неоднородность тРНК, выявленная при действии таких ферментов, как полинуклеотидфосфорилаза [41] и полинуклеотидкиназа [42]. Вопрос о конформационной гетерогенности тРНК и ее биологическом значении далек от окончательного решения.

Обсуждая проблему гетерогенности тРНК, нельзя не согласиться с мнением Новелли [43], что в настоящий момент чрезвычайно трудно установить истинное число различных видов тРНК, существующих в данной клетке, а тем более определить, какие из изоакцепторных фракций используются клеткой в данный момент.

АДАПТОРНО-МОДИФИКАЦИОННАЯ ГИПОТЕЗА РЕГУЛЯТОРНОЙ ФУНКЦИИ тРНК

В 1964 г. была опубликована первая работа Суюока и Кано-Суюока [44], послужившая основанием для изучения роли отдельных изоакцепторных тРНК и создания в дальнейшем адапторно-модификационной гипотезы регуляторной функции тРНК. Сущность явления, открытого этими авторами в серии исследований, сво-

дится к следующему. Заражение клеток *E. coli* бактериофагом Т4 приводит к специфическому расщеплению одной из основных фракций тРНК^{Leu} под действием специфической нуклеазы, индуцированной фагом на два примерно равных фрагмента. Определение кодового соответствия показало, что тРНК^{Leu} соответствует ЦУГ-кодону. Ферментативное расщепление этой изоакцепторной фракции приводит к потере акцепторной и адапторной функций, количество молекул, связанных с полисомами, т. е. активно участвующих в белковом синтезе, резко уменьшается [27, 45, 46]. Следовательно, иРНК клетки-хозяина, содержащие ЦУГ-кодон, не могут быть транслированы. В то же время оказалось, что фаговые иРНК практически не содержат этот кодон и синтез белков, закодированных на геноме фага, протекает беспрепятственно [46]. К тому же фаг содержит гены для целого ряда новых тРНК, синтез которых осуществляется на ранней стадии фаговой инфекции [47—49].

Таким образом, структурная модификация одного из изоакцепторных адапторов может привести к прекращению трансляции иРНК, содержащей соответствующие ему кодоны. Модифицируя специфические молекулы тРНК, можно «включать и выключать» функционирование определенных генов на уровне трансляции. Эта гипотеза, по мнению ее создателей, применима лишь в случае резких, существенных изменений метаболизма в клетке.

В последующие годы было опубликовано большое число работ, косвенно подтверждающих основные положения адапторно-модификационной гипотезы.

ИЗМЕНЕНИЯ тРНК ПРИ ФАГОВОЙ И ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

Кроме тРНК^{Leu}, появление которой в *E. coli* было подтверждено Вейсом и сотр. [49], с помощью метода аминокислот-тРНК—ДНК-гибридизации и генетических подходов было обнаружено еще пять Т4-фагоспецифических тРНК: Про, Гли, Арг, Иле, Сер [50—52]. Однако их число, по-видимому, еще выше, о чем свидетельствуют недавние исследования РНК путем электрофореза в полиакриламидном геле [53]. Транскрипция соответствующих генов происходит с легкой цепи Т4-ДНК [51], на которой они тесно сгруппированы [54].

Была расшифрована полная первичная структура Т4 тРНК^{Leu} [55], которая состоит из 87 нуклеотидов и очень сходна с изученными тРНК *E. coli*. Фагоспецифическая тРНК^{Leu} отличается двумя модифицированными основаниями в области антикодонной петли. В отличие от тРНК^{Leu} *E. coli*, расщепляемой фагиндуцируемой нуклеазой, Т4 тРНК^{Leu} соответствует не ЦУГ-, а УУА-кодону.

Фаги Т4 и Т2 не являются исключением: ДНК фага Т5 несет информацию, по крайней мере, для 14 видов тРНК [52]. Обнару-

жено специфическое снижение связывания пролил-тРНК с рибосомами после заражения *E. coli* фагом Q β , однако природа этого явления пока не установлена [56]. В подтверждение концепции Суюока и Кано-Суюока показано, что Т4-кодируемые тРНК^{Гли.} Арг, Иле, Лей транслируют кодовые слова, которые хуже узнаются аппаратом клетки-хозяина [57]. Более того, эти тРНК более эффективны при полипептидном синтезе на матричных РНК фага по сравнению с иРНК *E. coli*.

Что касается вирусной инфекции животных клеток, факт индукции синтеза новой тРНК^{Арг} впервые был обнаружен Субак-Шарпом при заражении вирусом герпеса культуры клеток ВНК 21 [58]. Хроматография Т₁ — РНКазных гидролизатов аргининовых тРНК на ДЭАЭ-целлюлозе показала, что новая тРНК^{Арг} отличается нуклеотидной последовательностью как минимум в области акцепторного конца. Гибридизационные исследования не дали четкого ответа на вопрос о происхождении новой тРНК.

Изменения спектров изоакцепторных тРНК наблюдались также при заражении животных клеток такими ДНК-вирусами, как аденовирус 2 [59], вирусы вакцин [60], SV 40, вирус полиомы [61]. В двух последних случаях наблюдали появление новой аспартил-тРНК, причем по профилю элюции одна из них соответствует тРНК^{Асп} нормальной, а другая — регенерирующей печени.

Показано, что 4S РНК содержится в опухолевых РНК-вирусах [59]. Акцепторные свойства тРНК АМВ отличаются от тРНК клетки-хозяина [62—64], причем различия обнаружены и в составе метилированных оснований. Последнее, по-видимому, связано с наличием метилаз тРНК в АМВ. Получены факты, свидетельствующие о присутствии тРНК в РНК-вирусах растений [65—67].

тРНК ОПУХОЛЕЙ

К настоящему времени проведено большое количество исследований по сравнению акцепторной активности и хроматографического поведения многих тРНК из нормальных и опухолевых клеток.

Установлены различия в профилях элюции на МАКе фенилаланил-, серил- и тирозил- тРНК из асцитной опухоли Эрлиха, мышинной саркомы 1 и нормальных тканей [68]. Измененные профили элюции характерны для тирозил- и аспартил-тРНК миеломных клеток человека [69].

Из 20 аминоксил-тРНК существенные различия были обнаружены для тирозил- и глутаминил-тРНК нормальных и лейкемических лимфобластов [70]. Впервые в данной работе высказывается предположение, что изменения профиля элюции глутаминил-тРНК скорее зависят от синтетазы, а не от тРНК.

По данным Голдмана [71], нормальная печень отличается от асцитной опухоли Новикова исчезновением одной из фенилаланил-тРНК. По данным Балига и соавт. [72], для этой же опухоли характерно появление новых видов тРНК^{Гис}, тРНК^{Тир}, тРНК^{Арг}. Различия найдены не только между нормальной тканью и гепатомами [72—75], но и между тРНК из разных видов гепатом. Особенно варьируют наборы изоакцепторных фенилаланил-, тирозил-, аспаргил- и глутамил-тРНК [72, 76—78]. При сравнении кодового соответствия тРНК^{Фен} гепатомы 5123С и нормальной печени не обнаружено различий, опухолевая тРНК гибридизируется с ДНК печени крыс так же эффективно, как другие фракции тРНК^{Фен}. Предполагается, что различия между ними зависят от пост-транскрипционной модификации [79]. В связи с этим следует напомнить, что, например, тРНК-метиلاзная активность гепатомы Новикова в пять раз выше тРНК-метилазной активности нормальной ткани [72]. Есть данные, что антикодон тРНК^{Три} опухолевой и нормальной ткани не имеет различий [78].

Интересно, что в случае тРНК^{Фен} и тРНК^{Тир} [160] показано большое сходство хроматографических свойств опухолевых препаратов и препаратов, выделенных из эмбриональной ткани. Это одно из подтверждений часто высказываемого мнения, что если изменение тРНК и не является одной из первичных причин злокачественного перерождения, оно чрезвычайно существенно для поддержания клетки в дедифференцированном состоянии.

Кроме гепатом сравнивали различные линии мышинных плазмоцитов, продуцирующих разные виды тяжелых цепей иммуноглобулинов [81—84]. Обнаружены изменения для серил- и лейцил-тРНК. Авторы высказывают предположение, что повторяющиеся гены для разных изоакцепторных тРНК регулируются независимыми контрольными механизмами и содержание отдельных фракций тРНК в плазмоцитомах отражает уровень этого контроля в разных опухолях. Изменение содержания отдельных изоакцепторных тРНК, в свою очередь, может быть лимитирующим фактором в биосинтезе определенных видов иммуноглобулина [82].

Не менее интересные результаты получены при изучении тРНК в процессе химического канцерогенеза. При исследовании лейцил-тРНК печени крыс в период кормления этионином обнаружено исчезновение на профиле элюции с колонки МАК двух пиков из трех, найденных в ткани контрольных животных. В то же время лейцил-тРНК гепатомы состоит из компонентов, идентичных нормальным, т. е. изменения лейциновых тРНК в процессе химического канцерогенеза не свойственно опухоли как таковой. Это дает основание считать, что модификация тРНК^{Лей} играет существенную роль в инициации гепатомы этионином [85, 86].

Несмотря на все перечисленные данные о значительных различиях тРНК опухолевых и нормальных тканей, прямых доказательств возникновения блока на уровне трансляции вследствие изменения адапторов пока нет.

ИЗМЕНЕНИЯ тРНК И АРСаз ПРИ РАЗНЫХ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ

Изменения количественного соотношения отдельных тРНК, спектров из изоакцепторных фракций, специфичности при взаимодействии с РСазами наблюдаются также при физиологических изменениях условий жизнедеятельности клетки, которые в подавляющем большинстве случаев связаны с существенными количественными и качественными изменениями биосинтеза белка. Подобные данные получены, например, при изучении влияния на тРНК различных условий роста микроорганизмов [8, 87—90]. Эти исследования подробно обсуждены в ряде обзоров [2, 4], а в настоящий момент более существенно рассмотреть результаты, полученные на высших организмах.

Давно высказывается мнение, что, наряду с регуляцией транскрипции, транспорта и «хранения» информационных тРНК [91, 92], существует контроль клеточной дифференциации на уровне трансляции, осуществляемой путем модификации или синтеза de novo определенных адапторов [93]. По мнению Стрелера и соавт. [94], клетка определенного типа не способна синтезировать белок на специфических иРНК другого вида клеток, так как есть, по крайней мере, одно нетранслируемое кодовое «слово», обусловленное отсутствием соответствующих аминоксил-тРНК. Авторы подчеркивают, что отсутствие необходимой аминоксил-тРНК может зависеть как от тРНК, так и от АРСаз.

Наиболее полно в этом плане изучено раннее развитие морских ежей, сопровождающееся изменениями как тРНК, так и АРСаз [95—98]. В период гастрюляции появляется новая серил-тРНК и несколько изменяется профиль элюции лизил-тРНК [97]. По данным других исследователей [98], изменяется распределение двух изоакцепторных тРНК^{Лиз} между растворимой фракцией и полисомами. Поскольку тРНК, связанные с рибосомами, считаются активно участвующими в белковом синтезе, можно предположить, что отдельные тРНК^{Лиз} необходимы в разные периоды развития морского ежа. Для этого же объекта было показано изменение аминоксил-тРНК-синтетазных активностей [95], а в более поздней работе Цахау и сопр. [97] установлены значительные изменения лейцил-тРНК-синтетазы сразу после оплодотворения или партеногенетической активации яиц. Авторы предполагают, что скорее происходит модификация существовавшей до оплодотворения формы фермента, чем синтез нового вида.

Интересно, что изменения лейцил-тРНК синтетазы характерны для развития и других представителей многоклеточных. На ранних стадиях в эмбрионах мышей присутствует особая лейцил-тРНК-синтетаза, отличающаяся от соответствующего фермента «взрослых» тканей субстратной специфичностью и термостабильностью [99]. В ходе развития эмбриональная форма полностью исчезает. Используя стареющие семядоли сои, наблюдали изменения активности лейцил-тРНК-синтетазы при старении [100]. Хроматографией в обращенной фазе обнаружено шесть тРНК^{Лей} в семядолях сои. В процессе старения происходит относительное увеличение V и VI компонентов, в то время как содержание тРНК^{Лей} в целом резко уменьшается. Эти изменения сопровождаются уменьшением способности фермента из 21-однодневных зародышей аминокислотировать тРНК^{Лей}₁₋₄ [100, 101]. Более того, лейцил-тРНК-синтетаза из 4-дневных семядоль фракционируется на три компонента: один из них аминокислотировывает тРНК^{Лей}_{1,6}, два других — тРНК^{Лей}₁₋₄. Оказалось, что подсемядольное колено сои содержит только две последние формы фермента [102].

Изменения профилей элюции лизил- и тирозил-тРНК обнаружены при сравнении тканей эмбриона и печени цыплят [4], фенилаланил-тРНК из эмбриональной и «взрослой» печени крыс [103, 104], описаны «эпителиальный и фибробластный» типы тирозил-тРНК [105]. Изменения изоакцепторных спектров обнаружены при развитии креветок *Artemiasalino* [4]. При изучении кодового соответствия установлены некоторые изменения для тРНК^{Иле, Глу, Арг} в процессе развития *Xenopus* [106]. Сравнение тРНК эритроцитов головастика и взрослой лягушки *Rana catesbeiana* показало различия в тРНК^{Мет} и тРНК^{Арг} [107]. Интересные данные получены в отношении тРНК^{Ала} куриных эмбрионов. Оказалось, что малый компонент, составляющий лишь около 2% всего количества аланиновых тРНК, является стимулятором быстрого синтеза гемоглобина [108, 109]. В дальнейшем было показано немитохондриальное происхождение этого вида тРНК^{Ала} островков кроветворения эмбрионов.

Было проведено сравнение наборов тРНК и в ряде случаев АРСаз из различных тканей, образовавшихся в результате завершения процесса дифференциации при развитии зародыша одного и того же организма. При большом сходстве профилей элюции тРНК в разных хроматографических системах обнаружены различия, причем чаще всего для тРНК^{Сер}. Так, серил-тРНК печени мышей и кролика содержат малый компонент, который отсутствует в почках и скелетных мышцах [110]. Различны серил-тРНК печени и мозга кролика и быка. Обнаружено, что часть тРНК^{Сер} печени быка, кролика и цыпленка соответствует кодону УГА [111], который у бактерий участвует в терминации синтеза белка. У высших организмов роль УГА не установлена.

Кроме тРНК^{Сер}, существенные различия установлены для тРНК^{Лей} печени, почек и селезенки мышей [83], для тРНК^{Асп}, тРНК^{Иле, Лей, Лиз} бычьих мышц и хрусталика глаза, причем тРНК^{Ала} из мышц и тРНК^{Мет, Тир} из хрусталика содержат по одной изоакцепторной фракции, которой нет ни в одной другой ткани [112].

В ряде случаев изучение специфичности АРСаз к отдельным изоакцепторным тРНК дает основание предполагать наличие различных форм фермента в разных тканях многоклеточного организма [113].

Все перечисленные работы в основном являются констатацией фактов, описанием обнаруженных различий в профилях элюции при хроматографическом разделении отдельных тРНК. За исключением изменений тРНК в высокоспециализированных тканях, синтезирующих ограниченное количество специфических белков, о чем будет сказано позже, все рассмотренные примеры вариабельности тРНК пока трудно связать с конкретными изменениями биосинтеза белка в клетке или иными аспектами обмена веществ. В большинстве случаев не известны и механизмы, лежащие в основе исчезновения или появления новых видов тРНК. Однако в последнее время в этом вопросе наметился существенный прогресс на основе совершенствования методов выделения индивидуальных тРНК и изучения их свойств. Пример такого углубленного изучения роли отдельных видов тРНК — исследование корреляции между содержанием минорного компонента лизил-тРНК и клеточным делением в тканях млекопитающих [114, 115]. Авторы изучили спектр лизиновых тРНК в тканях различных животных и установили, что, кроме обычно определяемых двух больших компонентов, в большинстве случаев в клетках существуют 2—3 малых компонента, причем содержание одного из них — тРНК^{Лиз}₄ резко зависит от способности клеток делиться:

Ткань	тРНК ^{Лиз} ₄ , % от всех тРНК ^{Лиз}	Число клеток, способных делиться, %
Кора хрусталика	0	0
Печень крыс	3—2	30—40
Слонная железа крыс	7,0	60—80
Гепатома Морриса	9,8; 10,7	100

Изучение свойств тРНК^{Лиз}₄, в том числе кодового соответствия, дает основание считать, что этот вид тРНК является модификацией первого большого компонента — тРНК^{Лиз}₂, возможно, в результате активации метилаз более высокими концентрациями полиаминов в делящихся клетках.

Изучая возможную регуляторную функцию тРНК и АРСаз, исследователи уделяют большое внимание вопросу, не являются ли изменения этих макромолекул одним из звеньев в механизме гормональной регуляции. Действительно, начиная с изменения тРНК^{Лей} хрущака мучного под влиянием ювениальных гормонов [116], установлено много фактов варибельности тРНК и АРСаз как в обычных тканях, так и в тканях-мишенях при изменении гормонального статуса организма.

Для изучения действия половых гормонов была выполнена целая серия работ на неполовозрелых цыплятах [117—121]. При введении диэтилстильбестрола увеличивается включение ¹⁴C-урацила в ядерную и цитоплазматические фракции тРНК из яйцевода и несколько возрастает ее акцепторная активность [119]. Кроме того, в этом случае отмечена повышенная способность тРНК печени присоединять лизин, серин и аргинин, а при хроматографии на МАКе обнаружено относительное увеличение тРНК^{Лиз} [118].

Изменение уровня эстрогенов в организме неполовозрелых кур [117] и петухов [120, 121] сопровождается колебаниями в количественном содержании одной из сериновых тРНК печени — тРНК^{Сер}_{УЦУ/Ц}. Аналогичное повышение содержания этого компонента характерно и для печени половозрелых кур-несушек, причем в данном случае оно сопровождается увеличением серил-тРНК-синтетазной активности суммарного препарата АРСаз [117]. Вполне возможно, что эти изменения связаны с синтезом белков, богатых фосфосерином.

Метаморфоз головастиков, индуцированный триодтиронином, сопровождается изменением хроматографических профилей лейцил-тРНК печени, почек, хвоста и жабр [122].

Наряду с этим, удаление желез внутренней секреции также приводит к изменениям тРНК в тканях-мишенях. Это показано для тРНК^{Лиз} и тРНК^{Фен} печени крыс после удаления щитовидной железы [123], тРНК^{Сер} матки морских свинок после оварэктомии [124], причем введение тироксина или эстрогенов частично возвращает спектр тРНК к исходному состоянию. Интересно, что гипофизэктомия приводит к общему уменьшению акцепторной активности тРНК печени крыс, особенно выраженному для тРНК^{Арг, Лиз, Вал, Фен} [125]. Введение гормона роста гипофизэктомизированным крысам приводит к появлению двух новых фракций аспаргил-тРНК, что, по мнению авторов [25], связано скорее всего с инициацией роста, так как подобные изменения наступают и в регенерирующей печени [126].

Как мы уже отмечали, механизм описанных изменений тРНК, а в ряде случаев и АРСаз, почти не изучен. Учитывая долгий путь синтеза и «созревания» тРНК [4], можно предположить действие контролирующих факторов на разных уровнях: транскрипции молекулы-предшественника, модификации метилазами и други-

ми ферментами, достройки АЦЦ-конца или отщепления «избыточного» участка от основной тРНК-предшественника. Можно надеяться, что стремительный прогресс как в области изучения первичной структуры, так и механизмов биосинтеза тРНК прольет свет на эту проблему уже в ближайшие годы.

Итак, самые разнообразные изменения жизнедеятельности микробиальных, растительных и животных клеток, сопровождающиеся изменением обмена веществ, приводят к количественному перераспределению отдельных видов тРНК и АРСаз, появлению либо исчезновению их изоформ. Практически все авторы связывают эти факты с регуляторной функцией тРНК на уровне трансляции, хотя лишь в единичных случаях удалось получить более прямые доказательства зависимости скорости трансляции определенных информационных тРНК от набора аминоацил-тРНК [108, 109]. Кроме этих работ, три группы фактов представляются нам особо существенными при обсуждении возможной роли тРНК и АРСаз в регуляции на уровне трансляции.

1. Синтез новых тРНК на геноме бактериофагов и вирусов после инфекции клеток, связанный, по-видимому, с необходимостью особого трансляционного аппарата для синтеза «постинфекционных» белков.

2. Превалирующее изменение тРНК одной и той же аминокислотной специфичности при тех физиологических и патологических состояниях, в основе которых могут быть общие контрольные механизмы, например, вариабельность лейцил-тРНК (за счет изменений как тРНК, так и АРСаз) при старении семядолей сои, развитии мышинных эмбрионов, дифференциации яиц морского ежа; изменение преимущественно фенилаланил-, тирозил-, аспарагил-, аргинил-тРНК в опухолевых тканях; возможная связь аспарагил-тРНК с инициацией роста; наличие особой формы лизил-тРНК в клетках, способных делиться, и т. д.

3. Данные о том, что отдельные изоакцепторные тРНК помещают аминокислотные остатки в разные, строго определенные места полипептидной цепи [127, 128], и возможность регуляции синтеза белков *in vitro* путем изменения количества и качественного набора тРНК в системе [129, 130]. Исследования подобного рода стоит обсудить более детально, поскольку в них сделана попытка экспериментально доказать основные положения современных гипотез регуляторной функции тРНК.

Роль транспортных РНК в регуляции скорости трансляции гемоглобиновых иРНК впервые была постулирована Итано [131]. Получены были также экспериментальные доказательства наличия «контрольных точек», после которых рост обеих полипептидных цепей гемоглобина замедлен, причем высказывалось предположение, что одной из причин этого может быть низкое содержание одной или более фракций тРНК. В определенной мере это предположение получило подтверждение в работах Эндерсона и Гилберта [132, 133], которые создали тРНК-зависимую бескле-

точную систему синтеза гемоглобина. Сопоставляя пропорции синтеза α - и β -цепей гемоглобина, авторы обнаружили, что цепи синтезируются приблизительно в одинаковых количествах при внесении в систему суммарной тРНК. Если же из суммарной тРНК удалить одну из фракций с помощью хроматографии в обращенной фазе (ХОФ-2), то скорость синтеза α -цепи по сравнению с β -цепью уменьшается. По мнению Эндерсона и Гилберта, α -цепь содержит, по крайней мере, один кодон, которого нет в иРНК β -цепи и которому соответствует специфическая тРНК. Меняя концентрацию определенных видов тРНК, можно влиять на скорость трансляции гемоглобиновых тРНК.

Маттеи и сотр. [130] показали, что включение 20 аминокислот в бесклеточной системе *E. coli*, стимулируемое иРНК бактериофага, конкурентно ингибируется фенилаланил-тРНК^{Фен}. В данном случае замедление скорости трансляции вызвано избытком определенного вида аминокислот-тРНК.

Чрезвычайно интересной в свете проблемы влияния тРНК на скорость трансляции нам представляется работа Чина и Кидсона [129] о способности ряда стероидных гормонов контролировать полипептидный синтез в модельной системе *in vitro*. Прогестерон, эстрадиол, тестостерон и 5- α -дигидротестостерон, связываясь только с определенными видами аминокислот-тРНК, снижают скорость трансляции. Связывание зависит от структуры как тРНК, так и стероида и происходит в эквимольном соотношении.

Получены данные [134], свидетельствующие о том, что механизм действия интерферона связан с тРНК. Показано, что добавление тРНК печени мышей (но не рибосомальной или тРНК *E. coli*) снимает блок при синтезе экзогенной вирусной иРНК экстрактом обработанных интерфероном клеток асцитной опухоли Эрлиха. Оказалось, что способность присоединять лейцин эндогенной тРНК таких клеток снижена на 50% по сравнению с тРНК клеток, не обработанных интерфероном. В работе приводятся доказательства, что снижение уровня аминокислирования эндогенной тРНК^{Лей} связано именно с действием интерферона. Активность лейцил-тРНК-синтаз не изменяется, а добавление мышинной тРНК снимает ингибирующее действие интерферона на трансляцию вирусной иРНК. Используя пактамицин, авторы показали, что добавленная тРНК способствует элонгации незавершенных пептидных цепей и инициации новых.

ГИПОТЕЗА МОДУЛЯЦИИ

Рассмотренные факты возвращают нас к одной из ранних гипотез регуляторной функции тРНК — гипотезе модуляции [131, 135—137]. По представлениям ее создателей — Эймса и Хартмана [135], изменение пропорций синтеза белков, кодируемых полицистронной матрицей, т. е. «модуляция», осуществляется на уровне трансляции. Скорость трансляции зависит от концентрации

особых тРНК, считывающих модулирующие кодоны. Стент [136] предложил вообще отказаться от представлений о специальном гене-операторе, так как его функцию могут выполнять модулирующие триплеты. Это довольно смелое предположение, безусловное, является очень спорным, однако в концепции Стента есть ряд интересных моментов. Так, им высказано предположение, что репрессия или активация биосинтеза определенных белков может осуществляться путем изменения уровней ферментов, модифицирующих модуляторные тРНК. В то же время в литературе описан целый ряд случаев корреляции процессов метилирования тРНК с существенными изменениями функции клеток, о чем подробно сказано в обзоре Остермана [3].

В 1973 г. Вейс развил гипотезу модуляции, используя идею «wobble»-гипотезы Крика [30]. В классическом виде модуляция предполагается лишь при соответствии модулирующего триплета уникальной тРНК. Однако на самом деле ситуация более сложна, так как на многочисленных примерах показано, что некоторые тРНК соответствуют более чем одному кодону и одному кодону могут соответствовать несколько тРНК. «Wobble»-гипотеза Крика [138] объясняет, почему возможны взаимодействия определенных кодон-антикодоновых пар, однако в ней не обсуждается вопрос об относительной силе этих взаимодействий. В то же время известно, что, хотя одна тРНК может соответствовать более чем одному кодону, степень этого соответствия далеко не всегда одинакова. Приняв во внимание ряд факторов, Вейс пришел к выводу, что в результате различий в силе кодон-антикодоновых взаимодействий разные кодоны могут транслироваться одной и той же тРНК с разной скоростью. Следовательно, в любой момент в клетке имеется определенная концентрация разных видов тРНК, а относительная скорость синтеза белков контролируется числом модулирующих кодонов в каждой иРНК. При изменении концентрации тРНК с множественным кодовым соответствием совсем не обязательно изменение скорости синтеза всех видов белков. Значительно изменяется скорость трансляции в том случае, когда имеет место слабое взаимодействие данной тРНК с модулирующим триплетом определенной тРНК. Таким образом, гипотеза модуляции в современном виде является полезной рабочей концепцией, развитие которой может оказаться плодотворным и в практическом аспекте.

Заключая обсуждение приводимого в литературе значительного экспериментального материала и теоретических разработок проблемы регуляторной функции тРНК, есть основание сделать вывод, что регуляция скорости синтеза определенного белка на уровне трансляции может быть связана с тРНК-системой в такой же степени, как с количеством соответствующей иРНК, концентрацией субстратов и энергетическими ресурсами. Участие изоакцепторных тРНК в регуляторных механизмах, по-видимому, частично объясняет эволюцию вырожденности генетического

кода и гетерогенности тРНК. В то же время ясно, что в настоящий момент вопрос о регуляторной функции тРНК и АРСаз далек от однозначного решения и открывает широкие перспективы для исследований.

АДАПТАЦИЯ тРНК И АРСаз К СИНТЕЗУ СПЕЦИФИЧЕСКИХ БЕЛКОВ

Удачными модельными системами для изучения рассмотренной проблемы являются высокодифференцированные ткани с узкой специализацией, в которых происходит интенсивный синтез ограниченного числа специфических белков. К ним относится эпителий молочной железы, которая, по мнению ряда исследователей, является почти идеальным объектом для исследования вопросов регуляции белкового синтеза в животном организме. Процесс перехода ткани молочной железы из состояния функционального покоя (до первой лактации) в состояние лактации рассматривают как своеобразную клеточную дифференциацию. В период беременности эпителиальные клетки железы пролиферируют и, дифференцируясь, составляют ткань, обладающую уникальной способностью реализовывать генетическую информацию синтеза специфических белков молока. Экспериментально показано, что дифференциация альвеолярных клеток молочной железы связана с активацией определенных генов и синтезом новых иРНК [139, 140]. В разгар лактации белковый синтез в железе характеризуется необычно высокой скоростью и интенсивностью, причем синтезируются в основном два белка — казеиновый комплекс и β -лактоглобулин, существенно отличающиеся по аминокислотному составу от белков ткани железы [141—145].

Итак, налицо реализация новой генетической информации, которая осуществляется с необычайно высокой степенью скорости и интенсивности. Но известно, что первый этап декодирования генетической информации — это образование аминоксил-тРНК при участии специфических АРСаз. Существует ли корреляция между этими процессами — появлением в клетке новых активно транслируемых иРНК с определенным набором кодонов и образованием фонда аминоксил-тРНК, которые ответственны за их перевод с «нуклеинового на белковый язык»? Используется ли один и тот же количественный и качественный набор тРНК и АРСаз, в том числе спектр их изоформ, во все периоды жизнедеятельности молочной железы, либо он претерпевает существенные изменения с началом синтеза специфических белков молока? Изучению этих вопросов были посвящены экспериментальные исследования Г. Х. Мацуки и сотр. [146—150].

Прежде всего было изучено соотношение глутаминовых, лейциновых, фенилаланиновых и глициновых тРНК и АРСаз в суммарных препаратах, выделенных из молочной железы телки и лактирующей железы периода инволюции. Эти тРНК и АРСазы

были выбраны потому, что содержание соответствующих им аминокислот в казеине и β -лактоглобулине различно [151, 152]: глутамин > лейцин > фенилаланин > глицин. Особенно значительные различия установлены в содержании глутаминовой кислоты — 152 остатка в казеине, и глицина — 27 остатков.

Предпосылкой для постановки исследований именно в таком плане послужили единичные в то время данные об определенном

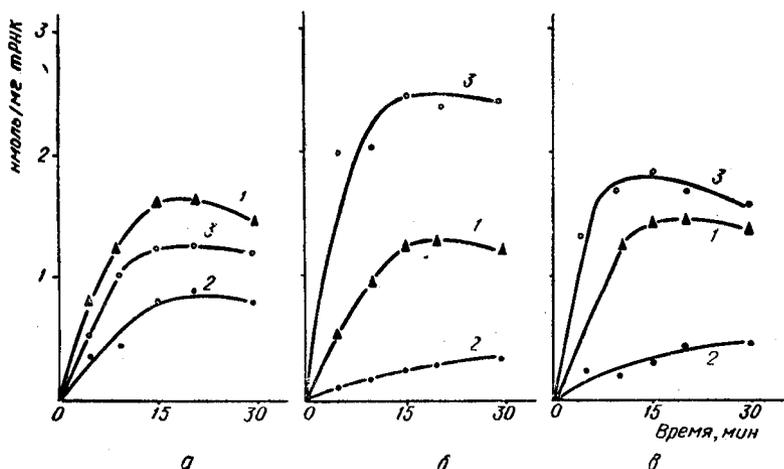


Рис. 12. Зависимость уровня образования фенилаланил-(1), глицил-(2) и глутамил-(3) тРНК железа телок (а), лактирующей (б) и железы периода инволюции (в) от времени инкубации.

соответствии фонда тРНК аминокислотному составу синтезируемых белков в целом. Ямане [153] установил этот факт для некоторых микроорганизмов, Матсузаки [154] — для шелководческой железы *Bombyx mori*. Слабая сторона последней работы — отсутствие четких доказательств соответствия уровня аминоацилирования количеству специфических тРНК в суммарном препарате.

Мы при проведении серии экспериментов по изучению набора тРНК особое внимание уделили достижению максимального уровня аминоацилирования, которое проводилось в присутствии оптимальных концентраций гомологичного фермента, АТФ, аминокислоты, Mg^{2+} и в оптимальных условиях проведения реакции (объем и pH инкубационной смеси, температура, время) для каждого вида тРНК (табл. 12).

Сопоставляя полученные данные с результатами исследования скорости присоединения соответствующих аминокислот к тРНК (рис. 12), можно сделать следующие выводы:

1. В суммарном препарате тРНК из ткани железы телок (белки молока никогда не синтезировались) нет значительной разли-

цы между содержанием глутаминовых, лейциновых, фенилаланиновых и глициновых тРНК.

2. В суммарном препарате тРНК из дифференцированной железы, синтезирующей специфические белки на 30% и состоящие из глутаминовой кислоты и лейцина, обнаружено значительное увеличение содержания соответствующих акцепторов, особенно по сравнению с тРНК^{Гли}, количество которой уменьшается почти в 3 раза.

Таблица 12

Уровень аминоацилирования суммарной тРНК молочной железы при разных функциональных состояниях, нмоль/мг

Аминокислота	До первой лактации	Лактация	Инволюция
Глу	1,34 ± 0,04 (7)*	2,39 ± 0,23 (9)	1,97 ± 0,24 (5)
Лей	1,15 ± 0,08 (7)	1,61 ± 0,09 (14)	0,74 ± 0,09 (7)
Фен	1,79 ± 0,06 (8)	1,36 ± 0,08 (8)	1,68 ± 0,12 (8)
Гли	0,90 ± 0,003 (8)	0,34 ± 0,04 (8)	0,48 ± 0,03 (8)

* В скобках указано число экспериментов.

3. В период инволюции органа, несмотря на практически полное прекращение синтеза белков молока, соотношение количества тРНК^{Глу, Фен, Гли} остается прежним, однако не наблюдается такой значительной разницы между содержанием тРНК^{Глу} и тРНК^{Гли}. Кроме того, резко уменьшается содержание тРНК^{Лей}.

Ниже приведены данные об изменении указанных тРНК в суммарном препарате (содержание тРНК^{Гли} принято за единицу):

Состояние железы	Глу	Лей	Фен	Гли
До первой лактации	1,5	1,3	2,0	1,0
Лактация	7,0	4,7	4,0	1,0
Инволюция	4,0	1,5	3,5	1,0

Правомочны ли сделанные выводы? Насколько содержание определенной тРНК в суммарном препарате определяется скоростью и максимальным уровнем аминоацилирования соответствующей аминокислотой? Есть целый ряд трудностей в проведении количественного аминоацилирования тРНК, обусловленных, в первую очередь, нуклеозными примесями, присутствием неактивных форм тРНК и молекул без акцепторного конца, стабильностью соответствующих АРСаз. Кроме того, плато максимального аминоацилирования определяется не только прямой реак-

цией образования аминоксил-тРНК, но и обратной — деацилированием, как ферментативным, так и неферментативным. Поэтому нами был проведен целый ряд контрольных экспериментов, позволивших исключить возможность существенного влияния какого-либо из перечисленных факторов.

Прежде всего было установлено, что получаемые нами препараты тРНК и АРСаз содержат минимальные примеси нуклеаз, действие которых в условиях, идентичных условиям проведения реакции аминокислирования, оказалось очень незначительным. Наличие биологически неактивных форм тРНК, имеющих иную пространственную структуру, было проверено прогреванием препаратов тРНК в присутствии Mg^{2+} при 60° — стандартной методикой, позволившей многим исследователям обнаружить неактивные молекулы как в микробных объектах, так и в животных тканях (см. главу 2). Оказалось, что препараты тРНК, выделенные из молочной железы при разных функциональных состояниях, не содержат неактивных форм тРНК^{Глу}, ^{Лей}, ^{Фен} ^{Гли}.

Еще одной из причин различий в скорости и уровне присоединения ряда аминокислот, в частности глутамата и глицина, к тРНК лактирующей железы может быть разная степень сохранности ЦЦА-конца у соответствующих индивидуальных тРНК. Акцепторный конец в присутствии АТФ и ЦТФ достраивается при участии специфических ферментов, содержащихся в «грубых» препаратах АРСаз. Нами обнаружено, что добавление ЦТФ в инкубационную смесь действительно повышает степень аминокислирования, особенно глицином, однако не настолько, чтобы объяснить низкий уровень присоединения глицина к тРНК лактирующей железы меньшей сохранностью ЦЦА-концов тРНК^{Гли} по сравнению с тРНК^{Глу}.

Чтобы исключить возможное влияние активности и стабильности соответствующих АРСаз (хотя в основных экспериментах, как уже указывалось, были использованы «насыщающие» концентрации ферментов), была изучена степень аминокислирования тРНК лактирующей железы глутаматом и глицином в присутствии АРСаз печени кролика. Выбор указанных АРСаз объясняется тем, что в гомологичной системе из ткани печени уровень включения глицина почти в два раза превышает включение глутамата. Однако и в присутствии АРСаз печени кролика глицин присоединяется в значительно (5 раз) меньших количествах, чем глутамат, несмотря на значительно меньшую стабильность глутамил-тРНК-синтетазы. Кроме того, нами показано, что уровень присоединения лейцина к тРНК лактирующей железы выше уровня присоединения глицина в несколько раз не только при наличии гомологичных АРСаз, но в присутствии АРСаз железы телок.

Есть данные, что активность некоторых АРСаз резко зависит от концентрации аминокислоты [155, 156]. Проведение контрольных экспериментов показало, что для максимального образова-

ния глицил-тРНК лактирующей железы достаточно 0,02 мкмоль глицина в пробе, а для образования глутамил-тРНК необходимо в 10 раз больше аминокислоты. Следовательно, вносимое в инкубационную смесь количество глицина (0,2 мкмоль) значительно превышает минимальную потребность в нем и не может быть причиной низкого уровня присоединения этой аминокислоты к тРНК лактирующей железы.

Более сложной является проблема деацилирования изучаемых аминоксил-тРНК в инкубационной смеси. Деацилирование может быть неферментативным и ферментативным процессом, не зависящим от присутствия АТФ и ПФ, и характеризуется отсутствием строгой специфичности. Абсолютную скорость обоих видов процесса деацилирования можно определить с помощью довольно сложных методических подходов. Мы в контрольных экспериментах ограничили сравнением скорости суммарного деацилирования глицил- и глутамил-тРНК лактирующей железы в инкубационной смеси, начиная с момента распада образовавшихся за оптимальное время инкубации аминоксил-тРНК. Полученные данные свидетельствуют о практически одинаковой скорости деацилирования глицил- и глутамил-тРНК в указанных условиях.

Таким образом, изучив и отвергнув целый ряд факторов в качестве основной причины разной степени аминокислотирования тРНК отдельными аминокислотами, мы пришли к заключению, что максимальный уровень аминокислотирования суммарной тРНК данной аминокислоты в основном определяется количеством соответствующей индивидуальной тРНК. Этот критерий, не являющийся абсолютно количественным, используют в настоящее время все исследователи, изучающие набор тРНК в суммарном препарате [157, 158].

Косвенным доказательством изменения соотношения отдельных индивидуальных тРНК в суммарных препаратах служат также полученные нами данные о разнице в содержании некоторых минорных нуклеотидов в составе суммарной тРНК железы телок и лактирующей железы (табл. 13). Известно, что отдельные индивидуальные тРНК особенно заметно отличаются набором минорных компонентов в их первичной структуре [6].

Кроме указанных в табл. 13 минорных компонентов, нам удалось достоверно показать в щелочных гидролизатах обоих препаратов тРНК наличие 1-метил-ГМФ, N₂-метил-ГМФ и N₂-диметил-ГМФ.

Итак, анализируя данные основных и контрольных экспериментов, можно прийти к выводу, что набор тРНК в молочной железе не является неизменным, и в процессе дифференциации ткани с началом синтеза специфических белков молока устанавливается определенное соответствие между соотношением отдельных индивидуальных акцепторов в их суммарном препарате и соотношением аминокислотных остатков в молекулах белков молока.

Функционирование тРНК невозможно без специфических ферментов, поэтому естественно возникает вопрос, изменяется ли набор или активности соответствующих АРСаз при таких резких изменениях соотношения индивидуальных тРНК в ткани молочной железы.

Таблица 13

Содержание минорных компонентов суммарной тРНК
железы телок и лактирующей железы, моль на 100 моль
УМФ

тРНК	фУМФ	N ₂ -метил-ГМФ	N ₆ -метил-АМФ**
Лактирующей железы (M ₁)	25,0	7,1	4,0
Железы телок (M ₂)	19,0	6,5	5,2
Разница (M ₁ -M ₂)	+6,0	+0,6	-1,2
Число опытов (n*)	10	10	10
Достоверность (P)	0,001	0,05	0,01

* Результат каждого опыта получен при исследовании материала, элюированного с четырех хроматограмм.

** Есть указания, что N₆-метил-АМФ образуется из N₁-метил-АМФ в щелочной среде [80].

Было проведено сравнение количества единиц активности глутаминовых, лейциновых, фенилаланиновых и глициновых АРСаз в суммарных препаратах, выделенных из железы телок и лактирующей железы периода инволюции. За единицу активности условно было принято количество белка, в присутствии которого к тРНК присоединяется 1 пкмоль аминокислоты за 1 мин. При проведении исследований такого рода, кроме установления оптимальных условий действия каждой АРСазы (ионная сила, рН среды, температура и т. д.), необходимо решить две основные задачи:

1. Найти прямолинейный участок зависимости образования аминоацил-тРНК от времени инкубации и концентрации фермента в пробе для каждого вида изучаемых АРСаз из каждого вида ткани.

2. Установить концентрации всех субстратов, не лимитирующие начальную скорость образования (V_0) соответствующих аминоацил-тРНК.

Все исследования проводили при температуре 37°, так как для изучаемых АРСаз V_0 в этом случае значительно выше, чем при 25 и 30°. Концентрации трис-НСI буфера и КСI — 50 и 5 мкмоль в 0,5 мл пробы — оптимальны для всех АРСаз. V_0 реакции аминоацилирования во всех случаях определяли при рН инкубационной смеси равном 7,5, так как, несмотря на разные размеры диапазона оптимальных значений рН для изучаемых АРСаз, значение 7,5 находится в этом диапазоне.

Результаты определения прямолинейных участков зависимости образования аминокил-тРНК от времени инкубации и концентрации белка суммарного препарата АРСаз представлены на рис. 13 и 14. Исходя из полученных данных, количество единиц активности каждой АРСазы определяли, инкубируя реакционную смесь 3 мин и внося в пробу 100 мкг белка.

Изучение концентраций тРНК, аминокислоты, АТФ и Mg^{2+} , не лимитирующих начальную скорость реакции, показало, что они довольно близки для глутамил-, лейцил-, фенилаланил- и

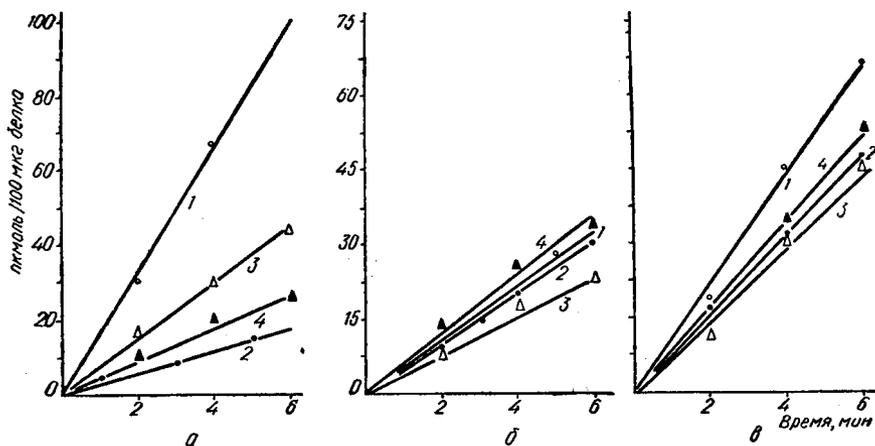


Рис. 13. Зависимость уровня образования глутамил-(1), глицил-(2), лейцил-(3) и фенилаланил-(4) тРНК лактирующей железы (а), периода инволюции (в) и железа телок (б) от времени при концентрации АРСаз 100 мкг/0,5 мл.

глицил-тРНК-синтетаз молочной железы и составляют при 100 мкг фермента в 0,5 мл пробы: 200—250 мкг тРНК, 2—3 мкмоль АТФ, 0,25—0,4 мкмоль аминокислоты, 3—5 мкмоль $MgCl_2$. Исключением являются системы, содержащие лейцил-тРНК-синтетазы лактирующей железы, в которых количество АТФ должно быть не меньше 5 мкмоль, а лейцина — 0,4—0,8 мкмоль и глицил-тРНК-синтетазы железы периода инволюции, где повышена потребность в глицине (не менее 0,4 мкмоль). В данной серии экспериментов проводили изучение оптимальных концентраций Mg^{2+} , так как есть данные, что в реакции участвует не просто АТФ, а АТФ— Mg -комплекс. Об этом в определенной степени свидетельствуют и наши данные, в частности обнаружение взаимосвязанности оптимальных концентраций АТФ и $MgCl_2$ при изучении V_0 образования лейцил-тРНК.

При изучении кинетики образования сравниваемых аминокил-тРНК (рис. 13) мы установили, что V_0 образования лейцил- и глутамил-тРНК значительно выше V_0 образования глицил-тРНК лактирующей железы. Низкая глицил-тРНК-синтетазная

активность суммарного препарата АРСаз лактирующей железы по сравнению с лейцил- и глутамил-тРНК-синтетазными активностями продемонстрирована также экспериментами по изучению V_0 как функции концентрации ферментного препарата (рис. 14). В то же время в системах из ткани железы телок и железы периода инволюции таких существенных различий не обнаружено. С целью исключения влияния разной стабильности отдельных АРСаз в опыты брали ферментные препараты, выделенные без и

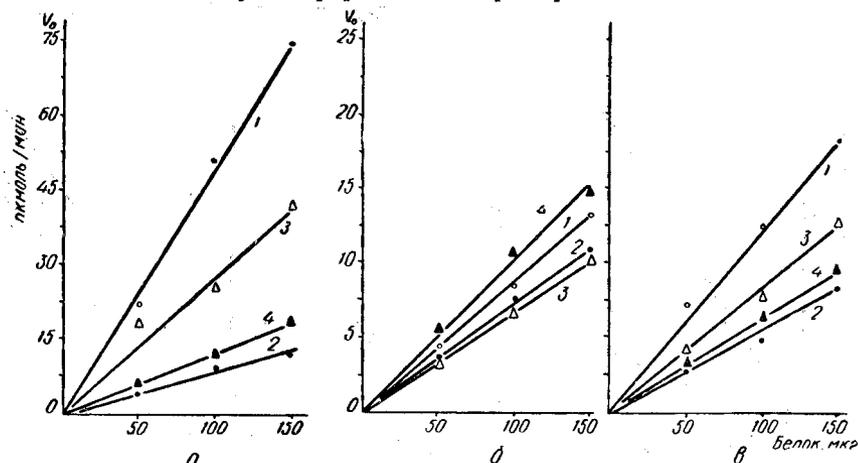


Рис. 14. Зависимость образования глутамил-(1), глицил-(2), лейцил-(3) и фенилаланил-(4) тРНК лактирующей (а), железы периода инволюции (б) и железы телок (в) от концентрации суммарного препарата АРСаз.

в присутствии глицерина, меркаптоэтанола, сразу после получения и в процессе хранения АРСаз в замороженном состоянии. С этой же целью было проведено также сравнение АРСазных активностей суммарного ферментного препарата из лактирующей железы крольчихи, поскольку в этом случае ткань железы использовали сразу после забоя животных без предварительного замораживания. Полученные результаты согласуются с данными исследования препаратов из лактирующей железы коров и свидетельствуют о резком возрастании содержания лейцил- и, особенно, глутамил-тРНК-синтетазной активности в суммарном препарате после дифференциации молочной железы с началом синтеза специфических белков молока, которые, как мы уже указывали, содержат в основном глутамат и лейцин:

Состояние железы	Глу	Лей	Фен	Гли
До первой лактации	1,5	0,9	1,2	1
Лактация	8,5	3,4	1,2	1
Инволюция	2,0	1,1	1,1	1

* Глицил-тРНК-синтетазная активность принята за единицу.

Следовательно, увеличение содержания тРНК^{Лей} и тРНК^{Глу} в связи с синтезом специфических белков тканью молочной железы сопровождается увеличением соответствующих АРСазных активностей, что может зависеть либо от активации ферментов, либо от увеличения их концентрации в суммарном препарате. Последнее объяснение нам кажется более правильным, если учесть современный уровень знаний о структуре и синтезе аминоксил-тРНК-синтетаз.

Сопровождается ли изменение наборов транспортных РНК и АРСаз изменением соотношения соответствующих аминоксил-тРНК в их общем фонде ткани молочной железы после ее дифференциации? Чтобы ответить на этот вопрос, мы использовали способность NaIO_4 инактивировать свободные тРНК и не реагировать с гидроксильной группой аминокислотированных форм транспортных РНК. Такой подход дает возможность приблизительно оценить содержание аминоксил-тРНК в ткани *in vivo*. Постановка исследований не отличалась от подхода, использованного другими авторами, изучавшими уровень аминокислотированных форм тРНК у бактерий и в животных тканях [161]. Сравнивали содержание глутамил- и глицил-тРНК, поскольку, по данным контрольных экспериментов, периоды их полужизни существенно не различаются. Оказалось, что содержание глицил-тРНК в молочной железе при разных функциональных состояниях практически одинаково, в то время как содержание глутамил-тРНК резко возрастает в период лактации и превышает количество аминокислотированных транспортных РНК^{Гли} более чем на порядок. Кроме того, полученные данные свидетельствовали о том, что повышенному содержанию транспортных РНК и аминоксил-тРНК-синтетаз в суммарных препаратах соответствует относительно высокое содержание соответствующей аминоксил-тРНК *in vivo*.

К сожалению, мы не имели возможности изучить вопрос о том, что предшествует во времени — появление РНК для белков молока в цитоплазме или установление соответствия фонда аминоксил-тРНК аминокислотному составу этих белков, другими словами — набору кодонов новых иРНК. Возможно, эти процессы протекают координированно и одновременно под контролем общего регуляторного механизма.

Вопрос о соответствии набора тРНК аминокислотному составу специфических белков первым исследовал Матсузаки [154] на шелковыделительной железе *Bombyx mori*.

Результаты наших исследований, опубликованные в 1968 г. [146], впервые четко продемонстрировали, что количественное соответствие фонда тРНК аминокислотному составу специфических белков устанавливается в процессе дифференциации узкоспециализированных клеток. В настоящее время уже ясно, что это явление имеет универсальный характер, поскольку существование его подтверждено рядом зарубежных исследователей на

других объектах. Так, получили дальнейшее развитие работы по синтезу фиброина [15, 162—164]. Были установлены различия в фондах тРНК из разных частей железы *Bombux mori*: в задней части железы синтезируется фиброин, а в средней — серицин, отличающиеся аминокислотным составом. Обнаружено возрастание акцепторной активности тРНК грануляционной ткани по глицину, пролину и лизину — основным аминокислотам коллагена в процессе усиления синтеза этого белка [165]. Установлена адаптация фонда тРНК к синтезу кристаллина для клеток внутренней зоны хрусталика глаза [157].

В 1971—1974 гг. опубликована серия работ по специализации тРНК ретикулоцитов кролика [28, 158, 166, 167]. Сравнение количественных наборов тРНК в суммарных препаратах из ретикулоцитов в печени кролика показало, например, большее содержание тРНК^{Гис} и меньшее — тРНК^{Иле} в ретикулоцитах в соответствии с аминокислотным составом гемоглобина [158]. Более того, изучение тРНК ретикулоцитов овец, несущих разные аллели гена гемоглобина, продемонстрировало увеличение акцепторной активности по изолейцину в три раза в случае синтеза гемоглобина С, содержащего два остатка изолейцина по сравнению с гемоглобинами В и А, в которых эта аминокислота отсутствует. Подобная корреляция установлена и для элонгаторной тРНК^{Мет} [168].

Преимущества использованной нами модельной системы позволили сделать еще один важный вывод. В узкоспециализированных клетках, дифференциация которых завершена, пропорции синтеза отдельных индивидуальных тРНК не являются неизменными, а зависят от уровня синтеза специфических белков. Так, мы обнаружили, что в период инволюции молочной железы, когда синтез белков молока практически прекращается, вновь уменьшается содержание тРНК^{Гли} и особенно тРНК^{Лей} и возрастает концентрация глициновых и фенилаланиновых тРНК по сравнению с препаратами из железы, активно синтезирующей казеиноген и β-лактоглобулин. Другой, принципиально новый вывод, который следует из проведенных нами исследований, — это изменение количественного соотношения некоторых АРСазных активностей в клетках молочной железы в зависимости от интенсивности и направленности белкового синтеза, причем наблюдается определенная корреляция с набором тРНК, а в период лактации — с аминокислотным составом специфических белков. К настоящему времени в литературе описан лишь единственный случай одновременного увеличения содержания сериновой тРНК и синтетазы в суммарных препаратах из печени кур-несушек по сравнению с неполовозрелыми цыплятами [117], что связано с синтезом белков, богатых фосфосерином. Вне прямой зависимости от синтеза определенного вида белков изменение обнаружено при дифференциации ряда растительных и животных клеток [95, 102, 169, 170].

В настоящий момент несколько недооценивается значение изменения концентрации АРСаз в клетках, возможно, в связи с отсутствием большого и четкого экспериментального материала. Однако на основании имеющихся данных и теоретических расчетов можно считать, что изменение содержания определенных АРСаз в клетке может быть весьма существенно для скорости трансляции. Показано, что кинетика включения аминокислоты в белки в системе *in vitro* может быть описана следующим уравнением:

$$V = \frac{V_{max} \times [aa \text{ тРНК}]}{K + [aa \text{ тРНК}]}$$

Значение K близко к значению K_m для аминоксил-тРНК синтетазы по тРНК. В этом случае, по расчетам Бонета и Эбеля, двукратное уменьшение концентрации фенилаланил-тРНК-синтетазы в дрожжевых клетках приведет к уменьшению скорости биосинтеза белков на 6%. Теоретические расчеты авторов хорошо согласуются с экспериментальными данными других исследователей [171].

Следовательно, обнаруженное нами увеличение содержания глутаминовых и лейциновых тРНК и АРСаз, а в результате — лейцил- и глутамил-тРНК при лактации не просто обеспечивает иРНК-рибосомный комплекс строительным материалом, но существенно для высокой скорости включения этих аминокислот в полипептидную цепь. Весьма возможно, что соответствие фонда аминоксил-тРНК аминокислотному составу интенсивно синтезируемых специфических белков обеспечивает в определенной мере и точность декодирования. Учитывая современные представления о физических механизмах «рибосомального сита» [172], это предположение весьма вероятно.

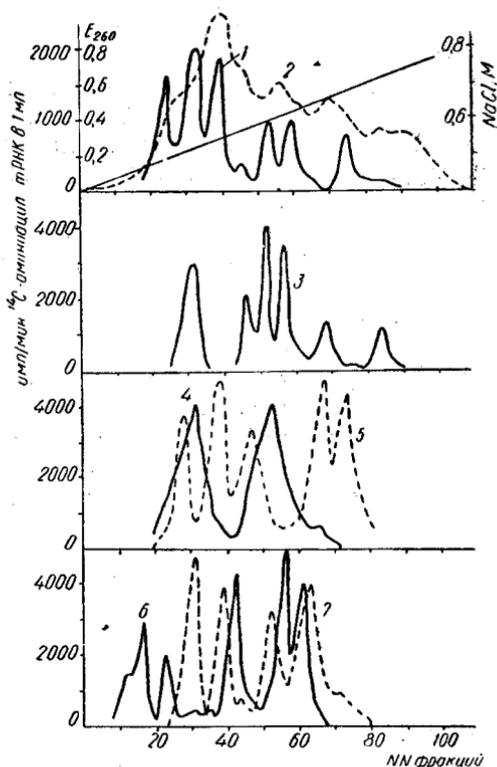


Рис. 15. Хроматографическое разделение изоакцепторных тРНК лактирующей молочной железы в обращенной фазе, система 5 по Келмерсу:

1 — Лей, 2 — о. е., 3 — Глу, 4 — Лиз, 5 — Сер, 6 — Мет, 7 — Гли.

Обсуждая в начале главы обширную литературу, мы подробно рассмотрели вопрос о том, что вариабельность наборов изоакцепторных тРНК при различных физиологических и патологических изменениях жизнедеятельности микробияльных, растительных и животных клеток послужила основой для создания гипотез регуляторной функции тРНК. Связан ли синтез специфических белков молока с изменением спектров изоформ тРНК, появляются ли новые адапторные молекулы в период интенсивного считывания новых для клетки информационных РНК? Мы сравнили спектры изоакцепторных тРНК^{Лей, Глу, Лиз, Гли, Мет и Сер} недифференцированной эпителиальной ткани железы телок, лактирующей железы и в период инволюции органа. Для того чтобы избежать примесей тРНК из других видов клеток, которые частично остаются даже при самом тщательном препарировании железы, получали взвесь эпителиальных клеток обработкой измельченной ткани растворами трипсина и коллагеназы с тестированием однородности препарата микроскопированием мазков. Гетерогенность тРНК изучали наиболее эффективным в настоящее время методом — хроматографией в обращенной фазе, система 5 по Келмерсу (рис. 15). Фракционировали как свободные, так и аминокислотированные тРНК, поскольку эти методические подходы дополняют контролируют друг друга. Результаты экспериментов по каждому виду тРНК представлены в табл. 14.

Таблица 14

Гетерогенность тРНК молочной железы при разных функциональных состояниях

Источник тРНК	Число изоакцепторных тРНК					
	Глу	Лей	Мет	Сер	Гли	Лиз
Железа телок	4	5	5	5	4	2
Лактирующая железа	6	6	5	5	4	2
Железа периода инволюции	6	4	5	5	4	2

Из изученных нами тРНК наименьшая гетерогенность свойственна лизинновым тРНК. Интересно, что другие авторы при изучении как микробияльных объектов, так и животных тканей (печень теленка, крыс, цыплят) также обнаружили лишь лизинновые тРНК [70, 173]. Однако возможно, что небольшое плечо после каждого из двух основных компонентов (рис. 15) обнаруженных нами лизил-тРНК соответствует тем минорным фракциям тРНК^{Лиз}, наличие которых почти во всех животных тканях показано в одной из недавних работ [147]. Изучение тРНК^{Лей, Сер и Мет} еще раз подтвердило положение о том, что далеко не всегда большая гетерогенность тРНК соответствует большей вы-

рожденности кода. Так, шести кодонам Лей и Сер соответствуют 5—6 лейциновых и сериновых тРНК молочной железы, что само по себе, конечно, не является свидетельством того, что каждому кодону соответствует своя изоакцепторная тРНК. В то же время мы обнаружили 5 изоакцепторных тРНК^{Met}, а известно, что для метионина, кроме инициаторного, существует лишь один кодон. Интересно, что по сравнению со всеми описанными в литературе объектами, наибольшая гетерогенность, как нами установлено, свойственна тРНК^{Глу} из молочной железы (4—6 фракции).

И, наконец, рассмотрим наиболее важные для задачи наших исследований данные об изменении спектра изоакцепторных тРНК молочной железы в зависимости от интенсивности и качественного набора синтезируемых белков. К сожалению, мы не имели возможности использовать двойную метку во всех экспериментах, поэтому не можем судить о количественном перераспределении отдельных фракций тРНК или о смещении их положения при хроматографии. В результате, в отношении тРНК^{Met}, Сер, Гли, Лиз

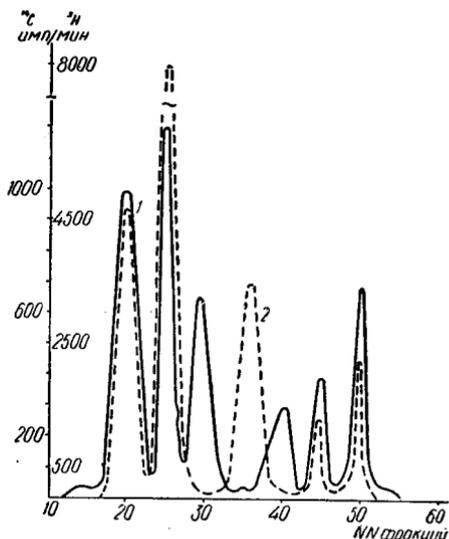


Рис. 16. Хроматография ¹⁴C-лейцил-тРНК лактирующей железы (1) и ³H-лейцил-тРНК железы телок (2) в обращенной фазе, система 5 по Келмерсу.

нами установлено лишь, что число изоакцепторных молекул во все периоды жизнедеятельности молочной железы одинаково. В то же время обнаруженное нами ранее увеличение содержания тРНК^{Глу}. Лей в период синтеза специфических белков сопровождается увеличением числа изоакцепторных фракций — с четырех глутаминовых и пяти лейциновых в недифференцированной ткани до шести. С помощью хроматографии ¹⁴C- и ³H-аминоацил-тРНК в ХОФ-5 системе нам удалось обнаружить, что в этот период не просто появляется новая фракция тРНК^{Лей}, а происходит замена одного из компонентов тРНК^{Лей} железы телок двумя минорными (рис. 16). Кроме того, изменяется соотношение отдельных изоакцепторных тРНК, общих для тРНК^{Лей} из обоих видов ткани: недифференцированной и дифференцированной. Интересно, что в период инволюции с прекращением синтеза белков молока число глутаминовых изоакцепторных тРНК сохраняется, а из лейциновых две фракции исчезают либо нахо-

дятся в очень малых количествах, не определяемых данным методом. Меньшее число фракций лейцил- и глутамил-тРНК в клетках молочной железы, не синтезирующих специфические белки, связано, прежде всего, с отсутствием соответствующих изоакцепторных тРНК, поскольку добавление в инкубационную смесь АРСаз лактiruющей железы не влияет на профиль элюции лейциновых и глутаминовых тРНК железы телок и железы периода инволюции.

Таблица 15

Уровень аминокислотирования высокоочищенных тРНК^{Лей} и тРНК^{Фен} лактiruющей железы гомо- и гетерологичными АРСазами, имп/мин на 1 мг тРНК $\times 10^{-4}$

Вид АРСаз	Изоакцепторные тРНК ^{Лей}					
	1	2	3	4	5	6
Лактирующей железы	4,2	5,0	3,2	10	5,7	11,9
Железы телок	4,6	4,7	3,9	0	4,2	13,6
	Изоакцепторные тРНК ^{Фен}					
	1	2	3			
Лактирующей железы	2,1	2,8	1,3			
Железы телок	0,9	2,4	1,5			

При хроматографическом разделении неаминоацилированных тРНК лактiruющей железы в обращенной фазе по Келмерсу мы имели возможность проверить, все ли фракции тРНК^{Лей} способны взаимодействовать с гетерологичным ферментом. Оказалось, что тРНК^{Лей}₄ либо совсем не аминокислотится АРСазами железы телок, либо в значительно меньшей степени (на 50—80%) по сравнению с уровнем присоединения лейцина в присутствии «собственного» фермента. Колебания в степени аминокислотимости тРНК^{Лей}₄ АРСазами железы телок могут зависеть от примеси соседних фракций, особенно тРНК^{Лей}₅, которая полностью аминокислотится гетерологичным ферментом. Для окончательного вывода необходимо было получить высокоочищенные препараты всех тРНК^{Лей}.

В главе 1 детально описано, как последовательной хроматографией на двух колонках с БД-целлюлозой и затем в обращенной фазе по Келмерсу (система 5) нам удалось получить высокоочищенные препараты шести изоакцепторных тРНК^{Лей} лактiruющей железы и три тРНК^{Фен}. В стандартных условиях проведения реакции аминокислотирования все тРНК^{Лей}, кроме 4-й

фракции, взаимодействуют с гетерологичным ферментом из недифференцированной железы. В отличие от тРНК^{Кей} все три изоакцепторные тРНК^{Фен} аминоацилируются гетерологичным ферментом, хотя первый минорный компонент аминоацилируется в значительно меньшей степени (табл. 15).

Таким образом, описанный ранее факт снижения уровня аминоацилирования суммарных тРНК гетерологичными АРС-азами в стандартных условиях проведения реакции получает еще

Таблица 16

Очистка трех форм лейцил-тРНК-синтетазы лактирующей железы коров

Стадии очистки	Белок, мг	Удельная активность, $\frac{\text{имп/мин}}{\text{мг}} \times 10^{-3}$	Общая активность, $\frac{\text{имп/мин}}{\text{мг}} \times 10^{-6}$	Кратность очистки	Выход, %
Исходный экстракт	8200	2,5	20,5		100
Супернатант, 105 000 × g	4800	3,76	18,0	1,5	83
ДЭАЭ-целлюлоза, pH 8,0					
I*	420	33,3	14,0	13,2	
II	78	40,0	3,1	16,0	92
III	90	32,3	2,9	12,9	
ДЭАЭ-целлюлоза, pH 6,5					
I	80	90,0	7,2	36,0	
II	7	121,0	0,84	48,4	42
III	7	96,6	0,67	38,6	
ГАП					
I	7,5	502,0	3,75	200	
II	0,27	375,0	0,10	150	19,4
III	0,28	400,0	0,11	160	

* — номер компонента лейРС по положению на хроматограмме.

одно объяснение: некоторые минорные изоакцепторы лактирующей железы в не меньшей степени взаимодействуют с АРСазами из недифференцированной железы. Необходимо еще раз обратить внимание, что речь идет о стандартных условиях проведения реакции, т. е. в гомо- и гетерологичных системах использовали одинаковые концентрации субстратов и фермента, одинаковым было время инкубации и т. д.

Так как тРНК₄^{Лей} является наименьшим компонентом лейциновых тРНК лактирующей железы, нам удалось получить ее в очень ограниченном количестве — 3 о. е. из 56 400 о. е. суммарного препарата. Поэтому мы не смогли проверить влияние всех факторов на аминоацилирование этой изоакцепторной фракции АРСазами железы телок и не можем говорить об абсолютной специфичности.

Способность одного и того же фермента по-разному взаимодействовать с гетерологичными изоакцепторными тРНК показана также в работах других авторов [95, 97, 175, 176]. Особый интерес представляют данные, полученные на высших организмах при дифференциации и развитии. Так, фермент из 21-дневных зародышей сои по сравнению с 5-дневным характеризовался уменьшением способности ацилировать изоакцепторные тРНК₁₋₄^{Лей}, в то время как способность взаимодействовать с тРНК₅₋₆^{Лей} оставалась высокой [101]. В лаборатории Цахау [97] установлено, что препарат АРСаз из яиц морского ежа аминокислоты ацилирует преимущественно вторую фракцию тРНК^{Лей} и в значительно меньшей степени — первую, а фермент из оплодотворенных яиц — наоборот. Недавно американскими учеными [177] было обнаружено появление новой лейциновой тРНК в печени крыс через 3 ч после введения гидрокортизона. АРСазы из печени животных не взаимодействуют с этой фракцией, хотя в полной мере

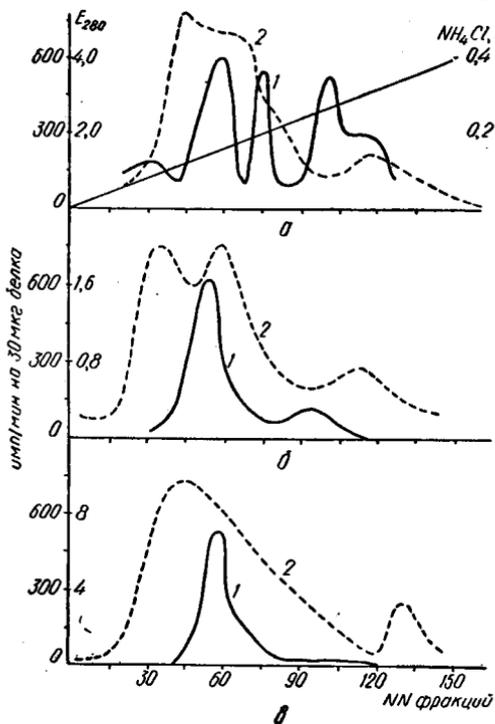


Рис. 17. Хроматография лейцил-тРНК-синтетазы лактирующей железы (а), периода инволюции (б) и железы телок (в) на ДЭАЭ-целлюлозе, рН 8,0 в одинаковых условиях:

1 — радиоактивность, 2 — оптическая плотность.

аминоацилируют остальные. Механизмы, лежащие в основе перечисленных фактов, пока достоверно не установлены.

Чтобы подойти к более углубленному изучению проблемы, мы предприняли попытки получить высокоочищенную лейцил-тРНК-синтетазу (лейРС) из молочной железы коров. Наиболее эффективным приемом оказалась хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе и гидроксиапатите (табл. 16), причем нам удалось обнаружить любопытный факт — разделение лейРС лактирующей железы на три компонента во всех хроматографических системах (рис. 17, а).

При рехроматографии в других системах каждый компонент элируется одним пиком. Изучение лейцил-тРНК-синтетазы из железа, не синтезирующей специфические белки молока, показало, что в тех же условиях хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе фермент элируется одним компонентом, причем его положение на хроматограмме соответствует первому компоненту из лактирующей железы (рис. 17, б, в).

Не является ли наличие трех форм лейРС лактирующей железы следствием протеолиза или агрегации? Чтобы ответить на этот вопрос, мы изучили молекулярные веса трех форм лейРС лактирующей железы и лейРС железы телок методом гельфильтрации на сефадексе. Суммарный препарат лейРС разделяется на сефадексе Г-200 на три компонента с молекулярным весом 180 000, 260 000 и более 300 000 дальтон. При исследовании очищенных форм лейРС (рис. 18) было установлено, что наименьшим молекулярным весом обладает I компонент — 180 000 ± 6000, а наибольшим — III компонент, который элируется во внешнем объеме колонки (V_0). Молекулярный вес 270 000 ± 10 000 соответствует II форме фермента. ЛейРС железы телок элюируется одним пиком, причем

объем элюции (V_e) и, следовательно, молекулярный вес его совпадает с таковым первой формы лейРС лактирующей железы. Таким образом, дополнительные фракции фермента в дифференцированной железе имеют большой молекулярный вес, что исключает ограниченный протеолиз как единственную причину их появления. Не исключено, однако, что ограниченный протеолиз сопровождается агрегацией поврежденных молекул. Нам кажется, что этому предположению противоречит следующий факт: компоненты лейцил-тРНК-синтетазы всегда элюируются с ДЭАЭ-целлюлозы тремя пиками одними и теми же концентрациями NaCl в одинаковых количественных соотношениях, независимо от добавления или отсутствия мощных

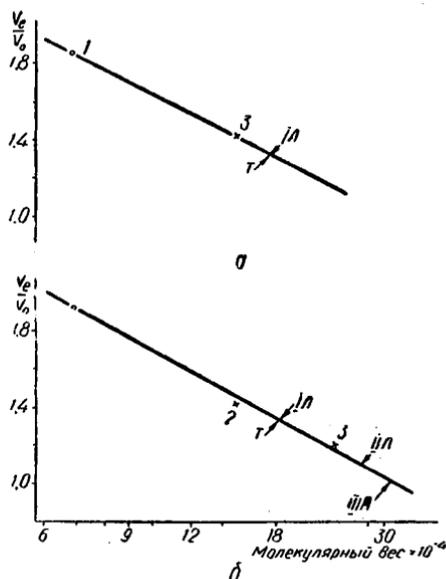


Рис. 18. Определение молекулярного веса трех форм лейцил-тРНК-синтетазы лактирующей железы (I, II, III) и железы телок (Т) методом гельфильтрации на сефадексе Г-150 (а) и Г-200 (б): маркеры: 1 — бычий сывороточный альбумин (69 000), 2 — глюкозооксидаза (150 000), 3 — каталаза (240 000).

ингибиторов протеаз (типа диизопропилфторфосфат) и времени хроматографии.

В дальнейших экспериментах мы получили в высокоочищенном состоянии все три компонента лейРС лактирующей железы и изучили их термостабильность. Установление в результате кинетических исследований константы инактивации представлены ниже:

	I	II	III
<i>M</i>	0,049	0,047	0,117
$\pm m$	0,0064	0,0021	0,0072
<i>n</i>	8	4	4

$$p < 0,001$$

Как видно из приведенных данных, третий компонент отличается повышенной термостабильностью по сравнению с двумя первыми. Однако последние, имея практически одинаковые *K* при обчете кинетических кривых инактивации в течение 30—50 мин, отличаются термостабильностью в первые 5 мин прогрева при 40°. Различия были обнаружены также при изучении спектров поглощения трех форм фермента в ультрафиолетовой области. Максимумы поглощения I и II форм совпадают и соответствуют 280 нм, а максимум поглощения III лейРС растянут и соответствует 256—272 нм, т. е. сдвигу в зону более коротких длин волн.

Все приведенные данные по исследованию разных форм лейРС лактирующей железы свидетельствуют о различиях в их структуре, однако не являются доказательством истинной множественности фермента. Например, есть основания считать, что III форма — особый вид агрегации фермента с тРНК либо рибосомальной РНК. К настоящему времени накопилось достаточное количество данных о склонности АРСаз эукариотов к комплексообразованию с другими видами ферментов, с тРНК и рибосомами [178]. Возможно, комплексы подобного рода более эффективны при той скорости белкового синтеза, которая наблюдается в молочной железе при лактации.

Вообще, вопрос о возможности существования истинных изоформ АРСаз, с нашей точки зрения, далек от однозначного решения, хотя многие авторы показали их гетерогенность при хроматографии либо представили другие косвенные доказательства. Интересно, что большинство таких результатов получено при изучении именно лейцил-тРНК-синтетаз высших организмов [97, 113, 177, 179, 180]. Однако надежные выводы, по-видимому, будут возможны лишь после сравнения не только субъединичности строения, но и первичных структур различных форм одного фермента.

Возникает вопрос, не является ли I компонент лейРС лактирующей железы тем ферментом, который функционирует в же-

лезе телок. С целью изучения этой проблемы мы проверяли способность всех трех компонентов фермента из лактирующей железы взаимодействовать с шестью изоакцепторными тРНК^{Лей}, разделенными хроматографией в обращенной фазе.

В ряде случаев получены статистически достоверные различия в уровнях аминокислотирования тРНК^{Лей} (1—4) разными формами фермента в основном в отношении III формы. Однако эти различия могут быть обусловлены низкой термостабильностью лейРС III. Для нас важен вывод, что лейРС I способна аминокислотировать все изоакцепторные тРНК^{Лей} и этим отличается от фермента железы телок. Несмотря на способность фермента аминокислотировать все изоакцепторные тРНК, сродство его к ним и особенности взаимодействия могут быть различны. Об этом, в частности, свидетельствуют наши данные о предохраняющем действии тРНК^{Лей} при термоинактивации I формы лейРС (рис. 19). Интересно, что стабилизирующим действием обладает тРНК^{Лей} — компонент, характерный для периода лактации. В присутствии приблизительно 2 молей тРНК на 1 моль лейРС остаточная активность фермента сохраняется до 75% после 30-минутной анактивации при 40° в отличие от 15% в отсутствие тРНК или при наличии той же концентрации тРНК^{Лей} — компонента, увеличение содержания которого характерно для железы телок.

На основании всех описанных результатов по изучению лейРС молочной железы при разных функциональных состояниях органа мы считаем возможным выдвинуть рабочую гипотезу о смене молекулярных форм этого фермента в процессе дифференциации секреторного эпителия. Новый фермент, возможно, существует в виде двух изоформ (мол. вес — 180 000 и 270 000) и способен участвовать в образовании структур более высокого порядка (мол. вес 300 000). Наше предположение основано не только на данных собственных исследований, но и на выводах других авторов, изучавших лейРС высших организмов. Сахау [97], например, высказал предположение, что оплодотворение и развитие яиц морского ежа связано с модификацией лейцил-тРНК-синтазы.

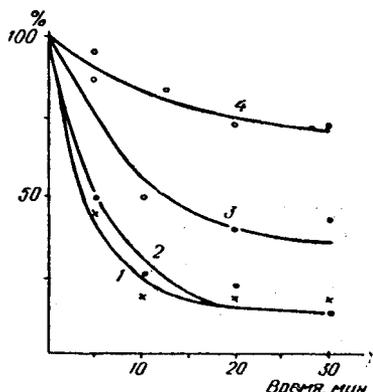


Рис. 19. Кинетика инактивации I формы лейцил-тРНК-синтазы лактирующей железы без и в присутствии тРНК^{Лей} и тРНК^{Лей}:
 1 — 5,10 мкг тРНК₂^{Лей}, 2 — без тРНК,
 3 — 5 мкг тРНК₃^{Лей}, 4 — 10 мкг тРНК₃^{Лей}.

Целенаправленное изучение этого вопроса в будущем если и не подтвердит правоту предложенной гипотезы, то безусловно окажется плодотворным для исследования структуры и функции АРСаз — ферментов, обеспечивающих декодирование генетической информации на первых этапах биосинтеза белка. Таким образом, синтез специфических белков молока сопровождается не только увеличением содержания глутаминовых и лейциновых тРНК и АРСаз, но и увеличением степени гетерогенности тРНК^{Лей, Глу} и лейРС. Следовательно, молочная железа в период синтеза специфических белков, как и другие узкоспециализированные ткани, имеет, по образному выражению А. Н. Белозерского [6], особый «язык трансляции». Прежде чем приступить к обсуждению значения обнаруженной адаптации количественных и качественных наборов тРНК и АРСаз к синтезу специфических белков молока, следует кратко рассмотреть ту цепь событий, которые происходят в клетках молочной железы при их дифференциации. Как известно, роль и развитие молочной железы контролируется гормонами гипофиза, яичников, надпочечников, щитовидной и поджелудочной желез. Дифференциация эпителия протоковой системы связана с синергическим действием инсулина, гидрокортизона и пролактина, которые, как показано на тканевых культурах, индуцируют пролиферацию клеток, а затем синтез специфических белков молока [181].

О всей сложности происходящих процессов дают представление недавние работы по влиянию гормонов на синтез гистонов и кислых ядерных белков [182], ацетилирование и фосфорилирование [183, 184], включение метки в тотальную РНК [185] и быстрометящуюся ядерную РНК [140], гибридизируемость ядерной РНК с ДНК [140], обнаружение множественности форм РНК-полимеразы, разная их зависимость от циклической АМФ и изменение их концентрации при разных условиях роста и дифференциации железы [186]. Следовательно, начало синтеза специфических белков в клетках молочной железы связано с существенной перестройкой работы механизма транскрипции.

Что касается цитоплазмы, то есть данные, что уже в период беременности в ней присутствуют те виды иРНК, которые характерны для периода синтеза специфических белков, однако количество и особенно стабильность их матриц резко возрастают в разгар лактации [187]. Для предродового периода характерно значительное увеличение числа рибосом, причем есть данные, что усиление синтеза тРНК связано с амплификацией соответствующих генов [188]. Обнаружено влияние инсулина и пролактина на агрегацию рибосом и связывание с мембранами [189].

Данные об изменениях тРНК и АРСаз очень малочисленны и в основном получены при изучении активации и включения аминокислот в суммарную рН-5-фракцию лактирующей железы. Наиболее интересна работа Тэкингтона [190], в которой показано, что для дифференциации молочной железы наряду с увели-

чением синтеза тРНК характерно непропорционально высокое увеличение синтеза тРНК, сопровождаемое активацией метилаз. Однако из работы неясно, повышается ли под влиянием инсулина, гидрокортизона и пролактина синтез всех видов тРНК или отдельных фракций.

Анализ полученных нами данных позволяет сделать вывод, что дифференциация клеток молочной железы сопровождается довольно существенным изменением количественного соотношения индивидуальных тРНК и АРСаз в суммарном фонде. В период интенсивного синтеза белков молока устанавливается соответствие наборов ряда тРНК и АРСаз аминокислотному составу казеиногена и β -лактоглобулина. Процесс инволюции железы и почти полное прекращение синтеза белков молока характеризуется новым перераспределением соотношения отдельных тРНК, которое, оставаясь принципиально близким установившемуся в период лактации, отличается, однако, довольно резким падением содержания тРНК^{Лей}. Что касается активности АРСаз, то в период инволюции их соотношение возвращается почти к исходному уровню — активности АРСаз недифференцированных клеток молочной железы.

Значительное увеличение концентрации в клетках лейцил- и глутамил-тРНК в период интенсивного синтеза специфических белков, содержащих наибольшие количества именно этих аминокислот, сопровождается появлением новых изоакцепторных компонентов, в то время как гетерогенность серил-, метионил-, глицил-, лизил-тРНК остается без изменения. Интересно, что в период инволюции не только резко уменьшается содержание тРНК^{Лей}, но и исчезают две минорные фракции изоакцепторного набора.

Для системы трансляции лейциновых кодонов характерно также изменение хроматографического поведения лейРС при выделении ее в очищенном состоянии. Лактирующие клетки содержат фермент, который в отличие от синтетазы железы периода инволюции и железы телок разделяется как на ДЭАЭ-целлюлозе, так и на ГАПе на три компонента, с различным молекулярным весом, термостабильностью и в ряде случаев — уровнем взаимодействия с индивидуальными тРНК^{Лей}.

Возникает вопрос: какое место занимают установленные факты в той чрезвычайно сложной системе клеточных механизмов, которые обеспечивают дифференциацию и синтез белков молока секреторным эпителием молочной железы?

1. Количественное соответствие наборов тРНК и АРСаз, а в результате фонда аминоксил-тРНК аминокислотному составу основных белков молока, по-видимому, обеспечивает высокую скорость и интенсивность белкового синтеза. Клетка готовит все звенья полипептидной цепи в нужной пропорции, остановка за правильной их сборкой в соответствии с генетической информацией. Создается впечатление, что эти два потока — информация

и строительный материал — четко координированы. Имеют ли они общий регуляторный механизм или находятся в причинно-следственных отношениях, мы пока не можем сказать. Однако это, по-видимому, один из общих принципов регуляции биосинтеза специфических белков в узкоспециализированных тканях.

2. Обнаруженный факт корреляции набора АРСаз с фондом тРНК во все периоды развития и жизнедеятельности органа в свете работ Эбеля и Яруса может иметь важное значение для высокой скорости и безошибочности образования соответствующих аминоктил-тРНК. В пользу такого предположения свидетельствуют и наши данные об особенностях взаимодействия тРНК и АРСаз железы телки лактирующей железы периода инволюции при перекрестах, которые были подробно рассмотрены в настоящей главе.

3. Появление новых форм аминоктил-тРНК с началом синтеза специфических белков и исчезновение некоторых из них в период инволюции железы может быть связано со считыванием редко встречающихся кодонов типа модулирующих по Эймсу и Хартману, которые характерны для новых иРНК. Учитывая данные о способности гетерологичных систем транслировать одну из индивидуальных иРНК для белков молока: α_S -казеина [191], следует, по-видимому, отвергнуть в данном случае принцип «да—нет», предложенный Стрелером [94] в его гипотезе о роли отдельных аминоктил-тРНК в процессе дифференциации. Однако наличие адапторов для редких кодонов наряду с соответствием набора аминоктил-тРНК количественному аминокислотному составу белков молока может влиять на скорость трансляции специфических иРНК и тем самым на их стабильность, так как есть данные о взаимосвязи скорости трансляции и периода жизни иРНК. Используя бесклеточные системы синтеза белка *in vivo*, авторы обнаружили существенное влияние некоторых минорных фракций тРНК на скорость синтеза полипептидных цепей, о чем было сказано выше.

Появление новых фракций тРНК может быть связано и с другими регуляторными механизмами. В частности, мало изучен вопрос о влиянии отдельных видов тРНК на РНК-полимеразную систему, на синтез всех видов РНК и специализированных ферментных систем [2].

4. Не менее важным, согласно ранее рассмотренным гипотезам регуляции на уровне трансляции, является изменение гетерогенности лейцил-тРНК синтетазы молочной железы при дифференциации и разных функциональных состояниях органа. Как уже подчеркивалось, смена форм именно этого фермента характерна для развития и дифференциации тканей высших организмов. Мнение о связи клеточной дифференциации с функционированием отдельных изоферментов высказано не только Стрелером [94], но и другими исследователями.

Таким образом, полученные данные наряду с описанными в литературе фактами способствуют дальнейшему развитию гипотезы об участии тРНК и АРСаз в регуляции биосинтеза белка на уровне трансляции. Вскрытие интимных механизмов контроля над биосинтезом специфических белков имеет не только общетеоретический интерес, но в дальнейшем должно привести к серьезным практическим результатам для активной и целенаправленной регуляции синтеза ценных белков растительного и животного происхождения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ельская А. В. Адапторно-модификационная гипотеза регуляторной функции тРНК.— В кн.: Молекулярная биология, вып. 7. Киев, «Наукова думка», 1971, 152.
2. М а ц у к а Г. Х. Участие тРНК в процессах регуляции биосинтеза белка.— В кн.: Молекулярная биология, вып. 4. Киев, «Наукова думка», 1969, 154.
3. Остерман Л. А. Регуляция биосинтеза белка на уровне трансляции.— Усп. совр. биол., 1971, 71, 353.
4. Littauer U., Inouye H. Regulation of tRNA.— Ann. Rev. Biochem., 1973, 42, 439.
5. Doctor B., Apgar J., Holley R. W. Fractionation of yeast amino acid acceptor RNA by countercurrent distribution.— J. Biol. Chem., 1961, 236, 1117.
6. Белозерский А. Н., Зайцева Г. Н. Изучение растворимых РНК и аминоацил-тРНК синтезас в сравнительно видовом аспекте.— Укр. біохім. журн., 1965, 37, 650.
7. Yamamoto F., Yamane T., Sueoka N. Existence of two phenylalanyl-sRNA synthetases in *Neurospora crassa*.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1965, 53, 1456.
8. Lazzarini R., Peterkofsky. The characterization of a new species of leucyl-tRNA formed during methionine deprivation of *E. coli* with relaxed control.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1965, 53, 549.
9. Sueoka N., Yamane T. Fractionation of aminoacyl-acceptor RNA on methylated albumin column.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1962, 48, 1454.
10. Bock R., Cherayil Y. Chromatography of sRNA on DEAE-cellulose and DEAE-Sephadex.— In: Methods in Enzymology, 12, A. 1967, 638.
11. Kawade Y., Okamoto T., Yamamoto Y. Fractionation of soluble RNA by chromatography on DEAE-ion exchanges.— Biochem. Biophys. Res. Commun., 1963, 10, 200.
12. Hartman G., Coy U. Fraktionierung der aminosäure spezifischen löslichen ribonuclein säuren.— Biochim. Biophys. Acta, 1961, 47, 612.
13. Muench K., Berg P. Fractionation of tRNA by gradient partition chromatography on Sephadex columns.— Biochemistry, 1966, 5, 970.
14. Pearson R., Kelmers A. Separation of tRNA by hydroxyapatite columns.— J. Biol. Chem., 1966, 241, 767.
15. Kawakamoto M., Shimura Kensake. Fractionation of glycine, alanine and serine tRNAs from silk gland.— J. Biochem., 1973, 74, 33.
16. Kelmers A., Novelli G., Stulberg M. Separation of tRNA by reversed-phase chromatography.— J. Biol. Chem., 1965, 240, 3979.
17. Schugart L., Novelli G. Use of reverse-phase column chromatography for rapid isolation and identification of formylmethionine tRNA.— Biochem. Biophys. Res. Commun., 1969, 186, 384.
18. Weiss Y., Kelmers A. A new chromatographic system for increased resolution of tRNA's.— Biochemistry, 1967, 6, 2507.

19. Muench K., Saffille P. tRNA's in *E. coli*. Multiplicity and variation.— *Biochemistry*, 1968, 7, 2799.
20. Bergquist P., Bagully B. Nucleotide sequences from yeast serine-acceptor ribonucleic acid.— *Biochim. Biophys. Acta*, 1965, 103, 579.
21. Carlsen E. N., Trelle G., Schjeide O. Transfer ribonucleic acid.— *Nature*, 1964, 202, 984.
22. Goodman H., Rich A. Formation of a DNA-soluble RNA hybrid and its relation to the origin evolution and degeneracy of soluble RNA.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1962, 48, 2101.
23. Murthy M., Roux H., Thenot I. Isoacceptor tRNA's for glutamate, glutamine, aspartate and asparagine in calf brain.— *J. Neurochem.*, 1974, 22, 19.
24. Apgar Y., Holly R. Separation of *E. coli* leucine-acceptor RNA's by countercurrent distribution.— *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1964, 16, 121.
25. Goldstein Y., Bennett T., Craig L. Countercurrent distribution studies of *E. coli* B sRNA.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1964, 51, 119.
26. Bennett T., Goldstein J., Lipmann F. Coding and charging specificities of sRNA's isolated by countercurrent distribution.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1965, 53, 385.
27. Kano-Sueoka T., Nirenberg M., Sueoka N. Effect of Bacteriophage infection upon the specificity of leucine tRNA for RNA codewords.— *J. Mol. Biol.*, 1968, 35, 1.
28. Smith D., Mertzner V., McNamara A. A comparison of rabbit liver and reticulocyte tRNA: evidence of unique species in reticulocytes.— *Biochim. Biophys. Acta*, 1974, 349, 366.
29. Calker D., van Hilse K. Properties of isoaccepting tRNA^{Val} from rabbit reticulocytes: fractionation and codon recognition.— *FEBS Lett.*, 1974, 39, 56.
30. Weiss G. Translational control of protein synthesis by tRNA unrelated to changes in tRNA concentration.— *J. Mol. Evol.*, 1973, 2, 199—204.
31. Folk W., Yaniv M. Coding properties and nucleotide sequences of *E. coli* glutamine tRNA's.— *Nature New Biol.*, 1972, 237, 165.
32. Staehelin M. The primary structure of tRNA.— *Experientia*, 1971, 27, 1.
33. Söll D. et al. Specificity of sRNA for recognition of codons as studied by the ribosomal binding technique.— *J. Mol. Biol.*, 1966, 19, 556.
34. Zachau H. et al.— *Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol.*, 1966, 31, 417.
35. Blank H., Söll D. The nucleotide sequence of two tRNA^{Leu} species from *E. coli* K 12.— *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1971, 43, 1192.
36. Yamada Y., Ishikura H. Nucleotide sequence of tRNA^{Ser} from *E. coli*.— *FEBS Lett.*, 1973, 29, 231.
37. Weissenbach G., Martin R., Dirheimer G. Nucleotide sequence of tRNA^{Arg} from brewer's yeast.— *FEBS Lett.*, 1972, 28, 353.
38. Gartland W., Sueoka N. Two interconvertible forms of tryptophanyl sRNA in *E. coli*.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1966, 55, 948.
39. Ishida T., Sueoka N. Rearrangement of the secondary structure of tryptophanyl sRNA in *E. coli*.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1967, 58, 1080.
40. Lindahl T., Adams A., Fresco J. Renaturation of tRNAs through site binding of magnesium.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1966, 55, 941.
41. Thong M., Beltshev B., Grunberg-Manago M. Phosphorylation of tRNA. Multiple conformational states of tRNA in solution.— *Europ. J. Biochem.*, 1971, 19, 184.
42. Киселев Л. Л., Никифоров В. Г., Астаурова О. Б., Готих Б. П., Краевский А. А. Соединения аминокислот с транспортными (адапторными) РНК.— В кн.: Молекулярные основы биосинтеза белков. М., «Наука», 1971, 121.
43. Novelli G. D. Amino acid activation for protein synthesis.— *Ann. Rev. Biochem.*, 1967, 36, 449.

44. Sueoka N., Kano-Sueoka T. A specific modification of leucyl-sRNA of *E. coli* after phage T2 infection.—Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1964, **52**, 1535.
45. Kano-Sueoka T., Sueoka N. Characterization of a modified leucyl-tRNA of *E. coli* after Bacteriophage T2 infection.—J. Mol. Biol., 1968, **37**, 475.
46. Kano-Sueoka T., Sueoka N. Leucine tRNA and cessation of *E. coli* protein synthesis upon phage T-2 infection.—Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1969, **62**, 1225.
47. Hsu W., Foff I., Weiss S. Effect of bacteriophage infection on the sulfur-labeling of sRNA.—Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1967, **58**, 2028.
48. Waters L., Novelli G. A new change in leucine tRNA observed in *E. coli* infected with Bacteriophage T-2.—Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1967, **57**, 979.
49. Weiss S. et al. Transfer RNA, coded by the T-4 bacteriophage genome.—Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1968, **61**, 114.
50. Daniel V., Sarid S., Littauer U. Bacteriophage induced tRNA in *E. coli*.—Science, 1970, **167**, 1682.
51. Scherberg N., Guha A., Hsu W., Weiss S. Evidence for the early synthesis of T-4 bacteriophage-coded tRNA.—Biochem. Biophys. Res. Commun., 1970, **40**, 919.
52. Scherberg N., Weiss S. Detection of bacteriophage T-4 and T-5-coded tRNAs.—Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1970, **67**, 1164.
53. Wilson J., Abelson I. Bacteriophage T-4 transfer RNA.—J. Mol. Biol., 1972, **69**, 57.
54. Wilson J., Kim J., Abelson J.—J. Mol. Biol., 1972, **71**, 547.
55. Pinkerton T., Paddock G., Abelson J. Bacteriophage T-4 tRNA^{Leu}.—Nature New Biol., 1972, **240**, 88.
56. Hung P., Overly L. Alteration in function of RNA of *E. coli* after infection with phage QB.—J. Biol. Chem., 1968, **243**, 5525.
57. Scherberg N., Weiss S. T-4 transfer RNAs: codon recognition and translational properties.—Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1972, **69**, 1114.
58. Subak-Sharpe H., Hay J. An animal virus with DNA of high guanine—cytosine content with codes for sRNA.—J. Mol. Biol., 1965, **12**, 924.
59. Willick C., Hay J. Changes in DNA after infection with adenovirus 2.—Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1973, **71**, 954.
60. Clarkson S., Runner M. tRNA changes in HeLa cells after vaccinia virus infection.—Biochim. Biophys. Acta, 1971, **238**, 498.
61. Gallagher R., Ting R., Gallo R. A common change of aspartyl-tRNA in polyoma- and SV40-transformed cells.—Biochim. Biophys. Acta, 1972, **272**, 568.
62. Erikson E., Erikson R. Isolation of amino acceptor RNA from purified myeloblastosis virus.—J. Mol. Biol. 1970, **52**, 387.
63. Travnick M. Some properties of amino acid acceptor RNA isolated from avian tumor virus Bai strain A (Avian myeloblastosis).—Biochim. Biophys. Acta, 1969, **182**, 427.
64. Travnick M., Riman J. Chromatographic differences between lysyl-tRNA's from avian tumor virus and virus transformed cells.—Biochim. Biophys. Acta, 1970, **199**, 283.
65. Hall T., Shin D., Kaesberg P. Enzyme-mediated binding of tyrosine to Brome-Mosaic-Virus RNA.—Biochem. J., 1972, **129**, 969.
66. Öberg B., Philipson L. Binding of histidine to tobacco mosaic virus RNA.—Biochem. Biophys. Res. Commun., 1972, **48**, 927.
67. Pinck M., Yot P., Chapeville F., Duranton H. Enzymatic binding of valine to the 3'-end of TYMV—RNA.—Nature, 1970, **226**, 954.
68. Taylor N. et al. Similarities and differences among species tRNAs in mammalian tissues.—Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1967, **57**, 1712.

69. Fujioka S., Gallo R. Aminoacyl tRNA profiles in human myeloma cells.— *Blood*, 1971, **38**, 246.
70. Gallo R., Pestka S. tRNA species in normal and leukemic human lymphoblast.— *J. Mol. Biol.*, 1970, **52**, 195—219.
71. Goldman M. et al. Comparison of tRNA and aminoacyl-synthetases of liver and ascites tumor cells.— *Cancer Res.*, 1969, **29**, 1051.
72. Baliga R., Borek E., Weinstein I. Differences in the tRNA's of normal liver and Nivikoff hepatoma.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1969, **62**, 899.
73. Befort J. Etude comparative des acides ribonucleiques de transfer extraits du foie de rat et de l'hepatome.— *Biochem. J.*, 1972, **54**, 1327.
74. Lippman M., Yang S., Thompson E. tRNA in hepatoma tissue culture cells.— *Endocrinol.*, 1974, **94**, 262.
75. Volkers S., Taylor M. Alterations in the tRNA population of hepatoma 9618 A as compared with normal rat liver.— *Biochim. Biophys. Acta*, 1971, **254**, 415—418.
76. Gonano F., Pirro G. Coding properties of tRNA^{Glu} of mammalian origin: comparison between rat liver and minimal deviation hepatoma 5123 C tRNA's^{Glu}.— *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1971, **45**, 984.
77. Hayashi M., Griffin A., Duff R., Rapp F. Chromatographic studies of tyrosyl- and phenylalanyl-tRNA's of liver and tumor cells.— *Cancer Res.*, 1973, **33**, 902.
78. Srinivasan D., Srinivasan P., Grunberg D., Weinstein B., Morris H. Alterations in specific tRNA's in a spectrum of hepatomas.— *Biochemistry*, 1971, **10**, 1966.
79. Gonano F., Chiarugi V., Pirro G. tRNA in rat liver and Morris 5123 minimal deviation hepatoma.— *Biochemistry*, 1971, **10**, 900.
80. Gonano F. et al. Cancer-embryonic rat liver tRNA present in hepatoma.— *Nature New Biol.*, 1972, **242**, 236.
81. Mach B., Koblent H., Gros D.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1968, **59**, 445.
82. Mushinski J., Potter M. Variations in leucine tRNA in mouse plasma cell tumor producing K-type immunoglobulin light chains.— *Biochemistry*, 1969, **8**, 1684.
83. Mushinski J. Stability of chromatographic patterns of aminoacyl tRNA from individual mouse plasmacytomas and variability among different immunoglobulin producing plasmacytomas and normal organs.— *Biochemistry*, 1971, **10**, 3917.
84. Yang W., Novelli G. Isoaccepting tRNA's in mouse plasma cell tumors that synthesise different myeloma proteins.— *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1968, **31**, 534.
85. Axel R., Weinstein I., Farber E. Patterns of tRNA in normal rat liver and during hepatic carcinogenesis.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1967, **58**, 1255.
86. Weinstein I. A possible role of tRNA in the mechanism of carcinogenesis.— *Cancer Res.*, 1968, **28**, 1871.
87. Arceneaux J., Sueoka N. Two species of *Bac. subtilis* tyrosine tRNA.— *J. Biol. Chem.*, 1969, **244**, 5959.
88. Chase R., Tener G. M. Changes in levels of amino acid acceptors in tRNA from *E. coli* grown under various conditions.— *Arch. Biochem. Biophys.*, 1974, **163**, 1, 306.
89. Ornstein L. Disc electrophoresis. I. Background and theory.— *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1964, **121**, 321.
90. Waters L. Altered chromatographic properties of tRNA from chloramphenicol-treated *E. coli*.— *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1969, **37**, 296.
91. Конохов Б. В. Генетический контроль клеточной дифференцировки.— *Усп. совр. биол.*, 1973, **76**, 2, 171.
92. Kafatos F. C. mRNA stability and cellular differentiation. Karolinska Symposia V. Gene transcription in reproductive tissues. 1972, 319.

93. Sueoka N., Kano-Sueoka T., Garland H. Modification of sRNA and regulation of protein synthesis.—Cold Spring Harbor Symp., 1966, **XXXI**, 571.
94. Strehler B. L., Hendley D. D., Hirsch G. P. Evidence on a codon restriction hypothesis of cellular differentiation.—Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1967, **57**, 1751.
95. Ceccarini C., Maggio R., Barbata G. Aminoacyl-tRNA synthetases as possible regulators of protein synthesis in the embryo of the sea urchin *Paracentrotus lividus*.—Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1967, **58**, 2235.
96. Molinaro M., Mozzì R. Heterogeneity of tRNA during embryonic development of the sea *Paracentrotus lividus*.—Exp. Cell. Res., 1969, **56**, 163.
97. Spadafora C., Igo-Kenenes, Zachau H. Changes in transfer sRNA and aminoacyl-tRNA synthetases during sea urchin development.—Biochim. Biophys. Acta, 1973, **312**, 674.
98. Yang S., Comb D. Distribution of multiple forms of lysyl-tRNA during early embryogenesis of sea urchin.—J. Mol. Biol., 1968, **31**, 139.
99. Rennert O. M. Aminoacyl-tRNA synthetase reaction unique to early embryonic tissue of the mouse.—Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1969, **63**, 878.
100. Bick M., Strehler B. Leucyl tRNA synthetase during soybean cotyledon senescence.—Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1971, **68**, 224.
101. Bick M., Liebke H., Cherry J., Strehler B. Changes in leucyl- and tyrosyl-tRNA's of soybean cotyledons during plant growth.—Biochim. Biophys. Acta, 1970, **204**, 175.
102. Kanabus J., Cherry J. Isolation of an organ-specific leucyl-tRNA synthetase from soybean seedling.—Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1971, **68**, 873.
103. Gonano F. et al. Cancer-embryonic rat liver tRNA present in hepatoma.—Nature New Biol., 1973, **242**, 236.
104. Mushinski J. F. Hepatoma-foetal Phe-tRNA also present in normal rat liver.—Nature, 1974, **248**, 332.
105. Holland J., Taylor M., Buck C. Chromatographic differences between tyrosyl-tRNA from different mammalian cells.—Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1967, **58**, 2437.
106. Marshall R., Nirenberg M. RNA codons recognized by transfer RNA from amphibian embryos and adults.—Develop. Biol., 1969, **19**, 1.
107. Witt W. de. Differences in methionyl- and arginyl-tRNA's of larval and adult bullfrogs.—Biochem. Biophys. Res. Commun., 1971, **42**, 266.
108. Wainwright S. et al. Comparison of the tRNA complements of chick embryos and their supporting membranes.—Canad. J. Biochem., 1972, **50**, 1056.
109. Wainwright S. et al. Regulation of hemoglobin synthesis in the blood island of chick blastodiscs.—Canad. J. Biochem., 1972, **50**, 1158.
110. Taylor N. et al. Similarities and differences among species tRNA's in mammalian tissues.—Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1967, **57**, 1712.
111. Hatfield D., Portugal F. Seryl-tRNA in mammalian tissues: chromatographic differences in brain, liver and a specific response to the codon, UGA.—Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1970, **67**, 1200.
112. Ortwerth B. Isoaccepting tRNAs in specialized mammalian tissues.—Biochemistry, 1971, **10**, 4190.
113. Фаворова О. О., Парин А. В., Лаврик О. И. Аминоацил-тРНК-синтетазы. Биофизика, сер. «Итоги науки и техники», 1972, **2**, 6—102.
114. Ortwerth B., Liu L. Correlation between a specific isoaccepting lysyl-tRNA and cell division in mammalian tissues.—Biochemistry, 1973, **12**, 3978.
115. Ortwerth B., Gonuschot G., Carlson J. Properties of tRNA^{Lys}₄ from various tissues.—Biochemistry, 1973, **12**, 3985.
116. Ilan J., Ilan J., Patal N. Juvenile hormone determination of translational control through tRNA and enzyme.—J. Biol. Chem., 1970, **245**, 1275.
117. Beck G., Hentzen D., Ebel J.-P. Comparative study of tRNA in the liver of immature and laying hens.—Biochim. Biophys. Acta, 1970, **213**, 55.

118. Busby W., Hele P. Estrogen-induced variation of lysine tRNA isoacceptors in chicken liver.— *Biochim. Biophys. Acta*, 1970, **224**, 413.
119. Dingman C., Aronow A., Bunting F., Peacock A., O'Malley B. Changes in chick oviduct RNA following hormonal stimulation.— *Biochemistry*, 1969, **8**, 489.
120. Mäenpää P., Bernfield M. Quantitative variation in serine tRNA during estrogen-induced phosphoprotein synthesis of rooster liver.— *Biochemistry*, 1969, **8**, 4926.
121. Mäenpää P. Seryl tRNA alterations during estrogen-induced phospho-tin synthesis.— *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1972, **47**, 971.
122. Tonoue T., Eaton J., Frieden E. Changes in leucyl-tRNA during spontaneous and induced metamorphosis of bullfrog tadpoles.— *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1969, **37**, 81—88.
123. Yang S., Sanadi D. Changes in the distribution of transfer ribonucleic acid species specifically induced by thyroxine.— *J. Biol. Chem.*, 1969, **244**, 5081.
124. Sharma O., Borek E. Inhibitor of transfer ribonucleic acid methylases in the differentiating slime mold *Dictyostelium discoideum*.— *Biochemistry*, 1970, **9**, 2507.
125. Beck J., Stutinsky F., Beck G., Tambian R., Ebel J.-P. Comparative study of tRNA in the liver of normal and hypophysectomized rats.— *Biochim. Biophys. Acta*, 1970, **213**, 68.
126. Jackson C., Irving C., Sells B. Changes in rat liver tRNA following growth hormone administration and in regenerating liver.— *Biochim. Biophys. Acta*, 1970, **217**, 64.
127. Galissi A. The coding properties of multiple tRNA for valine and leucine in hemoglobin synthesis.— *Europ. J. Biochem.*, 1969, **10**, 561.
128. Woodward W., Herbert E. Coding properties of reticulocyte lysine tRNA's in hemoglobin synthesis.— *Science*, 1972, **177**, 1197.
129. Chin Kuei-Chen, Kidson Chev. Selective association of hormonal steroids with aminoacyl tRNAs and control of protein synthesis.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1971, **68**, 2448.
130. Scheulen M., Schmidt B., Matthaei H. Competitive inhibition of neutral mRNA-stimulated amino acid incorporation by aminoacyl-tRNA.— *Biochim. Biophys. Acta*, 1973, **299**, 468.
131. Ytano H. Genetic regulation of peptide synthesis in hemoglobins.— *J. Cell. Compar. Physiol.*, 1966, **27**, 65.
132. Anderson W. The effect of tRNA concentration on the rate of protein synthesis.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1969, **62**, 566.
133. Gilbert J., Anderson W. Cell-free hemoglobin synthesis. II. Characteristics of the tRNA dependent assay system.— *J. Biol. Chem.*, 1970, **245**, 2342.
134. Gupta S., Soporì M., Lengyel P. Release of the inhibition of mRNA translation in extracts of interferon-treated Ehrlich ascites tumor cells by added tRNA.— *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1974, **57**, 763.
135. Ames B., Hartman P. The histidin operon.— *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1963, **28**, 349.
136. Stent G. Modulation of transfer RNA species can provide a workable model of an operator-less operon.— *Science*, 1964, **144**, 816.
137. Zukerkandle E., Pauling L. *J. Theor. Biol.*, 1965, **8**, 357. Цит. по 30.
138. Crick F. H. «Wobble» hypothesis.— *J. Mol. Biol.*, 1966, **19**, 548.
139. Sirakov L., Rychlik I., Sorm F. Synthesis of messenger RNA during various functional states of the mammary gland.— *Collection*, 1968, **33**, 951.
140. Turkington R. Changes in hybridizable nuclear RNA during differentiation of mammary cell.— *Biochim. Biophys. Acta*, 1970, **213**, 484.
141. Киселева З. С., Фомичева И. И. Фракция белков молока крупного рогатого скота и их наследование.— *Генетика*, 1966, **1**, 150.

142. Суетина И. А.—Архив анатомии, гистол. и эмбриол., 1966, 51, 66.
143. Яковлев В. Г. Биосинтез белков молока.—С.-х. биология, 1966, 1, 60.
144. Larson V. Milk proteins biosynthesis.—J. Dairy Sci., 1965, 48, 133.
145. McKenzie H. Milk proteins.—In: Adv. Protein Chem., 22. N. Y.—L., Acad. Press., 1967.
146. Ельська А. В., Мацука Г. Х. До питання про зміну набору індивідуальних тРНК в клітинах молочної залози залежно від якості білків, що синтезуються.—Укр. біохім. журн., 1968, 40, 120.
147. Elska A. et al. tRNA and aminoacyl-tRNA-synthetase during differentiation and under different functional states of the mammary gland.—Biochim. Biophys. Acta, 1971, 247, 430.
148. Ельська А. В., Батурина И. В., Желтовская Н. И., Гудзера О. И., Мацука Г. Х. Адаптация набора тРНК и аминоксил-тРНК-синтез к биосинтезу специфических белков.—В кн.: Симпозиальные доклады III ВЕС. Рига, 1974, 96.
149. Elska A., Zeltovska N., Gudzera O. Adaptation of tRNA and aminoacyl-tRNA-synthetases to the biosynthesis of specific proteins.—In: Abstr. IX FEBS Congr. Budapest, 1974.
150. Ельська А. В., Желтовская Н. И., Батурина И. Д., Гудзера О. И., Мацука Г. Х. Вариабельность наборов тРНК и АРСаз при дифференциации молочной железы. Материалы советско-французского симпозиума «Нуклеиновые кислоты». Пушино-на-Оке, 1974.
151. Fraser M., Gutfreund H. Steps in amino-acid incorporation in mammary tissue.—Proc. Roy. Soc., B, 1958, 149, 392.
152. Tristram G.—In: The Proteins, I, A. N. Y., 1953, 181.
153. Yamane T. Correlation between aminoacyl-sRNA pool and amino acid composition of proteins.—J. Mol. Biol., 1965, 14, 616.
154. Matsuzaki K. Fractionation of amino acid specific sRNA from silk-gland by methylated albumin column chromatography.—Biochim. Biophys. Acta, 1966, 114, 222.
155. Lee L., Ravel J., Shive W. A general involvement of acceptor RNA in the initial activation step of glutamic acid and glutamine.—Arch. Biochem. Biophys., 1967, 121, 614.
156. Ravel J., White M., Shive W. Activation of tyrosine analogs in relation to enzyme repression.—Biochem. Biophys. Res. Commun., 1965, 20, 352.
157. Garel J., Virmoux N., Mandel P. Adaptation fonctionnelle des tRNA a la biosynthese proteique dans un systeme cellulaire hautement differentie.—Bull. Soc. Chim. Biol., 1970, 52, 987.
158. Smith D., McNamara A. Specialization of rabbit reticulocyte tRNA content for hemoglobin synthesis.—Science, 1971, 171, 577—579.
159. Венкстерн Т. В. Первичная структура транспортных рибонуклеиновых кислот. М., «Наука», 1970.
160. Brookes P., Lawley P. The methylation of adenosine and adenylic acid.—J. Amer. Chem. Soc., 1960, 2, 539.
161. Allen R., Raines P., Regen D. Measurements of charging levels in livers of chow-fed rats, fasting rats and rats fed balanced of imbalanced mixture of amino acids.—Biochim. Biophys. Acta, 1969, 190, 323.
162. Chavancy G., Daillile J., Gabel J.-P. Functional adaptation of tRNAs to protein biosynthesis in an highly differentiated cellular system. IV. Evolution of tRNA in the sericigen gland of *Bombyx mori* L. during the last larval age.—Biochimie, 1971, 53, 11—12, 1187.
163. Chen G., Siddiqui D. Involvement of glycine tRNA in development of the posterior silk gland of *Bombyx mori*.—Arch. Biochem. Biophys., 1974, 161, 109.
164. Garel J.-P. et al. Functional adaptation of tRNAs to protein biosynthesis in an highly differentiated cellular system. V. Fractionation by counter-current distribution of tRNAs of sericigen gland from *Bombyx mori* L.—Biochimie, 1971, 53, 1195.

165. Mäenpää P., Ahonen J. tRNA changes in rat granulation tissue possibly related to collagen synthesis.—*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1972, **49**, 179.
166. Smith D. W., McNamara A. The distribution of transfer RNA in rabbit reticulocytes.—*J. Biol. Chem.*, 1974, **249**, 1330.
167. Smith D., McNamara A. The tRNA content of rabbit reticulocytes: Enumeration of the individual species per cell.—*Biochim. Biophys. Acta*, 1972, **1**, 67.
168. Litt M., Kabat D. Studies of tRNA and of hemoglobin synthesis in sheep reticulocytes.—*J. Biol. Chem.*, 1972, **247**, 6659—6664.
169. Nathan J., Richmond A. Leucyl-tRNA synthetase in senescing tobacco leaves.—*Biochem. J.*, 1974, **140**, 169.
170. Tao K., Khan A. Increased in activities of aminoacyl-tRNA synthetases during cold-treatment of dormant pear embryo.—*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1974, **59**, 764.
171. Bonnet J., Ebel J.-P. Correction of aminoacyl errors: evidence for a non significant role of the aminoacyl-tRNA synthetase catalysed deacylation of aminoacyl-tRNAs.—*FEBS Lett.*, 1974, **39**, 259.
172. Шварц В. С., Лысков В. Н. Физические механизмы «рибосомального сайта».—*ДАН СССР*, 1974, **217**, 1446.
173. Nishimura S., Weinstein J. B. Fractionation of rat liver tRNA. Isolation of tyrosine, valine, serine and phenylalanine tRNA and their coding properties.—*Biochemistry*, 1969, **8**, 832.
174. Liu L., Ortwerth B. Specificity of rat liver lysine tRNA for codon recognition.—*Biochemistry*, 1972, **11**, 12.
175. Anderson M., Cherry G. Differences in leucyl-transfer RNAs and synthetases in soybean seedling.—*Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1969, **62**, 202.
176. Roy K., Söll D. Purification of five serine tRNA species from *E. coli* and their acylation by homologous and heterologous seryl tRNA-synthetases.—*J. Biol. Chem.*, 1970, **245**, 1394.
177. Altman K., Southren A., Uretsky S., Zabos P., Acs G. Hydrocortisone induction of rat liver leucyl-tRNA and its synthetases.—*Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1972, **69**, 3567.
178. Kisselev L., Favorova O. Aminoacyl-tRNA synthetases: some recent results and achievements.—*Adv. Enzymol.*, 1974, **40**, 141.
179. Gussek D. Changes in tRNA and tRNA synthetases during regeneration and differentiation.—*The gerontologist*, 1973, **13**, 3, 11.
180. Vescia A. Separation of two leucyl-ribonucleic acid synthetases from rat liver.—*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1967, **29**, 496.
181. Turkington R., Kadohawa N. Gene activation in mammary cells.—In: *Karolinska Symposia*, V. Gene transcription in reproductive tissue. 1972, 346—368.
182. Stellwagen R., Cole R. Histone biosynthesis in the mammary gland during development and lactation.—*J. Biol. Chem.*, 1969, **244**, 4878.
183. Marzluff W., McCarty K. Two classes of histone acetylation in developing mouse mammary gland.—*J. Biol. Chem.*, 1970, **245**, 5635.
184. Turkington R., Riddle M. Hormone-dependent phosphorylation of nuclear proteins during mammary gland differentiation in vitro.—*J. Biol. Chem.*, 1969, **244**, 6040.
185. Green M., Topper Y. Some effects of prolactin, insulin and hydrocortisone on RNA synthesis by mouse mammary gland in vitro.—*Biochim. Biophys. Acta*, 1970, **204**, 441.
186. Mendelson I., Anderson K. Rat mammary gland nuclear RNA polymerase in late pregnancy and lactation.—*Biochim. Biophys. Acta*, 1973, **299**, 576.
187. Sirakov L., Rychlik I. La synthèse de l'ARN messenger dans la glande mammaire de la souris, selon l'état hormonal.—*Ann. endocrinol.*, 1969, **30**, 365.

188. Banerjee M., Wagner J. Gene amplification in mammary gland at differentiation.— *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1972, **49**, 480.
189. Gave P., Denamur R. Acides ribonucleiques et polyribosomes de la glande mammaire de la lapine au cours de la lactogenese induite par la prolactine.— *Biochim. Biophys. Acta*, 1969, **186**, 99.
190. Turkington R. Hormonal regulation of tRNA and tRNA—methylating enzymes during development of the mouse mammary gland.— *J. Biol. Chem.*, 1969, **244**, 5140.
191. Gave P., Hondébine L., Denamour K. Isolation of active mRNA for A_s-casein from bound polyribosomes of mammary gland.— *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1973, **51**, 637.

Глава 7

ФИЗИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СТРУКТУРЫ ТРАНСПОРТНЫХ РНК

Молекулярные основы функционирования тРНК определяются ее специфической пространственной структурой. В последнее время благодаря применению современных физических методов в изучении структуры тРНК достигнуты значительные успехи.

В первых исследованиях гидродинамических и оптических свойств тРНК было установлено, что в ее структуре находятся фрагменты двойной спирали [1]. Впоследствии этот вывод был подтвержден анализом дифракционных картин ориентированных пленок тРНК [2]. Важным этапом структурных исследований стала расшифровка первичной структуры аланиновой тРНК [3], на основании которой была предложена модель вторичной структуры в виде «клеверного листа», которая сейчас является общепринятой. Однако дальнейшие исследования физических свойств тРНК показали, что между ее вторичной структурой и общей молекулярной формой существуют достаточно сложные взаимосвязи. Так, при изучении гидродинамических характеристик и оптической плотности растворов тРНК было установлено, что в температурном интервале 20—40° происходит существенное изменение формы молекул, тогда как вторичная структура меняется незначительно [4]. На основании этого наблюдения был сделан вывод о существовании специфической третичной структуры тРНК. Модель «клеверного листа», однако, не дает информации о пространственном расположении двуспиральных фрагментов молекулы. В этой модели имеется, по существу, много степеней свободы для расположения отдельных элементов. Уникальная пространственная структура может стабилизироваться взаимодействиями различного рода: водородными связями между основаниями, межплоскостными взаимодействиями, электростатическими силами, стерическими ограничениями вращения сахарофосфатного остова. В столь сложной ситуации произвести теоретический расчет конформации молекулы практически невозможно. К настоящему времени детальная информация о молекулярной структуре тРНК получена с помощью различных экспериментальных методов. Наиболее значительным успехом, несомненно, является установление полной трехмерной структуры фенилаланиновой тРНК в кристалле по данным рентгеноструктурного анализа.

В этой главе рассмотрены основные результаты исследования структуры тРНК с помощью физических методов. Начальный этап исследований структуры тРНК характеризовался широким

применением классических методов изучения общей формы и параметров молекул. Одним из таких методов является электронная микроскопия.

ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ

Метод электронной микроскопии применяется для изучения общей морфологии и конфигурации макромолекул. Известно, что интенсивность рассеяния электронов существенно зависит от плотности исследуемого вещества. Нуклеиновые кислоты состоят из легких атомов, которые являются слабыми центрами рассеяния. Поэтому для получения электронно-микроскопических изображений нуклеиновые кислоты необходимо контрастировать тяжелыми металлами. Разработаны и используются различные методы контрастирования биологических объектов. Некоторые из этих методов применялись и при исследовании транспортных РНК.

Первое электронно-микроскопическое наблюдение тРНК было предпринято в 1961 г. Н. А. Киселевым и Л. Л. Киселевым [5]. Для контрастирования образцов тРНК использовали метод предварительного отенения сплавом платина — палладий. На микрофотографиях с увеличением 25 000 наблюдались палочкообразные частицы примерно одинаковой формы со степенью асимметрии приблизительно 1:4. Длина частиц составляла в среднем 80—120 Å, а их диаметр — 20—25 Å. Вычисленный объем частиц хорошо соответствовал молекулярному весу тРНК — 25 000—30 000. Авторы заключили, что наблюдаемые частицы представляют одиночные молекулы тРНК, а не сложные молекулярные агрегаты.

Метод негативного контрастирования образцов применялся для исследования некоторых индивидуальных тРНК: сериновой [6, 7] и фенилаланиновой [9]. В качестве контрастирующего агента использовали 4%-ную кремний-вольфрамовую кислоту. Отдельные молекулы тРНК наблюдались в виде нитей диаметром 15—20 Å, из которых путем агрегации образовывались более сложные циклические и полигональные структуры.

Метод позитивного контрастирования 1%-ным раствором уранилацетата был использован при изучении сериновой тРНК из дрожжей [6]. В этом случае молекулы тРНК^{Сер} на микрофотографиях выглядели как частицы длиной 80—100 Å и диаметром 20 Å. На основании электронно-микроскопических данных была предложена также модель ассоциации тРНК^{Сер}, в которой спарены 3'- и 5'-концы двух разных молекул. Однако рассмотренные методы контрастирования не позволили наблюдать отдельные детали структуры тРНК из-за низкого разрешения получаемых изображений.

Эберман и Йошиками [10] предложили новый метод контрастирования с использованием сплава тантал—вольфрам. Усовер-

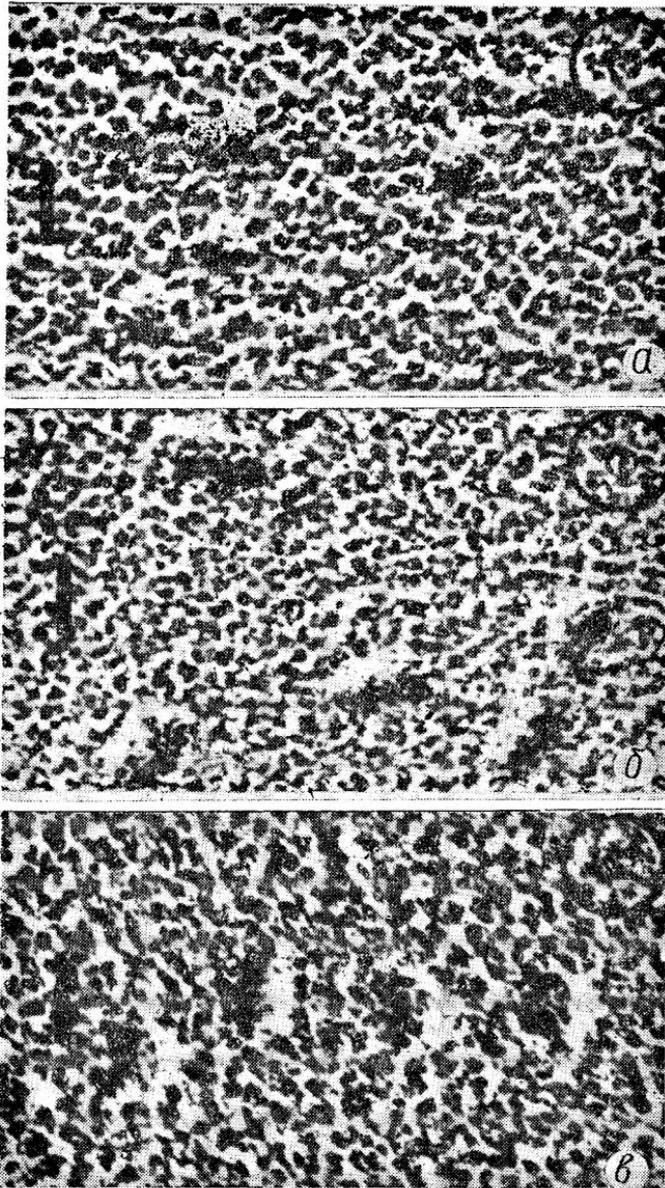


Рис. 20. Электронные микрофотографии тРНК, полученные контрастированием сплавом тантал—вольфрам [10], увеличение 760 000:

a — мономерные частицы тРНКАла; *б* — димеры тРНКАла, связанные водородными связями, *в* — ковалентно-связанные димеры тРНК.

шенствованная методика приготовления образцов путем оттене-ния металлом в вакууме позволила получить достаточно одно-родное распределение мономерных и димерных частиц тРНК. Был проведен статистический анализ наблюдаемых частиц. Мо-номеры аланиновой тРНК (рис. 20, а) дают следующее распре-деление: длина 85 ± 15 Å, ширина 42 ± 9 Å, высота 36 ± 6 Å. Вви-ду большой сложности задачи, авторы не предпринимали попы-ток статистического анализа формы частиц с целью выбора возможной модели третичной структуры. Для определения по-ложения акцепторного конца и антикодона в частицах было проведено исследование димеров тРНК: связанных ковалент-но акцепторными концами и спаренных через антикодоны (рис. 20, б, в). В обоих видах димеров обнаружено более гетероген-ное распределение размеров, однако их структура остается па-лочкообразной. Это позволило заключить, что акцепторный ко-нец и антикодон находятся на противоположных концах дегид-ратированного мономера тРНК.

Необходимо отметить, что при всех используемых способах контрастирования существует возможность возникновения арте-фактов из-за нарушения структуры биополимеров действием кон-трастирующих агентов. Это ограничение исключается при при-менении метода темнопольной электронной микроскопии, кото-рая дает возможность наблюдать неконтрастированные объекты. Впервые метод темного поля для транспортной РНК был испо-льзован в работе Оттенсмейера [11]. Некоторые изображения тРНК на микрофотографиях были сходны с «клеверным лист-ом», другие интерпретировались как следствие различной ори-ентации молекул на подложке. В последнее время Оттенсмейер предложил новую методику приготовления образцов для темно-польной микроскопии с целью определения функциональных центров в молекуле [12]. Для этого использованы специфические реагенты к тРНК: ацетат ртути и тетроксид осмия с 3-пиридил-ацетатом ртути. Предварительные электронно-микроскопиче-ские исследования показали [12], что этот подход весьма много-обещающий для изучения структуры тРНК.

Перспективы дальнейших исследований непосредственно свя-заны с совершенствованием методики и техники электронной ми-кроскопии. Вероятно, развитие этого метода позволит решить да-же такую задачу, как идентификация отдельных оснований в тРНК.

МАЛОУГЛОВОЕ РЕНТГЕНОВСКОЕ РАССЕЯНИЕ

Рассеяние рентгеновских лучей при малых углах дифракции да-ет сведения о форме и размерах молекул тРНК в растворе. Ме-тод малоуглового рассеяния применялся для исследования ала-ниновой [13, 14], тирозиновой и формилметиониновой [15] тРНК дрожжей, а также фенилаланиновой [15] и валиновой [16, 17]

тРНК из *E. coli*. Были определены такие параметры молекул тРНК в растворе, как радиус инерции, молекулярный вес, объем частиц. С помощью малоуглового рассеяния показано образование жидкокристаллического состояния в концентрированных водных растворах тРНК [18, 19]. Анализ кривых рассеяния, проведенный для различных индивидуальных тРНК, свидетельствует о большом сходстве общей формы молекул тРНК в растворе. Сравнение теоретических кривых рассеяния с экспериментальными позволило определить свойства симметрии молекул [20]. Оказалось, что молекулы тРНК хорошо моделируются эллипсоидом с переменным сечением 24—36 Å и степенью асимметрии 2,5:1. Метод малоуглового рентгеновского рассеяния, очевидно, полезен для проверки моделей структуры тРНК в растворе, однако его использование не позволяет установить детали пространственной структуры.

Суммируя рассмотренные данные, можно сделать вывод: классические методы изучения молекулярной морфологии, такие как электронная микроскопия, гидродинамические методы и малоугловое рентгеновское рассеяние, свидетельствуют о том, что нативные молекулы тРНК представляют собой асимметричные компактные частицы с упорядоченным расположением двуспиральных фрагментов. Задача определения детальной пространственной структуры тРНК потребовала применения более информативных физических методов, и в первую очередь наиболее мощного из них — рентгеноструктурного анализа высокого разрешения.

РЕНТГЕНОСТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ

Дифракция рентгеновского излучения наблюдается при прохождении через вещество с распределением плотности, мало отличающимся от длины волны. Расстояния между максимумами интенсивности в дифракционной картине, как известно, связаны простыми соотношениями с распределением плотности в веществе. Благодаря этому возможна расшифровка пространственной структуры молекулы по картине ее дифракции. Однако существенная сложность метода рентгеноструктурного анализа состоит в том, что непосредственно в эксперименте нельзя измерить фазы рассеянных лучей. Успешное решение этой задачи возможно в том случае, если получены кристаллы биополимеров с изоморфными замещениями — атомами тяжелых металлов [41].

Кристаллизация тРНК. Для проведения рентгеноструктурных исследований необходимы достаточно крупные и совершенные кристаллы макромолекул (оптимальные размеры $0,5 \times 0,5 \times 0,5$ мкм). Впервые кристаллы тРНК были получены в 1968 г. одновременно несколькими группами исследователей [21—25]. Основой для успешной кристаллизации тРНК стала возможность получения очищенных препаратов индивидуальных тРНК. При кристаллизации тРНК применяли два метода: 1) кристаллизация

из растворов с медленно меняющейся концентрацией осаждающих агентов и 2) кристаллизация путем выпаривания водных растворов тРНК. Первый метод получил наибольшее распространение. В качестве осаждающих агентов обычно используют органические растворители: этанол, диоксан, хлороформ, третиичный бутанол, пропанол, 2-метил-пентан-2,4-диол (МПД) или же некоторые соли, например сульфат аммония. Добавление осаждающих агентов в раствор тРНК обычно производится путем диффузии растворителя через газообразное состояние. Было установлено, что для эффективного образования и роста кристаллов необходимо присутствие в растворе поликатионов: спермина, спермидина, Co^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} [26—28]. Использование метода диффузии растворителя через газообразное состояние позволило получить кристаллы формилметиониновой [21, 22], фенилаланиновой [23], лейциновой [28] тРНК из *E. coli*, валиновой [29] и фенилаланиновой [30] тРНК из дрожжей, а также суммарных тРНК — из дрожжей [31] и печени кроликов [32, 33]. Наибольшей стабильностью отличались кристаллы, полученные из растворов сульфата аммония [28] и из системы МПД — вода [30, 36]. Несомненный интерес представляет попытка кристаллизации тРНК в виде цетилтриметиламмониевых солей (ЦТА—тРНК) [37].

Следует отметить, что все полученные кристаллы характеризуются исключительным разнообразием форм и параметров. Они различаются по типу кристаллической решетки и группе симметрии, размерам элементарной ячейки и числу молекул в одной ячейке [34]. Наиболее значительный полиморфизм кристаллов наблюдался для фенилаланиновой тРНК из дрожжей. Описаны пять кристаллических форм этой тРНК: моноклинная, орторомбическая, гексагональная, тригональная и кубическая, которые включают 8 различных пространственных групп [38]. Отличительной деталью кристаллов является также большое содержание воды: от 36 до 88% [30]. Многообразие кристаллических форм тРНК и их большая оводненность свидетельствуют о том, что кристаллизация тРНК происходит по открытому типу. В этом случае даже незначительные изменения условий кристаллизации приводят к существенному изменению способа молекулярной упаковки в кристалле.

Замечательной особенностью является способность к кристаллизации суммарных тРНК [31—33]. Определение акцепторной способности после растворения кристаллов позволило заключить, что имеет место совместная кристаллизация многих, но не всех тРНК. Так, у суммарной тРНК из печени кроликов после кристаллизации была обнаружена акцепторная активность только для тирозина, аланина, лизина, метионина и лейцина [32, 33]. Взаимозаменяемость молекул различных индивидуальных тРНК в кристалле, очевидно, свидетельствует об общности их пространственной структуры.

Основной задачей для кристаллизации тРНК является получение кристаллов, характеризующихся высокой упорядоченностью. Для кристаллов тРНК, выращенных в различных условиях, разрешение дифракционных картин изменяется в пределах от 20 до 2,3 Å [29, 36]. Достаточно высокое разрешение картины рентгеновской дифракции (в пределах 2,3 Å) было получено, например, для орторомбической кристаллической формы тРНК^{Фен} [36].

Изоморфные производные. Следующим этапом последовательного рентгеноструктурного исследования является получение изоморфных производных. Обычно применяют два метода введения тяжелых металлов в структуру: 1) присоединение тяжелых атомов к молекуле химическим путем и 2) диффузия раствора соли тяжелого металла в кристалл биополимера, так называемый метод вымачивания [41].

Первый метод имеет преимущество благодаря небольшому числу мест присоединения и высокой эффективности связывания. Этот метод применялся, например, для получения изоморфных производных аминоксил-тРНК [43]. В качестве ацилирующих агентов использовали сукцинимидные эфиры кислот, содержащих тяжелые атомы: парахлорртутьбензойной, параниодбензойной и иодуксусной [43].

Второй метод введения тяжелых металлов, благодаря простоте методики, получил гораздо большее распространение. Атомы тяжелых металлов легко диффундируют в кристалл тРНК, если его поместить в соответствующий раствор соли. Диффузия происходит свободно, так как в кристаллах имеются большие полости, заполненные кристаллизационной жидкостью. В этом случае также отмечается специфическое связывание тяжелых атомов с определенными участками на молекуле тРНК.

Изоморфные производные должны иметь те же параметры элементарной ячейки, что и нативная тРНК. Для определения координат тяжелых атомов в элементарной ячейке успешно применяют метод аномального рассеяния. Явление аномального рассеяния возникает при длине волны, близкой собственной полосе поглощения атома. Если геометрические положения тяжелых атомов в ячейке известны, легко рассчитать фазы и модули структурных амплитуд в дифракционной картине. Величины структурных амплитуд и фазы дают всю необходимую информацию для построения синтеза электронной плотности.

Развитие химии изоморфных замещений позволило получить в последнее время различные изоморфные производные фенилаланиновой тРНК из дрожжей. Благодаря этому был построен синтез электронной плотности и расшифрована полная трехмерная структура тРНК. Эти исследования были проведены параллельно для двух различных кристаллических форм тРНК^{Фен}: орторомбической (Рич и сотр.) и моноклинной (Кларк и сотр.).

Анализ структуры тРНК^{Фен}. Дрожжевая фенилаланиновая

тРНК при кристаллизации в системе МПД — вода образует орторомбические кристаллы, пространственная группа $P2_122_1$, размеры ячейки: $a=33,2 \text{ \AA}$, $b=56,1 \text{ \AA}$, $c=161 \text{ \AA}$ [36]. В работе Рича и сотр. [44] получены изоморфные тРНК^{Фен} с использованием солей металлов: осмия, самария и платины. Синтез электронной плотности с разрешением $5,5 \text{ \AA}$ [44] позволил выделить участки двойной спирали в структуре тРНК. При интерпретации карты электронной плотности с разрешением $4,0 \text{ \AA}$ [45] использовали модель «клеверного листа», что дало возможность проследить ход полинуклеотидной цепи в тРНК. На основании этих данных авторы [45] предложили грубую модель пространственной структуры, состоящую из двух спиральных сегментов, ориентированных приблизительно под прямым углом друг к другу в форме буквы «L». Один из этих непрерывных спиральных сегментов был образован акцепторной и ТФС-спильками, а другой — дигидроуридиловой и антикодоновой ветвями. ТФС- и дигидроуридиловая петли пространственно сближены в районе угла между спиралями. Дальнейшее повышение разрешения до 3 \AA позволило наблюдать отдельные фосфатные группы, остатки рибоз и азотистые основания. Однако полученная модель при разрешении 3 \AA [46] не удовлетворяла многочисленным требованиям к структуре тРНК, в частности не обнаруживала взаимодействий, поддерживающих третичную структуру, и поэтому была подвергнута справедливой критике в работе [49]. Недавно Рич и сотр. пересмотрели свою модель и предложили другую, альтернативную интерпретацию карты электронной плотности. Так, было изменено отнесение одного нуклеотида, которое хотя и не повлияло на общий ход полинуклеотидной цепи, но существенно изменило детали структуры; ориентацию пар оснований в дигидроуридиловой ветви, отнесение остатков в петле антикодона, положение основания У. Окончательная модель трехмерной структуры тРНК^{Фен}, полученная Ричем и сотр. при анализе орторомбических кристаллов с разрешением 3 \AA , показана на рис. 21. Основу структуры, как и в предыдущей модели, составляют два спиральных сегмента, которые оказались, однако, не совсем коллинеарными: отклонение в непрерывной спирали

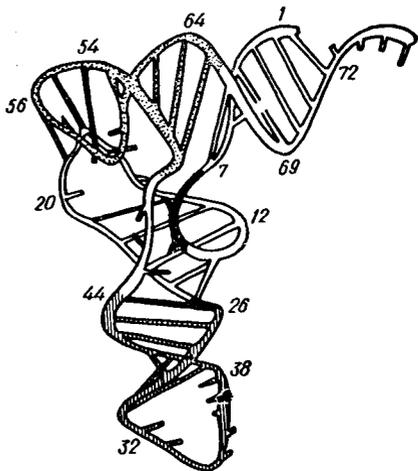


Рис. 21. Модель пространственной структуры тРНК^{Фен}, полученная при анализе орторомбических кристаллов с разрешением 3 \AA [47].

ТФС-акцепторная шпилька составляет 17°, а во втором сегменте — 24°. Детальный анализ карты электронной плотности позволил обнаружить ряд взаимодействий, стабилизирующих третичную структуру.

В составе спиральной структуры ТФС-шпильки включаются пары оснований Т54—m¹A58, Ц55—G18 и С56—G19, которые относятся к третичной структуре тРНК. Спаривание оснований Т54—m¹A58 отличается от уотсон-криковского типа из-за стерических органических, обусловленных присутствием метильной группы. Для остатка G57 отмечается интеркаляция между основаниями С18 и С19 дигидроуридиловой петли. Большинство оснований ТФС-петли, за исключением U59 и С60, экранированы другими основаниями в третичной структуре тРНК.

Дигидроуридиловая шпилька дополняется парами оснований U8—A14 и G15—С48. Пара оснований G15—С48 поддерживается только двумя водородными связями, поскольку оба нуклеотида находятся в *транс*-конформации относительно гликозидных связей. Дигидроуридиловая шпилька соединяется с другими частями молекулы тРНК несколько необычным способом — с помощью тройных комплексов оснований: U8—A14—A21, С13—G22—G46 и A9—U12—A23 (рис. 21). Диметилгуанозин в положении 26 спарен с основанием A44 и в то же время образует стопку с соседними основаниями С27 и С25. Как можно видеть из рис. 21, дигидроуридиловая петля находится на внешней стороне молекулы, экранируя часть ТФС-петли. Дигидроуридиловые остатки D16 и D17 в этой петле экспонированы, остальные основания, за исключением G20, либо спарены, либо связаны межплоскостными взаимодействиями и находятся во внутренней части молекулы тРНК.

Антикодоновая ветвь в модели на рис. 21 полностью экспонирована. Специфическая конформация антикодоновой петли поддерживается стэкинговыми взаимодействиями между основаниями Y37, A38 и Ц39. Интересной особенностью полученной структуры является точка соединения антикодоновой и дигидроуридиловой шпилек. Хотя основание G26 связано стэкингом с концевыми парами этих шпилек, остаток A44 не находится в вандерваальсовом контакте с основанием G45. Поэтому возможно относительное смещение дигидроуридиловой и антикодоновой шпилек, если тРНК будет находиться не в жестком кристаллическом окружении, а в растворе.

В акцепторной ветви непрерывный стэкинг распространяется и на основание A73, что, вероятно, способствует поддержанию специфической конформации акцепторного конца.

Таким образом, третичная структура фенилаланиновой тРНК стабилизируется как водородными связями между основаниями, так и межплоскостными взаимодействиями. Водородные связи, очевидно, определяют специфичность свертывания трехмерной структуры. Полученная в [47] модель хорошо согласуется с дан-

ными по химической модификации тРНК различными агентами [39].

Полное рентгеноструктурное исследование моноклинной кристаллической формы тРНК^{Фен} (пространственная группа $P2_1$, размеры элементарной ячейки: $a=56 \text{ \AA}$, $b=33 \text{ \AA}$, $c=63 \text{ \AA}$) было проведено Кларком и сотр. [48, 49]. Дифракционная картина нативных моноклинных кристаллов отличается достаточно высоким разрешением в пределах 3 \AA [48]. В принципе, предварительная интерпретация дифракционной картины кристаллов тРНК возможна и без применения изоморфных производных на основе знания только модулей структурных амплитуд. Такой подход был развит в работе Россмана и Блоу [50] и сводился к анализу

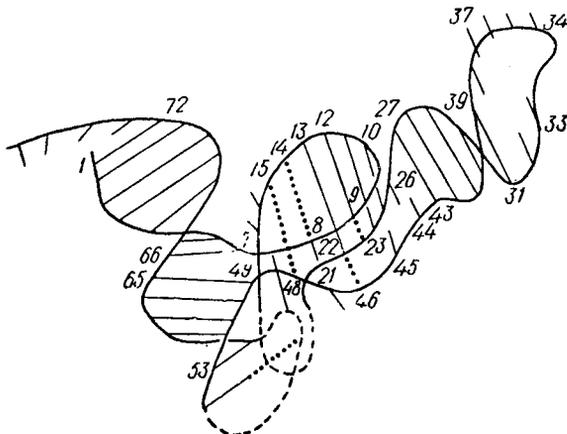


Рис. 22. Модель трехмерной структуры тРНК^{Фен}, полученная для моноклинных кристаллов с разрешением 3 \AA [49].

начальной области синтеза Паттерсона. Метод Россмана—Блоу использовал Левитт [52] для анализа моноклинных кристаллов тРНК^{Фен}. На основании этих данных была выбрана модель пространственного расположения двуспиральных участков, которая наилучшим образом согласовалась с дифракционной картиной. Оказалось, что полученная модель представляет собой некоторую модификацию предложенной ранее Левиттом [51] «обобщенной» модели тРНК.

Изоморфные производные моноклинных кристаллов тРНК^{Фен} были получены диффузией солей тяжелых металлов: платины, лютетия, осмия и самария в кристалл [49]. Синтез электронной плотности с разрешением 3 \AA легко обнаруживает максимумы плотности, связанные с фосфатными остатками и рибозами в двуспиральных фрагментах. Модель трехмерной структуры тРНК^{Фен} в моноклинной кристаллической форме (рис. 22) была построена с учетом ограничений, накладываемых вторичной структурой в виде «клеверного листа». Основу структуры, как и

в модели Рича и сотр. [45, 47], составляют два непрерывных тяжа, образованные ТФС-и акцепторной шпильками и антикодоновой и дигидроуридилевой ветвями. Оба спиральных сегмента соединяются, образуя некоторое подобие буквы «Т» (рис. 22). Было показано, что непрерывная спираль, состоящая из акцепторной и ТФС-шпилек — правовращающая, расстояния между основаниями равны 2,8 Å, т. е. спираль находится в А-форме. На акцепторном конце основания А73 и С74 связаны межплоскостными взаимодействиями. Для спиральной структуры, составленной дигидроуридилевой и антикодоновой ветвями, наблюдается отклонение от коллинеарности приблизительно на 20°. Определенное положение дигидроуридилевой шпильки в Т-структуре фиксировано с помощью петли А44—С48 и сегмента U8—A9. Третичная структура тРНК поддерживается несколькими тройками оснований: А9—U12—А23, С13—G22—G46 и U8—A14—A21. Эти детали полностью совпадают с аналогичными связями в модели Рича и сотр. [47]. Между основаниями U8 и A14 образуется комплементарная пара обратного хугстиновского типа. Одновременно основание U8 связано стэкингом с С13, и поэтому возможна фотореакция, наблюдаемая для валиновой тРНК [53].

Спиральная структура дигидроуридилевой шпильки удлинена за счет пар оснований U8—A14 и G15—С48 (рис. 22). В этой шпильке расстояния между основаниями составляют 3,0 Å, т. е. спираль ближе к А'-форме, согласно данным Арнотта [40]. Основания D16 и D17 ориентированы наружу относительно остальной части петли, а остатки G18 и G19 сближены с участком петли ТФС. В месте сближения этих двух петель, однако, не удалось проследить однозначно ход полинуклеотидной цепи (эти участки на рис. 22 обозначены пунктирной линией). Тем не менее стереохимически возможны только две конформации участков, которые отличаются спариванием основания между дигидроуридилевой и ТФС-петлями: в первом варианте Т-54 связан с А58 по хугстиновскому типу, а во втором — спарены основания Т-54 и С60.

Конформация антикодоновой петли стабилизирована межплоскостными взаимодействиями оснований на 3'-конце и двух остатков С32 и U33 на 5'-конце петли. Антикодоновый триплет экспонирован и легко доступен для связывания с комплементарным кодоном тРНК. В целом полученная структура близка к конформации антикодоновой петли, предложенной Фуллером и Ходжсоном [54].

Некоторые участки в полученной трехмерной структуре тРНК^{Фен} можно рассматривать как возможные функциональные центры [49]. Например, петля ТФС, связанная с инвариантными нуклеотидами дигидроуридилевой петли G18 и G19, может быть центром взаимодействия тРНК с рибосомой. Участками узнавания для специфических ферментов, возможно, являются варьируемые в различных тРНК нуклеотиды D16, D17 и G20 в дигидроуридилевой петле. За счет межплоскостных взаимодействий ос-

нований поддерживается специфическая конформация зоны антикодона и акцепторного конца молекулы.

Сравнение двух моделей трехмерной структуры тРНК^{Фен} показывает, что они весьма близки друг к другу (см. рис. 21 и 22). Незначительные различия заключаются в относительной ориентации дигидроуридиловой шпильки и ТΨС-ветви, а также в положении некоторых нуклеотидов, в частности в антикодонной петле и на акцепторном конце. Однако в главных деталях — взаимодействиях, поддерживающих третичную структуру, — обе модели практически идентичны. Поскольку модели получены для различных кристаллических форм тРНК — орторомбической и моноклинной, — можно считать, что молекулярная структура тРНК в разных формах сохраняется постоянной. Проведенное сравнительное исследование моноклинных и орторомбических кристаллов [55, 56] также подтвердило этот вывод. Различия между двумя кристаллическими формами, очевидно, состоят только в способе упаковки молекул в элементарной ячейке. В заключение следует отметить, что многие детали третичной структуры, полученные при рентгеноструктурном анализе кристаллов тРНК^{Фен}, еще в 1969 г. постулировал Левитт [51] в своей «обобщенной» модели. Это, в частности, относится к парам оснований U8—A14, A9—U12, G15—C48, G18—Ψ55, G19—C56 и G22—G46.

В настоящее время проводятся рентгеноструктурные исследования кристаллов инициаторной тРНК^{Мет}_φ из дрожжей. Путем ковалентного связывания атомов ртути и осмия получены различные изоморфные производные и построен синтез электронной плотности с разрешением 6Å [58].

Таким образом, метод рентгеновского дифракционного анализа позволил определить детальную пространственную структуру тРНК в кристалле. Несомненно, это достижение позволит значительно расширить наши представления о молекулярных механизмах биосинтеза белка. Однако для дальнейшего применения полученной модели необходимо установить, идентична ли она структуре молекул тРНК в растворе. В принципе, изменения конформации тРНК при кристаллизации могут происходить под действием органических растворителей, которые используют в качестве осаждающих агентов. Крамер и сотр. [59] показали, что добавление органических растворителей приводит к разворачиванию компактной структуры тРНК. Изменения оптической плотности и спектров КД свидетельствуют о том, что во всех водноорганических смесях, применяемых для кристаллизации, структура тРНК отличается от нативной. Действие органических растворителей, очевидно, сводится к нарушению системы гидрофобных взаимодействий в молекулах тРНК. На основании полученных данных авторы [59] считают, что к результатам анализа структуры кристаллов тРНК, полученных в водно-органических смесях, нужно относиться с известной осторожностью.

Изменения структуры тРНК в процессе кристаллизации возможны также под влиянием сил кристаллической решетки при упаковке молекул в ячейки. Эти силы, даже будучи небольшими по величине, могут оказывать возмущающее влияние на конформацию тРНК. Однако следует отметить, что кристаллы тРНК характеризуются высокой степенью гидратации, так что примерно половина их объема занята растворителем. Поэтому молекулы тРНК находятся, по существу в одинаковом окружении как в кристалле, так и в растворе. А поскольку окружение определяет конформацию тРНК, то последняя не должна существенно изменяться в процессе кристаллизации. Для многих белков рентгенографические исследования показали идентичность их структуры в кристалле и в растворе [41]. Пространственная геометрия белков, установленная по картинам дифракции, является основой для построения теорий, связывающих структуру белков с их функцией. Однако и для белков в некоторых случаях отмечено изменение конформации в кристалле, например для карбокси-пептидазы А [60], по крайней мере, на периферийных участках макромолекулы. Высокая лабильность тРНК в зависимости от окружения, обуславливает необходимость установления точной корреляции между ее структурой в кристалле и в растворе.

Метод рентгеноструктурного анализа имеет еще и тот недостаток, что с его помощью можно определить только статическую конформацию, тогда как в процессе функционирования тРНК возможны ее конформационные превращения. В связи с этим большое значение приобретают те методы, которые позволяют получить информацию о структуре тРНК в растворе. Одним из наиболее перспективных подходов для установления корреляции между структурой тРНК в кристалле и в растворе, а также для исследования конформационных превращений тРНК в настоящее время представляется использование спектроскопии ЯМР высокого разрешения.

ЯМР-СПЕКТРОСКОПИЯ

Спектроскопия ЯМР на ядрах ^1H , ^{13}C и ^{31}P в последнее время успешно применяется для исследования тРНК. Эти исследования стали возможными после усовершенствования экспериментальной техники ЯМР: повышения рабочей частоты до 300 Мгц и применения импульсной спектроскопии с Фурье-преобразованием. Метод ЯМР не может конкурировать с рентгеноструктурным анализом в точности определения геометрической структуры. Однако он позволяет исследовать структуру тРНК в растворе в нативных условиях и изучать характер и кинетику конформационных переходов.

Резонансная частота переходов в ЯМР определяется выражением:

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \gamma H_0 (1 - \sigma), \quad (1)$$

где γ — гиромагнитное отношение, H_0 — напряженность магнитного поля, σ — постоянная экранирования. Широкое применение метода ЯМР обусловлено высокой чувствительностью параметров спектров: химического сдвига, констант спин-спиновых взаимодействий к электронной структуре и конформации молекул.

Химический сдвиг отдельных линий измеряют в безразмерных единицах — миллионных долях (м. д.) относительно эталонного соединения. В принципе измерение химических сдвигов и констант спин-спинового взаимодействия позволяет определить конформацию молекулы в растворе. Однако для биополимеров интерпретация спектров ЯМР существенно усложняется в результате перекрывания отдельных сигналов и относительно большой ширины линий. С целью упрощения спектров применяют специфические приемы, например селективное дейтерирование белков [61]. Кроме того, улучшение разрешения сигналов можно достигнуть повышением рабочей частоты. К настоящему времени наибольшее распространение получил ядерный магнитный резонанс на протонах (ПМР или ^1H -ЯМР).

Протонный магнитный резонанс тРНК. В ПМР-исследованиях тРНК применяют два методических подхода: 1) изучение сигналов обмениваемых протонов в H_2O , 2) изучение сигналов необмениваемых протонов в D_2O . Рассмотрим последовательно оба направления.

Впервые сигналы обмениваемых протонов тРНК наблюдали Кернс и Шульман в области спектра ПМР от -10 до -15 м. д. относительно эталона ДСС [62, 63]. Эти сигналы были отнесены к кольцевым NH-протонам тРНК, связанным водородными связями. Суммарная интенсивность в этой области должна соответствовать общему числу пар оснований, так как каждая уотсон-криковская пара имеет только один NH-протон. Измерения интегральной интенсивности этих сигналов показали хорошее совпадение с моделью «клеверного листа». Переход к рабочей частоте 300 Мгц позволил значительно улучшить разрешение спектров. Проблема отнесения линий была решена в результате применения теории кольцевых токов для расчетов химических сдвигов. Влияния кольцевых токов азотистых оснований на химические сдвиги протонов были рассчитаны Пьюльманом [67]. Шульман и сотр. [65] применили результаты этих расчетов для двойной спирали тРНК, находящейся в A' -форме. Рассчитанные положения сигналов NH-протонов для шести различных индивидуальных тРНК, представленных в виде «клеверного листа», с большой степенью точности ($\pm 0,2$ м. д.) совпадали с наблюдаемыми экспериментально [65]. Это совпадение служит строгим экспериментальным подтверждением правильности модели «клеверного листа» для описания вторичной структуры тРНК в растворе. Рассмотрим некоторые конкретные примеры исследований:

Фенилаланиновая тРНК. Спектр ПМР дрожжевой тРНК^{Фен} в области NH-протонов, связанных водородными связями, пред-

ставлен на рис. 23. Общее число сигналов соответствует 19 протонам, что хорошо согласуется с моделью «клеверного листа». Исследования отдельных шпильек тРНК^{Фен} [66] показали, что в каждой из этих фрагментов спаривание оснований такое же, как и в нативной тРНК. Анализ сигналов пар оснований, расположенных на концах спиральных сегментов, позволил обнаружить некоторые детали третичной структуры. Например, положение сигнала С13 (—11,5 м. д.) строго предполагает существование межплоскостного взаимодействия С13 и А14. В некоторых случаях

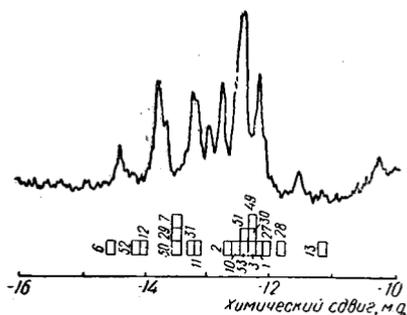


Рис. 23. Спектр ¹Н-ЯМР фенилаланиновой тРНК из дрожжей на частоте 300 Мгц в области сигналов кольцевых NH-протонов [65].

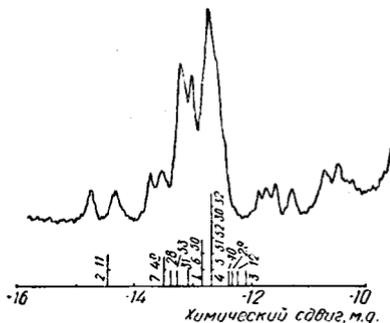


Рис. 24. Спектр ¹Н-ЯМР глутаминовой тРНК из *E. coli* на частоте 300 Мгц в области кольцевых NH-протонов [65].

наблюдалось расщепление сигнала этой пары, что, по мнению авторов, объясняется конформационной гибкостью дигидроуридиловой петли в растворе [66].

Последовательность плавления тРНК^{Фен} в присутствии и в отсутствие ионов магния была изучена в работе [68]. Плавление вторичной структуры происходит в довольно узком температурном интервале ($\Delta T = 15^\circ$). В присутствии магния первыми плавятся пары оснований GC30 и AΨ31 (при температуре 56°). Остальные сигналы уширились при температуре 66° . В отсутствие ионов магния плавление тРНК^{Фен} начинается с акцепторной и дигидроуридиловой ветвей: при 40° наблюдается уширение сигналов пар AU6, AU7, GC13 и AΨ31. Остальные части молекулы плавилась при температуре 53° . Общий характер плавления согласуется с данными оптических исследований [69], которые показали, что в отсутствие Mg^{2+} третичная структура тРНК^{Фен} не оказывает влияния на плавление отдельных ветвей.

Кернс и соавт. [70] методом ПМР изучили влияние удаления модифицированного основания Y на конформацию тРНК^{Фен}. Детальный анализ спектральных изменений в области сигналов NH-протонов показал, что отщепление Y приводит к изменению конформации (раскручиванию) антикодоновой спирали. При этом межплоскостные расстояния в антикодоновой шпильке уве-

личиваются приблизительно на 0,2 Å, тогда как вторичная структура в других ветвях не изменяется. Раскручивание антикодовой спирали приводит к общему уменьшению термодинамической стабильности молекулы [70].

Глутаминовая тРНК из *E. coli*. На рис. 24 приведен спектр ПМР тРНК^{Глу} из *E. coli* по частоте 300 Мгц и рассчитанные теоретические положения сигналов [65]. Вторичная структура глутаминовой тРНК согласно модели клеверного листа содержит 4AU- и 16 GC-пар. Наблюдаемые четыре сигнала в области 13,5—15,0 м. д. хорошо соответствуют рассчитанным положениям пар AU 2, 7, 11 и 49. Интенсивность остальных сигналов согласуется с наличием 16 GC-пар. Данные ЯМР, таким образом, подтверждают модель «клеверного листа» для тРНК^{Глу} из *E. coli*.

Анализ положений сигналов AU-пар позволил получить данные о взаимном пространственном расположении двуспиральных участков. Оказалось, что рассчитанные положения сигналов пар AU7 и AU49, находящихся на внутренних концах акцепторной и ТФС-шпилек, совпадают с экспериментальными только в том случае, если эти две шпильки образуют непрерывную двойную спираль. При отсутствии такого взаимодействия сигналы AU7 и AU49 должны наблюдаться в положении —14,2 м. д., что противоречит наблюдаемому спектру (рис. 24). Таким образом, данные ЯМР подтверждают существование непрерывной двойной спирали, образованной акцепторной и ТФС-шпильками, в растворе. Эта структурная деталь обнаружена и при рентгеноструктурных исследованиях кристаллов тРНК^{Фен} [47, 49]. Анализ положений сигналов GC10 и GC28 в спектре глутаминовой тРНК не подтвердил образование непрерывного тяжа между дигидроуридилевой и антикодовой ветвями, возможность которого предполагалась в ранних рентгеновских исследованиях тРНК^{Фен} [45]. Химический сдвиг сигнала GC1 соответствует величине, рассчитанной в предположении непрерывного стэкинга между основаниями C72 и G73, что также согласуется с данными рентгеноструктурного анализа [47]. В последнее время авторы уточнили отнесение сигналов GC-пар в спектре тРНК^{Глу} [71] и показали, что одна из этих пар (по-видимому, G15—C48) относится к третичной структуре.

При изучении последовательного плавления тРНК^{Глу} установлено, что сначала в интервале 25—49° плавятся пары дигидроуридилсвой ветви и пара G15—C48 третичной структуры. Между 64 и 66° плавится ТФС-ветвь, а при температуре 74° разрушается акцепторная шпилька. Антикодовая ветвь при этой температуре еще сохраняет свою стабильность.

Формилметиониновая тРНК. С помощью метода ЯМР был изучен детальный механизм теплового разворачивания тРНК^{Мет} из *E. coli* в процессе тепловой денатурации [72]. Для формилметиониновой тРНК характерен особенно высокий GC-состав:

17GС- и только 2 АU-пары. При плавлении тРНК_Ф^{Мет} в отсутствие ионов магния первыми уширялись сигналы пар дигидроуридиловой шпильки: GС10, 12, 13 и АU11 (37°). В интервале 38—43° происходило кооперативное плавление ТΨС-спирали. Дальнейшее повышение температуры до 53° приводило к диссоциации антикодоновой ветви: пар АU28, GС29, 30, 31 и 32. Наконец, при температуре 57° начинала плавиться акцепторная шпилька. Следует отметить, что многие сигналы в ЯМР-спектре тРНК_Ф^{Мет} при низкой температуре сильно перекрываются и их трудно идентифицировать. Однако анализ последовательного плавления позволил дать однозначные отнесения всех линий, поскольку отдельные ветви «клеверного листа» плавятся кооперативно.

Структура денатурированной тРНК^{Лей}. В главе 4 были детально рассмотрены биологически активные и неактивные формы тРНК. Согласно данным Фреско и сотр. [73], неактивная «денатурированная» форма лейциновой тРНК из дрожжей существенно отличается по физическим свойствам от нативной формы. Уонг и сотр. [74] провели исследование нативной (Н) и денатурированной (Д) форм тРНК^{Лей} методом ¹H-ЯМР в области поглощения NH-протонов. Сравнение спектров этих форм, полученных на частоте 220 Мгц, показывает, что переход Н→Д сопровождается разрывом 3—5 GС-пар и образованием 1—2 новых АU-пар во вторичной структуре. Переход к рабочей частоте 300 Мгц [75] позволил получить более информативные спектры денатурированной формы тРНК^{Лей} (рис. 25). Для проведения детального анализа спектральных различий между Н- и Д-формами в работе [75] были получены также дифференциальные ЯМР-спектры. С учетом изменений в числе пар оснований при переходе Н→Д Уонг и сотр. [74] рассмотрели все возможные схемы спаривания оснований в денатурированной тРНК^{Лей}. Только для одной схемы, которая показана на рис. 10, отмечено совпадение как с дифференциальным спектром, так и с ЯМР-спектром Д-формы. Рассчитанные для этой модели теоретические положения линий ЯМР хорошо согласуются с экспериментальными величинами (рис. 25). Полученная модель вторичной структуры, как можно видеть, существенно отличается от «клеверного листа». Вместо дигидроуридиловой и антикодоновой ветвей здесь имеется только одна шпилька, в которой спарены основания антикодоновой и ТΨС-петель. Очевидно, что обратный переход из Д- в Н-форму должен сопровождаться разрушением этой новой шпильки. Такое превращение хорошо объясняет большое изменение энтальпии, наблюдаемое для Д→Н-перехода [76]. Естественно предположить, что перестройка вторичной структуры тРНК^{Лей} приводит к существенному изменению и ее третичной структуры. Однако обсуждение деталей третичной структуры денатурированной формы тРНК^{Лей}, по-видимому, еще преждевременно.

Таким образом, ЯМР-исследования в области кольцевых NH-протонов, связанных водородными связями, позволили получить обширный экспериментальный материал о деталях структуры тРНК в растворе*.

Второй методический подход, который применяется при изучении тРНК методом ^1H -ЯМР,— это наблюдение сигналов необмениваемых протонов в D_2O . К необмениваемым протонам тРНК относятся ароматические протоны Н8, Н2 пуриновых, Н6, Н5 пиримидиновых оснований, протоны Н1'—Н5' рибозы, а также протоны CH_3 - и CH_2 -групп минорных нуклеотидов.

Область сигналов ароматических протонов. Сигналы ароматических протонов пуриновых и пиримидиновых оснований тРНК наблюдаются в области спектра ПМР от —4 до —9 м. д. относительно ДСС [79]. Интегральная интенсивность двух широких линий в этой области существенно изменяется при повышении температуры [79], изменении pH [80] и ионной силы раствора [81]. Однако значительное перекрывание отдельных сигналов препятствует получению конкретной информации о структурных переходах в тРНК. Повышение рабочей частоты до 220 Мгц не привело к ожидаемому улучшению разрешения линий [82]. Согласно Беккеру и Молину [83], причиной этого является значительная гетерогенность химических сдвигов протонов, которая дает основной вклад в наблюдаемую ширину линий.

В процессе тепловой денатурации тРНК изменение ширины линий ароматических протонов сопровождается их смещением в область низкого поля [84]. Этот факт, очевидно, связан с разрушением стэкинговых взаимодействий и ослаблением влияния кольцевых токов при плавлении двуспиральных участков во вторичной структуре тРНК. При температуре 80° в спектре ПМР денатурированной тРНК уже наблюдаются отдельные разрешенные сигналы, которые на основании сравнения со спектрами моно- и динуклеотидов были отнесены к линиям протонов Н2, Н8 аденина, Н8 гуанина и Н6 пиримидинов [84].

Хорошо разрешенные спектры в ароматической области удастся получить только для небольших фрагментов тРНК. Так, например, были изучены [85] температурные зависимости химических сдвигов сигналов ароматических протонов в гексануклеотиде 2'-ОмеГАрАрУрАрΨ, выделенном из петли антикодона тРНК^{Фен}. Согласно этим данным, была построена модель конформации данного гексануклеотида в растворе.

Сигналы протонов минорных нуклеотидов. Сигналы алифатических CH_3 - и CH_2 -групп минорных нуклеотидов удобны для ПМР-исследований, так как наблюдаются в высокопольной области спектра (0 ÷ —4 м. д.) и не перекрываются с другими сиг-

* Недавно Райд и сотр. [142] при исследовании на частоте 360 Мгц обнаружили сигналы NH-протонов следующих пар оснований третичной структуры в тРНК^{Вал}: U8—A14, G19—C56, T54—A58, G15—C48, G18—Ψ55 и G46—C22.

налами. Спектры ПМР в области протонов минорных нуклеотидов были получены для суммарной тРНК [84], тРНК^{A_{ла}} [80], тРНК^{Тир} [86] и тРНК^{Фен} [87]. В нативной тРНК сигналы минорных протонов значительно уширены [84]. Это связано, очевидно, с участием сегментов, содержащих минорные нуклеотиды, во взаимодействиях на уровне третичной структуры. Такой вывод подтверждается и выраженным влиянием ионов магния на поведение этих сигналов. При тепловой денатурации стабильность третичной структуры нарушается. Это приводит к появлению вращательной свободы движений минорных нуклеотидов и сужению соответствующих сигналов метильных групп. Ширина линий СН₃- и СН₂-групп в денатурированной тРНК при 80° составляет 3—5 гц.

Спектры ПМР тирозиновой тРНК из *E. coli* на частоте 220 Мгц были получены в работе [86]. тРНК^{Тир} содержит только 4 минорных компонента: риботимидин Т63, 2'-О-метилгуанозин G17 и сильно модифицированные G*35 и A*38. Отнесения сигналов этих нуклеотидов были выполнены путем сравнения со спектром супрессорной тРНК^{Тир}, в которой G*35 замещен на С, а A*38 лишен тиометильной группы. Измерение времени релаксации сигналов метильных групп G*35 и A*38, которые находятся в антикодоновой петле, показало, что эти группы испытывают достаточно свободное внутреннее вращение.

Полное исследование сигналов метильных групп минорных оснований было выполнено для фенилаланиновой тРНК [87] (рис. 26). Анализ температурной зависимости химических сдвигов и ширины сигналов показал, что все протоны можно разделить на три класса. Это позволило авторам сделать некоторые заключения о структуре тРНК^{Фен}.

1. Окружение СН₃-групп антикодоновой петли при плавлении тРНК не меняется. Основание У обращено наружу к растворителю. Это согласуется с данными рентгеноструктурного анализа для тРНК^{Фен} [49].

2. Основания m¹A, m²C и m⁵C удалены от диамагнитных экранирующих областей, так как их сигналы не изменяются при изменении температуры.

3. Нуклеозиды m²G, T и дигидроуридины расположены вблизи сильно экранирующих диамагнитных областей. Такой вывод основан на резких изменениях химических сдвигов и ширины этих сигналов при повышении температуры (рис. 27). Авторы

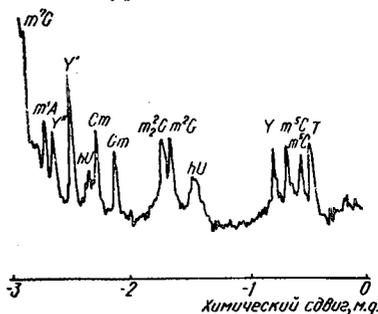


Рис. 26. Спектр ¹H-ЯМР фенилаланиновой тРНК в области поглощения метильных и метиленовых групп минорных оснований на частоте 220 Мгц [87].

связывают эти эффекты с влиянием третичной структуры. Однако более вероятно, что наблюдаемые эффекты вызваны разрушением стэкингových взаимодействий между данными нуклеотидами и соседними диамагнитными основаниями в полинуклеотидной цепи. Третичная структура тРНК^{Фен} при температурах этих переходов (55° для Т и дигидроуридина, 67° для m²G) уже расплавлена, согласно данным ЯМР [68] и УФ-поглощения [122], и не влияет на плавление других фрагментов молекулы.

Таким образом, исследования в области сигналов минорных протонов дают информацию о локальных конформационных изменениях в тРНК. Метильные и метиленовые группы минорных оснований представляют своего рода зонды в структуре тРНК, которые очень чувствительны к изменению магнитных окружений.

Взаимодействие тРНК с лигандами. В процессе биосинтеза белка тРНК связывается с различными макромолекулами: ферментами, белковыми факторами трансляции, рибосомой. Для изучения механизмов таких высокоспецифических взаимодействий необходимы детальные исследования на простых модельных системах. Метод ЯМР позволяет исследовать взаимодействие тРНК с лигандами различной природы: парамагнитными ионами металлов, низкомолекулярными

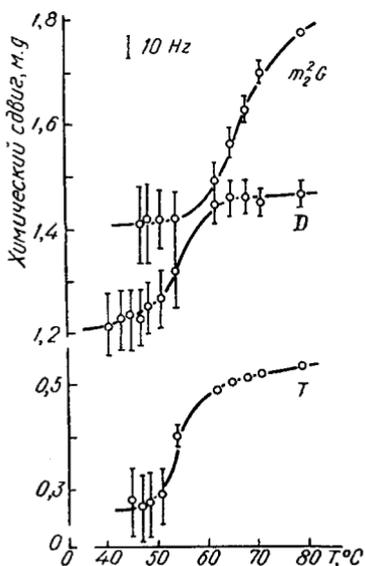


Рис. 27. Температурная зависимость химических сдвигов и ширины линий СН₃-групп риботимидина, N₂-диметилгуанозина и СН₂-групп дигидроуридина [87].

соединениями. Образование комплексов сопровождается изменением параметров спектров ЯМР: увеличением ширины линий и избирательным смещением отдельных сигналов.

В работах Ж. М. Беккера [88] и Л. М. Вайнера с соавт. [89] методом ПМР были исследованы комплексы тРНК с некоторыми алифатическими аминокислотами, олигопептидами и их аналогами, содержащими катионный центр. При связывании с тРНК протонные сигналы этих соединений уширялись, причем наибольшее уширение испытывали ближайшие к аминогруппам протоны. Такая избирательность уширения свидетельствует об электростатическом характере взаимодействия между NH₂-группами аминокислот и пептидов и фосфатными группами тРНК. На основании концентрационных зависимостей уширения сигналов были определены константы устойчивости комплексов [89].

Спектральные изменения, наблюдаемые при комплексообразовании, значительно усиливаются в присутствии парамагнитных ионов. Это связано с сильным диполь-дипольным взаимодействием между ионами и магнитными ядрами исследуемой молекулы. По величине парамагнитного уширения можно рассчитать геометрические расстояния от иона до магнитных ядер, используя формулу Соломона-Бломберга:

$$\Delta\nu = A \frac{\tau_c}{r^6}, \quad (2)$$

где $\Delta\nu$ — ширина линии в комплексе, A — теоретическая константа τ_c — время корреляции, r — расстояние между ионом и ядром.

Вайнер и соавт. [90] провели исследование взаимодействия тРНК с тетраметиламмонием (ТМА) в присутствии ионов Mn^{2+} . Значительное уширение линии ТМА при низких концентрациях тРНК было обусловлено сильным диполь-дипольным взаимодействием координированных на тРНК ионов Mn^{2+} с протонами ТМА. Оценка расстояния r согласно формуле (2) дает величину $\sim 7,3$ Å. Следовательно, местами координации молекул ТМА, ближайших к Mn^{2+} , являются фосфатные группы тРНК.

В работе [90a] были исследованы комплексы тРНК с глицином, β -аланином, γ -аминомасляной кислотой и диглицином методами 1H - и ^{13}C -ЯМР. Выбор этих аминокислот обусловлен тем, что они моделируют простейшие фрагменты белковой молекулы с различными расстояниями между карбоксильной и аминогруппой. Взаимодействие глицина и других аминокислот с тРНК в присутствии Mn^{2+} приводило к уширению линии карбоксильного углерода в спектрах ^{13}C и линии протонов α - CH_2 -групп в спектрах ПМР. Согласно формуле (2) были определены расстояния от координированного на тРНК Mn^{2+} до ядер β - ^{13}C и протонов глицина. Сравнение полученных данных с некоторыми моделями позволили предложить возможную структуру тройного комплекса тРНК — Mn^{2+} — аминокислота. В этой структуре карбоксильная группа аминокислоты связана с Mn^{2+} , а аминогруппа одновременно взаимодействует с фосфатной группой тРНК. Результаты, полученные на модельных системах, позволяют заключить, что тРНК может взаимодействовать с участками фермента с помощью координированных на тРНК ионов Mn^{2+} .

В последнее время Беккер и соавт. [90б] с помощью методов ЯМР и ЭПР показали, что ионы Mn действительно находятся в местах контактов тРНК с АРСазой при рН 7,5. Учитывая тот факт, что ионы Mn замещают ионы магния в ферментативных реакциях, можно ожидать, что обнаруженные взаимодействия вносят существенный вклад в процесс «узнавания».

Метод ^{13}C -ЯМР. Углерод ^{13}C — единственный изотоп этого элемента, обладающий магнитным моментом. Несмотря на малое естественное содержание (1,1%), наблюдение резонанса ^{13}C

дает возможность изучать структуру органических молекул в растворе. Сейчас метод ^{13}C -ЯМР развивается особенно успешно благодаря примененной импульсной Фурье-спектроскопии.

Спектры ^{13}C -ЯМР суммарной тРНК впервые были получены Алерхандом [91]. На рис. 28 приведен спектр ^{13}C концентрированного водного раствора тРНК на частоте 15,18 МГц. Химические сдвиги отдельных сигналов при тепловой денатурации тРНК (27—82°) не изменялись. Данные о молекулярной динамике тРНК в растворе были получены путем оценки времени корреляции из измерений времени релаксации из измерений времени релаксации сигналов ^{13}C . При температуре 81° величина времени корреляции составляет $2,5 \times 10^{-10}$ сек. Такая величина указывает на то, что

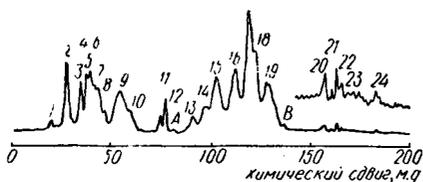


Рис. 28. Спектр ^{13}C -ЯМР суммарной тРНК из дрожжей на частоте 15, 18 МГц [92].

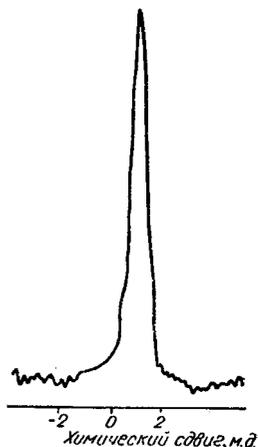


Рис. 29. Спектр ^{31}P -ЯМР валиновой тРНК из дрожжей $2 \cdot 10^{-2}$ М [94].

в денатурированной тРНК сахарофосфатный остов подвержен быстрому сегментному движению. Для нативной тРНК в интервале 35—54° время корреляции равно $3 \cdot 10^{-8}$ сек, что свидетельствует об отсутствии сегментных движений. Кроме основных сигналов ^{13}C -нуклеотидов в спектре наблюдаются и сигналы минорных оснований (рис. 28). Например, сигналы 1,22 и 20 соответствуют углеродам 4, 5 и 6 в дигидроуридине, сигнал А — углероду 5 в риботимидине, сигналы 21 и 23 — углеродам NCH_3 -группы [92]. Измерение ширины линии С5 дигидроуридиновых остатков в нативной тРНК при 41° дает величину ~ 13 гу, что свидетельствует об их быстром вращении. Величина времени корреляции составляет $2 \cdot 10^{-10}$ сек, т. е. в 100 раз меньше, чем общее молекулярное вращение тРНК. Эти данные приводят к выводу, что дигидроуридиновые основания не принимают прямого участия в поддержании третичной структуры тРНК.

Дальнейшие исследования тРНК методом ^{13}C -ЯМР имеют широкие перспективы. Использование парамагнитных ионов, по видимому, позволит определить расстояние от координирован-

ных ионов металлов до углеродов минорных нуклеотидов и, таким образом, получить прямые данные о пространственной структуре тРНК в растворе.

Метод ^{31}P -ЯМР. Широкий диапазон химических сдвигов ядер ^{31}P , равный 500 м. д., позволяет успешно исследовать структуру соединений фосфора. Метод ^{31}P -ЯМР применяли и для исследования транспортных РНК [93, 94]. В работе [93] спектры ^{31}P фенилаланиновой и глутаминовой тРНК были получены в стационарном режиме ЯМР. Применение импульсной спектроскопии с Фурье-преобразованием дает возможность достаточно быстро получать спектры ^{31}P -ЯМР тРНК с хорошим отношением сигнал/шум [94]. Спектр ^{31}P -ЯМР валиновой тРНК из дрожжей показан на рис. 29. Ширина линии фосфатных групп составляет 30 *гц* и определяется в основном гетерогенностью химических сдвигов. При ацетилировании тРНК ширина линии ^{31}P существенно уменьшается, что связано, вероятно, с влиянием ацетильных групп на химические сдвиги фосфатных ядер [94]. Ферментативный гидролиз тРНК панкреатической рибонуклеазой приводил к появлению двух новых линий в низкопольной области спектра соответствующих 3-концевым фосфатам и промежуточным продуктам реакции гидролиза: нуклеозид- и олигонуклеотид-2,3-циклофосфатам [94].

Итак, успешное развитие ЯМР-исследований позволило получить значительный объем информации о структуре тРНК в растворе. К настоящему времени подробно исследована вторичная структура тРНК и дано экспериментальное подтверждение модели «клеверного листа». В ряде случаев определены детали третичной структуры, которые хорошо согласуются с моделями, предложенными на основании рентгеноструктурных исследований кристаллов. Метод ЯМР позволяет изучать механизмы образования специфических комплексов тРНК с различными низкомолекулярными соединениями, исследовать молекулярную динамику тРНК в растворе. Информация, даваемая спектроскопией ЯМР, хорошо дополняет данные рентгеноструктурного анализа кристаллических препаратов тРНК [47, 49].

В последнее время для исследования молекул тРНК привлекаются новые экспериментальные подходы. Весьма перспективным представляется использование методов, основанных на введении в структуру тРНК различных меток-атомов или атомных группировок, имеющих выразительные спектральные характеристики. Такой подход заключается в химической модификации отдельных молекулярных групп тРНК с помощью некоторых химических соединений-меток. В качестве меток могут быть использованы: парамагнитные иминоксильные радикалы (спиновые метки), люминесцентные хромофоры, электронноплотные соединения. Экспериментальные методы, основанные на введе-

нии в структуру ТРНК меток, позволяют получать данные как об общих динамических характеристиках макромолекул, так и о локальной подвижности ее отдельных фрагментов.

МЕТОД СПИНОВЫХ МЕТОК

Спиновые метки представляют собой стабильные иминоксильные радикалы, связанные с исследуемой макромолекулой ковалентной связью. Иминоксильная группа спиновых меток дает хорошо разрешенные спектры электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Сравнительная простота спектров ЭПР и их высокая чувствительность к изменению микроокружения обусловили широкое применение метода спиновых меток при исследовании биополимеров [95].

Спектр ЭПР иминоксильного радикала в модельных условиях (маловязкий растворитель, температура 20°) состоит из трех компонент, имеющих практически одинаковую ширину и интенсивность. Изменение состояния среды, например увеличение вязкости, приводит к изменению подвижности иминоксильного радикала в растворе и, соответственно, к изменению параметров спектров ЭПР. Вращательную подвижность радикала в растворе принято характеризовать временем корреляции τ_c , которое соответствует повороту радикала на 1 радиан. Теория Мак-Коннела позволяет количественно связать τ_c с параметрами спектров ЭПР. Для расчета τ_c по известным параметрам ЭПР-спектра предложено следующее выражение:

$$\tau_c = \alpha \cdot \Delta H_{+1} \left(\sqrt{\frac{I_{+1}}{I_{-1}}} - 1 \right) \cdot 10^{-10} \text{ сек}, \quad (3)$$

где ΔH_{+1} — ширина в эрстедах между точками максимального наклона низкочастотной компоненты спектра, I_{+1} и I_{-1} — амплитуды низкочастотной и высокочастотной компонент, α — теоретический коэффициент. При расчете τ_c по формуле (3) предполагается, что движение радикала носит изотропный характер, т. е. частота переориентации по всем направлениям одинакова и находится в области движений 10^{10} — $5 \cdot 10^8 \text{ сек}^{-1}$.

Метод спиновых меток был предложен и разработан в применении к различным задачам ферментативного катализа, в частности для изучения структуры активных центров ферментов [95]. Однако для нуклеиновых кислот применение этого метода было ограниченным из-за специфических трудностей при избирательной химической модификации. ТРНК в этом отношении является более удобным объектом, поскольку некоторые ее участки (ССА-конец, минорные основания) отличаются повышенной реакционной способностью к модифицирующим агентам.

К настоящему времени синтезирован целый ряд различных спиновых меток, специфически реагирующих с функциональными

группами (табл. 17). В каждой спиновой метке тРНК можно условно выделить три части: 1) парамагнитный радикал, дающий сигнал ЭПР; 2) химически активный фрагмент, который связывается с макромолекулой, и 3) соединяющую группу атомов, «ножку». Для введения спиновой метки в структуру тРНК применяются те же подходы, что и при обычной химической модификации. Получение спин-меченых препаратов тРНК проводят в несколько этапов: 1) инкубация тРНК с раствором соответствующей метки, 2) очистка спин-меченого препарата; 3) определение числа меток, связанных с молекулой [95].

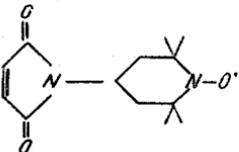
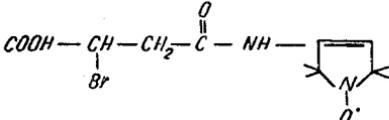
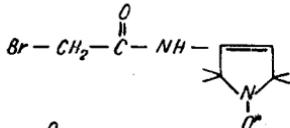
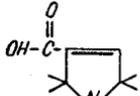
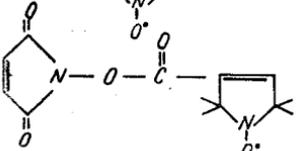
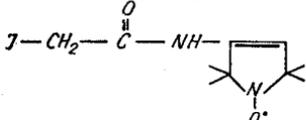
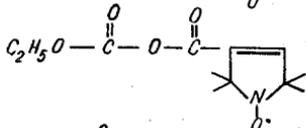
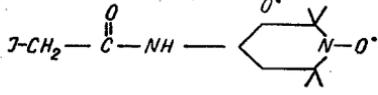
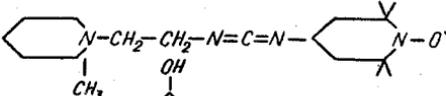
Спиновые метки I—III были использованы в работе Смита и Ямане [96] для модификации тРНК и других полинуклеотидов. Весьма подходящий участок для модификации тРНК — акцепторный конец, который экспонирован в структуре тРНК. Хоффман и сотр. [97, 98] получили спин-меченые препараты аминоксил-тРНК путем связывания меток IV и V с α -аминогруппами аминокислотных остатков. Избирательная посадка этих спиновых меток возможна благодаря тому что основность α -аминогрупп значительно больше основности аминогрупп азотистых оснований тРНК. Аминоацильный остаток может быть модифицирован также и по другим группам. Например, Кабат и соавт. [99] получили спин-меченый препарат цистеинил-тРНК, в котором метка VI была связана с тиоловой группой цистеина. Кроме того, если в составе 3'-конца тРНК с помощью нуклеотидилтрансферазы включить нуклеозид 2-тиоцитидин, его тиоловая группа будет модифицироваться реагентом VIII [102]. Существенно, что в случае последних двух модификаций α -NH₂-группа в аминоксил-тРНК не блокирована меткой, и такая тРНК сохраняет свою адапторную функцию. Модификация по тиоловой группе применялась также для специфического связывания метки III с 4-тиоуридином, входящим в состав тРНК из *E. coli*: тирозинозой, формилмететиониновой, валиновой и фенилаланиновой [100]. Специфичность этой модификации была строго доказана анализом выделенного из гидролизата олигонуклеотида, содержащего 4-тиоуридин.

Мак-Интош [101] синтезировал препарат тРНК, в котором спин-метка была введена в область антикодона. При этом реагент VII избирательно присоединялся к минорному основанию — 2-тиоуридину, входящему в состав антикодона тРНК^{Глу} из *E. coli*. Связывание спиновых меток с тРНК сопровождается замедлением вращательной диффузии иминоксильных радикалов, что приводит к изменениям параметров спектров ЭПР.

Получение препаратов тРНК, в которых спиновая метка была присоединена к акцепторному концу, позволило изучить динамическое поведение этого участка структуры. Исследование температурной зависимости спектров ЭПР спин-меченых аминоксил-тРНК [97—99] показало наличие двух участков на кривой, построенной в координатах $\lg \tau_c - 1/T$. Низкотемпературный и

Таблица 17

Химические формулы спиновых меток, используемых при исследовании тРНК

Номер метки	Соединение	Источник литературы
I		[96]
II		[96]
III		[96, 100]
IV		[97, 98]
V		[97, 98]
VI		[99]
VII		[101]
VIII		[102]
IX		[103]
X		[104]

высокотемпературный участки соответствуют двум энергиям активации спиновой метки, лежащим в пределах 5—6 ккал/моль и 4,7—9,7 ккал/моль. Температура перехода T_{sp} , определяемая по изменению τ_c , существенно зависит от состава растворителя. Добавление в раствор денатурирующих агентов приводит к изменению T_{sp} , однако это изменение не коррелирует с изменением $T_{пл}$, определяемой по оптической плотности. Авторы работ [97—99] объясняют температурную зависимость спектров ЭПР существованием двух конформаций акцепторного конца молекулы тРНК. При температуре ниже T_{sp} акцепторный конец сохраняет упорядоченную конформацию за счет межплоскостных взаимодействий между основаниями. При $T > T_{sp}$ эти взаимодействия разрушаются, что приводит к резкому возрастанию подвижности спиновой метки. Таким образом, данные ЭПР свидетельствуют о том, что локальные конформационные изменения ССА-конца могут не зависеть от общего изменения конформации тРНК.

Аналогичный переход наблюдался для спин-меченой тРНК^{Фен} в интервале температур 10—70° [102]. В этой работе сравнивали подвижность спиновой метки VIII для нативной тРНК и для изолированного концевого пентануклеотида, содержащего эту метку. Было обнаружено, что молекулярное движение метки в тРНК намного более изотропно, чем в олигонуклеотиде.

Хара и сотр. [100] изучили поведение спиновой метки III, связанной с 4-тиоуридиловым остатком тРНК. Такая модификация практически не сказывалась на акцепторной активности, поэтому авторы заключили, что 4-тиоуридиловые остатки находятся на поверхности макромолекулы. Спектры ЭПР различных индивидуальных тРНК — тирозиновой, фенилаланиновой, валиновой и формилметиониновой — существенно различаются по форме, что указывает на различную степень замедления движения спин-метки. Это связано, очевидно, с конформационными отличиями этих тРНК в области расположения 4-тиоуридина.

В работе [101] проведено исследование методом ЭПР глутаминовой тРНК, меченой по антикодону. Полученные экспериментальные данные сравнивали с поведением спин-метки, связанной с акцепторным концом молекулы. Оказалось, что при температурах $T < T_{sp}$ энергии активации для обоих переходов близки по величине. Очевидно, в этом интервале температур переход обусловлен изменением собственного вращения метки, а не конформационным превращением тРНК. Однако при температурах выше T_{sp} плавление тРНК^{Глу} и валил-тРНК различно. Для тРНК^{Глу} температура перехода (T_{sp}) на 20° ниже, а энергия активации — на 6 ккал/моль меньше, чем соответствующие величины для валил-тРНК. На основании полученных данных авторы [101] заключили, что переход в глутаминовой тРНК, очевидно, связан с разрушением межплоскостных взаимодействий в петле антикодона. Химическая модификация спиновой метки

приводит к дополнительному уменьшению стабильности этого участка молекулы.

Для исследования локальной подвижности в системе макромолекула — вода успешно применяется метод спинового зонда. В качестве спиновых зондов используются иминоксильные радикалы или парамагнитные ионы, которые, в отличие от спинометок, связываются с макромолекулой нековалентными взаимодействиями. В работе Б. И. Сухорукова и сотр. [104] метод спинового зонда был применен для исследования транспортной РНК. В качестве зонда использовали иминоксильный радикал X. Были получены спектры ЭПР радикала X при разных относительных влажностях препаратов тРНК. Для сухих препаратов спектры ЭПР свидетельствуют о «замороженном» характере вращения радикала. При повышении содержания воды в препаратах тРНК до 3 молекул на нуклеотид наблюдалось «размораживание» вращательного движения. Увеличение подвижности радикала при сорбции воды связано с уменьшением энергии взаимодействия между молекулами тРНК и с соответствующим возрастанием подвижности сегментов полинуклеотидной матрицы. Наблюдается линейная зависимость увеличения молекулярной подвижности матрицы от числа адсорбированных молекул воды (n). Максимальное изменение частоты вращения радикала достигается при $n=9$, а при $n=12$ этот параметр становится близким к частоте вращения в чистой воде. Таким образом, метод спинового зонда дает информацию о подвижности и структурных превращениях тРНК при сорбции и десорбции воды.

Перспективным направлением развития метода спиновых меток является применение двойных спиновых меток. В этом случае спиновыми метками модифицируют одновременно различные участки макромолекулы. Спектры ЭПР парамагнитных радикалов, как известно [95], существенно зависят от присутствия других парамагнетиков. При этом реализуются два типа взаимодействия между спинами: дипольное и обменное. Диполь-дипольное взаимодействие связано с тем, что один из парамагнетиков с магнитным моментом μ создает в точке нахождения другого локальное магнитное поле напряженностью μ/r^3 . Это взаимодействие проявляется при расстоянии между спинами до 30Å. Обменное взаимодействие возникает в результате перекрытия орбиталей неспаренных электронов при сближении парамагнитных частиц на расстояние 3—5Å. Анализ спектров ЭПР спиномеченой макромолекулы, содержащей две парамагнитные метки, позволяет определить расстояние между ними. Метод двойных спиновых меток широко применяется для изучения различных ферментов в растворе. В последнее время такой подход был использован для оценки расстояний между координированными на тРНК^{Вал} ионами Mn и спиновыми метками, связанными с α -аминогруппой аминокислотного остатка, тиюридином и псевдоуридином [105].

Эффективным подходом для дальнейшего исследования тРНК нам представляется анализ спин-меченых препаратов методом ЯМР-спектроскопии. Согласно теории магнитного резонанса, дипольные и контактные взаимодействия между электронными и ядерными спинами приводят к изменению параметров спектров ЭПР и ЯМР. По величине парамагнитного уширения линий ЯМР можно рассчитать геометрические расстояния между спин-меткой и исследуемыми ядрами. Такой путь, по-видимому, позволит независимо определить детали трехмерной структуры тРНК в растворе*.

МЕТОД ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ МЕТОК

Люминесцентные исследования тРНК развиваются по двум основным направлениям. Первое состоит в использовании люминесцентных свойств некоторых минорных нуклеотидов: 4-тиоуридина [106, 107] или У-нуклеозида [108, 109]. Второй подход основан на введении в структуру тРНК люминесцентных меток. В этом разделе мы рассмотрим основные результаты применения люминесцентных меток для исследования пространственной структуры тРНК.

Использование метода люминесцентных меток основано на явлении миграции энергии между донорным (Д) и акцепторным (А) хромофорами. Эффект миграции энергии осуществляется по индуктивно-резонансному механизму, количественная теория которого была разработана Ферстером [110] и М. Д. Галаниным [110а]. Согласно квантовомеханической теории, эффективность миграции энергии обратно пропорциональна шестой степени расстояния (R) между донором и акцептором. Для расчета величины R используют приближенное выражение [111]:

$$R = 9,79 \cdot 10^3 (Jn^{-4} K^2 Q)^{1/6}, \quad (4)$$

где J — интеграл перекрывания спектров люминесценции донора и поглощения акцептора, n — показатель преломления среды, K^2 — фактор ориентации, Q — квантовый выход люминесценции донора.

Возможно несколько вариантов метода миграции энергии: а) люминесцирующими донорами служат функциональные группы макромолекулы, а акцептором — метка-тушитель; б) донором является люминесцентная метка, акцептором — хромофорная группа макромолекулы; в) донором и акцептором при миграции служат люминесцентные метки.

Удобным объектом для исследований эффекта переноса энергии может быть фенилаланиновая тРНК, которая содержит в 3'-положении к антикодону люминесцирующий нуклеозид У.

* Недавно Дэниел и Кон [143] сообщили о первом исследовании спин-меченой тРНК_ф^{Мет} методом ¹Н-ЯМР.

Квантовый выход флуоресценции Y достаточно высокий [111], поэтому его можно использовать в качестве донора при миграции. В работе Бердсли и Кантора [111] было проведено исследование третичной структуры тРНК^{Фен} с помощью изучения миграции энергии. Донором служил Y -нуклеозид, а акцепторами — некоторые красители, связанные ковалентно с 3'-концом молекулы: акрифлавин (АФ), профлавиногидразид (ПФ) и 9-гидразинакридин (ГА). Миграция энергии приводила к тушению люминесценции донора и появления сенсibilизированной люминесценции акцептора. Наибольшие изменения люминесценции (20—30%) наблюдались для пары Y —АФ. Оптические характеристики нуклеозида Y и акрифлавина представлены на рис. 30.

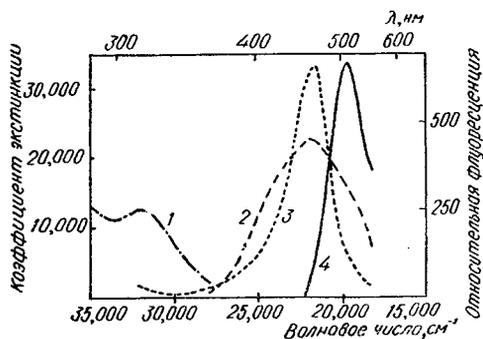


Рис. 30. Оптические свойства нуклеотида Y и акрифлавина:

1 — спектр возбуждения основания Y , увеличенный в 5 раз; 2 — скорректированный спектр излучения тРНК, увеличенный в 5 раз; 3 — спектр поглощения акрифлавина, связанного с тРНК; 4 — спектр излучения акрифлавина, связанного с тРНК [100].

хромосомами необходимо знать относительную ориентацию дипольных моментов переходов. Взаимное положение дипольных моментов характеризует фактор ориентации K^2 , который для случайного расположения равен $2/3$. В работе [111] были рассчитаны расстояния между донорно-акцепторной парой в предположении случайной ориентации дипольных моментов меток. Проведенный анализ привел к выводу, что расстояние от нуклеотида Y до красителя, связанного с акцепторным концом молекулы тРНК, составляет 40—60 Å. Необходимо отметить, что явление тушения люминесценции, кроме миграции энергии по индуктивно-резонансному механизму, может быть обусловлено и другими причинами, например химическим взаимодействием между люминесцирующими хромофорами, молекулярными столкновениями в растворе, экранированием и др. Однако дополнительные исследования позволяют выделить вклад в тушение, который обусловлен переносом энергии по индуктивно-резонансному механизму. Этот процесс обычно преобладает при исследовании в разбавленных растворах и при удалении донорного и акцепторного хромофоров на расстояние больше 10 Å [95].

Тао и соавт. [112] исследовали миграцию энергии между основанием Y фенилаланиновой тРНК и красителем этидиум-бро-

мидом (ЭБ), связанным с двуспиральными участками тРНК. Изучение зависимости тушения флуоресценции Y от концентрации ЭБ показало, что расстояние между донором и акцептором существенно меньше радиуса миграции. Так как величина радиуса миграции для пары Y — ЭБ составляет 23 Å, это свидетельствует о расположении молекул красителя на двуспиральном участке, ближайшем к области антикодона в тРНК^{Фен}.

Применение метода миграции энергии позволило получить данные о пространственном расположении двуспиральных фрагментов в тРНК [113]. Авторы работы [113] изучали миграцию энергии между молекулами красителей, адсорбированных на двуспиральных участках. Полученные данные сравнивали с аналогичными исследованиями, проведенными на других двуатомных биополимерах: ДНК и поли (AU). Было показано, что эффективность миграции энергии на тРНК значительно больше, чем на ДНК и поли (AU), а также превышает величину, которую можно ожидать для линейной модели молекулы тРНК. Расстояние между молекулами красителей, связанных с двуспиральными участками в тРНК, оказалось порядка 37 Å. Эта величина накладывает ограничения на возможные модели пространственной структуры тРНК.

При практическом использовании метода миграции энергии необходимо учитывать неопределенность величины фактора ориентации K^2 , так как обычно относительная ориентация хромофоров неизвестна. В случае крайних ориентаций меток (перпендикулярной и параллельной) величина K^2 может изменяться от 0 до 4. Однако вследствие того, что зависимость R от K^2 выражается корнем шестой степени, величина $K^2=2/3$ оказывается достаточно точным приближением и дает удовлетворительные результаты при расчете расстояний между хромофорами. В работе Дэйла и Айзингера [114] был проведен теоретический анализ зависимости фактора ориентации K^2 от вращательной подвижности донора и акцептора. Это дало возможность определить минимальное и максимальное значения K^2 для случая донорно-акцепторной пары Y — акрифлавин в фенилаланиновой тРНК [115]. При этом вращательная подвижность донора была определена из экспериментов по деполяризации флуоресценции, а подвижность акцепторного хромофора оценена по литературным данным. На основании полученных предельных величин K^2 и по измерению эффективности миграции энергии для пары Y — АФ в работе [115] рассчитаны верхний и нижний пределы расстояния от донора к акцептору. Интервал возможных расстояний между этими хромофорами составил 34 — 61 Å. Верхний предел хорошо согласуется с расстоянием от Y-нуклеозида до ССА-конца, полученным из рентгеноструктурных данных для кристаллов тРНК^{Фен} [46], если учесть неопределенность положения акрифлавина относительно акцепторного конца молекулы.

Во всех случаях, рассмотренных выше, люминесцентная мет-

ка вводилась только в один участок молекулы тРНК — 3'-конец. Однако для получения более подробной информации о пространственной структуре тРНК необходимо ввести метки в различные участки молекулы и измерить несколько расстояний между хромофорами. Модификация функциональных центров тРНК несколькими люминесцентными метками, однако, сопряжена с методическими трудностями, кроме того, возникает возможность нарушения ее биологической активности. В работе [116] был разработан метод замещения Y-нуклеозида в тРНК^{Фен} на сильно флуоресцирующие красители: ПФ и ЭБ. Авторы показали, что такая модификация практически не влияет на биологическую активность тРНК. Метод позволяет также вводить люминесцентные метки в другие участки структуры: в положения 7-метилгуанозина и дигидроуридина.

В последнее время развитие методов специфической модификации позволило синтезировать производные тРНК с люминесцентными хромофорами, введенными одновременно в различные участки молекулы. Так, Янг и Золь [117] получили пять видов тРНК с двойными люминесцентными метками. В качестве меток использовали красители: акрифлавин (АФ), профлавинсуцинилгидразин (ПФСГ), антранил (Ант) и 4-бромметил-7-метоксибензпирен (БМБ). Для тРНК_Ф^{Мет} из *E. coli* получены следующие производные с двойными метками:

- 1) 5'-конец — Ант, 3'-конец — АФ;
- 2) 4-тиоуридин — БМБ, 3'-конец — ПФСГ;
- 3) псевдоуридин — БМБ, 3'-конец — ПФСГ;
- 4) псевдоуридин — БМБ, дигидроуридин — ПФСГ.

В глутаминовой тРНК из *E. coli* метки были связаны: в антикодоне с 2-тиоуридином — БМБ, с 3' — концом — ПФСГ. Исследование миграции энергии между донорным и акцепторным хромофорами было проведено исходя из предположения случайной ориентации меток ($K^2=2/3$). Эффективность миграции определяли по величине сенсibilизированной люминесценции акцептора. В результате были рассчитаны внутримолекулярные расстояния в тРНК между: 5'- и 3'-концами, 4-тиоуридином и 3'-концом, псевдоуридином и 3'-концом, псевдоуридином и дигидроуридином, антикодonom и 3'-концом, которые составили соответственно: 24, 38, 55, 36 и >65 Å. Из полученных данных можно сделать ряд выводов о структуре тРНК: 1) структура тРНК хорошо согласуется с моделью «клеверного листа», что следует, например, из расстояний между 4-тиоуридином и 3'-концом и между 5'- и 3'-концами; 2) акцепторный участок молекулы удален от ТΨС-петли; 3) антикодон находится на большом расстоянии от акцепторного конца.

Представляет интерес сравнение полученных величин с соответствующими расстояниями в модели трехмерной структуры тРНК, построенной на основании рентгеноструктурных данных. Согласно модели Рича и сотр. [47], в тРНК^{Фен} эти расстоя-

ния равны: 25 Å, 41, 53, 23 и 74 Å, т. е. наблюдается хорошее соответствие геометрических параметров структуры тРНК в кристаллическом состоянии и в растворе. Единственное отклонение отмечено только для расстояния между псевдоуридиновым и дигидроуридиновым остатками, т. е. между двумя петлями, которые пространственно сближены в третичной структуре тРНК. Возможное объяснение такого различия — стерические ограничения, которые возникают при сближении красителей, связанных с этими участками. Такие стерические эффекты могут приводить к увеличению расстояния между дигидроуридиновой и ТФС-петлями тРНК и, следовательно, к уменьшению компактности ее структуры.

Таким образом, метод люминесцентных меток имеет широкие возможности для исследования пространственной структуры тРНК. Различные варианты метода люминесцентных меток могут быть успешно применены для изучения молекулярных механизмов взаимодействия тРНК с ферментами и рибосомами.

Можно предполагать, что сочетание методов спиновых и люминесцентных меток с другими экспериментальными подходами, например методом ЯМР, приведет к установлению пространственной структуры тРНК без привлечения рентгеноструктурных исследований.

Следует, однако, отметить, что точность определения расстояний с помощью меток уступает точности рентгеноструктурного анализа. Кроме того, химическая модификация тРНК различными метками может приводить к нарушению ее биологически активной конформации. Однако, несмотря на эти ограничения, методы меток являются эффективным подходом для исследования молекулярной структуры тРНК.

Широкое применение при изучении структуры тРНК нашли оптические методы исследования — спектрофотометрия в ультрафиолетовой и инфракрасной области спектра, методы спектрополяриметрии, комбинационное рассеяние света и др. Оптические методы, как правило, не дают прямой информации о пространственной структуре макромолекул, но их использование для анализа динамических конформационных превращений и взаимодействий с другими молекулами весьма эффективно.

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ УФ-СПЕКТРОСКОПИЯ

Спектры нуклеиновых кислот в ближней УФ-области обусловлены поглощением азотистых оснований. При образовании спирального полимера из мономерных единиц — нуклеотидов наблюдается гипохромный эффект, который максимален при 260 нм. Поскольку величина гипохромного эффекта пропорциональна степени спиральности полинуклеотида, представляется возможным исследование переходов спираль — клубок в поли-

мере при изменении таких параметров, как температура, рН, ионная сила раствора и т. д. Зависимость величины гипохромного эффекта от температуры (кривая плавления) показывает, что денатурация тРНК не является простым одноэтапным процессом. Для анализа отдельных этапов перехода спираль — клубок был разработан метод дифференциальной спектроскопии.

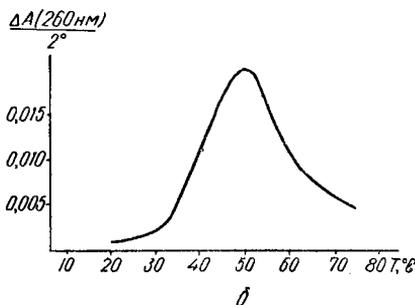
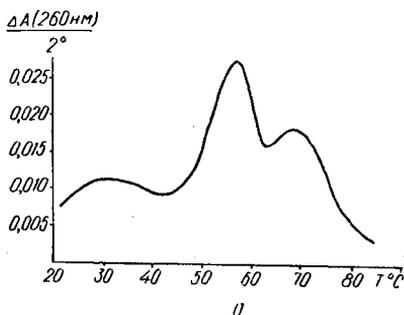


Рис. 31. Дифференциальные УФ-спектры поглощения аланиновой (а) и фенилаланиновой (б) тРНК в 0,1 М NaCl, 0,01 М какодилате Na pH 6,8.

показано, что спектр денатурации, т. е. разность между поглощением нативной и денатурированной нуклеиновой кислоты как функция длины волны меняется линейно с изменением GC-состава. Это позволяет определить относительное содержание AU- и GC-пар. В наибольшей степени различия между спектрами AU- и GC-пар выражены при длинах волн 240, 260 и 280 нм, поэтому удобно пользоваться отношениями величин $\Delta A(260 \text{ нм})/\Delta A(240 \text{ нм})$ и $\Delta A(260 \text{ нм})/\Delta A(280 \text{ нм})$. Изучение зависимости этих отношений от температуры позволяет детально охарактеризовать природу каждого перехода в процессе плавления тРНК [120].

тРНК^{Ала}. На дифференциальной кривой плавления аланиновой тРНК из дрожжей обнаружены три хорошо разрешенных

При получении обычных кривых плавления исследуют температурную зависимость абсолютного поглощения. В дифференциальном методе измеряется разность поглощений ΔA идентичных растворов при двух различных температурах. Разность температур ΔT составляет обычно 1—2°. Зависимость величины $\Delta A/\Delta T$ от температуры дает производную от обычной кривой плавления. При этом отдельные ступени на обычной кривой плавления переходят в максимумы на дифференциальной кривой. На рис. 31 показаны дифференциальные кривые плавления аланиновой и фенилаланиновой тРНК из дрожжей, полученные в работах [118, 119]. Величина разности температур $\Delta T=2^\circ$ была выбрана с учетом наклона дифференциальной кривой плавления. Дополнительную информацию о характере плавления тРНК дает анализ зависимости изменения поглощения ΔA от длины волны. Было

максимума (рис. 31, а). Температура переходов для каждого из этих этапов соответственно равна 30, 55 и 70°. На основании модели двух состояний были рассчитаны изменения энтальпии, ΔH , для каждого перехода: переход 1—40 ккал/моль, переход 2—130 ккал/моль, переход 3—70 ккал/моль [119]. Детальный анализ величин ΔA (260 нм)/ ΔA (280 нм) показал, что наблюдаемые отдельные переходы неоднородны. Для дальнейшего исследования конформационных переходов в тРНК был использован метод температурного скачка [121]. Эксперименты по температурному скачку показали, в первую очередь, наличие быстрого релаксационного процесса ($\tau=0,1$ мксек) в пределах исследуемого интервала температур 15—85°. Этот процесс, очевидно, связан с нарушением стэкингových взаимодействий в одноплетчатых участках тРНК. Переходу 1 соответствует также медленный релаксационный процесс ($\tau=200$ мксек). В пределах перехода 2 обнаружены два релаксационных процесса ($\tau_1=1$ мсек и $\tau_2=240$ мксек). Переход 3 включал один релаксационный процесс со временем релаксации $\tau=40$ мксек при 80°. Наличие четырех различных времен релаксации свидетельствует о том, что плавление отдельных фрагментов структуры тРНК происходит в разных интервалах температур. Каждый из этих процессов связан с плавлением отдельной ветви «клеверного листа». Одна из основных проблем при определении термодинамических параметров кооперативных переходов спираль — клубок состоит в оценке вклада от стэкинга в одноплетчатых участках. Обычные кривые плавления дают общую величину, которая соответствует суммарному плавлению двуспиральных и одноплетчатых фрагментов. Использование метода релаксационной кинетики позволяет разделить вклады этих двух процессов, так как разрушение межплоскостных взаимодействий происходит значительно быстрее, чем кооперативное плавление двуспиральных шпилёк.

тРНК^{Фен}. На дифференциальной кривой плавления фенилаланиновой тРНК из дрожжей (рис. 31, б), в отличие от аналогичной кривой для тРНК^{Ала}, не наблюдается отдельных, хорошо выраженных переходов. С целью дальнейшего анализа дифференциальных кривых в работах [118, 122] проведено исследование изолированных фрагментов тРНК^{Фен}, что позволило выделить последовательные этапы конформационного перехода. При температуре выше 60° дифференциальная кривая плавления нативной тРНК^{Фен} совпадает с суммой кривых плавления ее отдельных половин. Следовательно, поведение молекул тРНК^{Фен} при высокой температуре связано в основном с диссоциацией дигидроуридиловой и ТФС-ветвей. Интерпретация низкотемпературной части кривой плавления тРНК^{Фен} оказалась более сложной. Релаксационные исследования выделяют в этой области три отдельных перехода, связанных с последовательным плавлением третичной структуры, а также акцепторной и антикодоновой вет-

вей. Конформационный переход, который относится к плавлению третичной структуры тРНК^{Фен}, характеризуется резко выраженной зависимостью от концентрации ионов магния в растворе. Термодинамическая стабильность антикодоновой шпильки в отдельных фрагментах и в составе тРНК существенно различается. Наблюдаемая дестабилизация антикодоновой ветви в нативной тРНК, согласно Райзнеру [122], возможно, связана с электростатическим влиянием соседних фрагментов молекулы. Гипохромизм и энтальпия перехода спираль — клубок в антикодоновой шпильке хорошо согласуются с величинами, предсказываемыми для модели «клеверного листа».

тРНК_Ф^{Мет}. В работе Крозерса и сотр. [72] проведено комплексное изучение тепловой денатурации тРНК_Ф^{Мет} из *E. coli* методами релаксационной кинетики и ЯМР. При плавлении тРНК были обнаружены 5 релаксационных переходов со временем релаксации от 20 мксек до 10 мсек. В то же время исследования, проведенные методом ЯМР, показали наличие четырех отдельных этапов, соответствующих плавлению спиральных ветвей тРНК. Авторы работы [72] предположили, что каждый релаксационный процесс соответствует независимому плавлению отдельной спиральной шпильки. Связь релаксационных переходов с этапами ЯМР-плавления была установлена путем экстраполяции времен релаксации к низким температурам, где их величина составляла 5 мсек. Поскольку 5 мсек — характеристическое время жизни протона в двойной спирали, такой подход позволил однозначно связать релаксационные процессы с уширением отдельных групп сигналов в спектрах ЯМР. На основании проведенного анализа релаксационные переходы τ_3 , τ_4 и τ_5 были отнесены к плавлению, соответственно, ТФС-, антикодоновой и акцепторной шпилек. Для двух остальных релаксационных процессов интерпретация оказалась более сложной. Процесс плавления τ_1 был обнаружен только для изоакцепторной фракции тРНК_{Ф₃}^{Мет}, в которой основание m⁷G в положении 47 замещено на аденин. Этот переход, очевидно, связан с плавлением третичной структуры. Релаксационный процесс τ_2 был обнаружен только для тРНК_{Ф₁}^{Мет}. Данный процесс включает диссоциацию дигидроуридиловой шпильки. Однако общая энтальпия этого перехода составляет 50 ккал/моль, из которых только 28 ккал/моль могут быть связаны с плавлением шпильки. Дополнительный вклад обусловлен, очевидно, плавлением третичной структуры тРНК_{Ф₁}^{Мет}. Большое время релаксации этого процесса (10 мсек) соответствует времени, необходимому для образования третичной структуры тРНК в растворе. Термодинамические и кинетические характеристики отдельных переходов при плавлении тРНК_Ф^{Мет} представлены в табл. 18. Температура плавления переходов определялась по максимумам на дифференциальных кривых плавления. Каждый релаксационный процесс в первом

приближении можно рассматривать как переход между двумя состояниями. В этом случае сравнительно просто определить энтальпийные изменения по ширине дифференциальной кривой плавления. Энергии активации переходов, E_a , были оценены по наклону линий экстраполяции, построенных в аррениусовых координатах.

Таблица 18

Некоторые термодинамические и кинетические характеристики отдельных переходов в тРНК_Ф^{Мет} [72]

Переход	Область структуры	Время релаксации	$T_{пл}$, °C	ΔH , ккал/моль	E_a , ккал/моль
1	Третичная структура тРНК _Ф ^{Мет}	4 мсек	30 ± 1	30 ± 5	25
2	Третичная структура и Д-шпилька тРНК _Ф ^{Мет}	10 мсек	46 ± 1	52 ± 5	50
3	ТΨС-ветвь	20 мсек	61 ± 2	54 ± 10	55
4	Антикодоновая ветвь	100 мсек	70 ± 2	58 ± 15	52
5	Акцепторная ветвь	2 мсек	77 ± 2	70 ± 10	77

На основании совместных релаксационно-кинетических и ЯМР-исследований Крозерс и сотр. [72] предложили следующую схему тепловой денатурации тРНК_Ф^{Мет}:

- 1) диссоциация дигидроуридиловой спирали;
- 2) разрушение третичной структуры;
- 3) плавление ТΨС-ветви;
- 4) плавление антикодоновой шпильки;
- 5) плавление акцепторного стебля.

Таким образом, наиболее легкоплавким участком в структуре тРНК_Ф^{Мет} является дигидроуридиловая ветвь. Локальный конформационный переход, связанный с независимой диссоциацией этой ветви, может приводить к резкому возрастанию внутримолекулярной подвижности отдельных фрагментов тРНК_Ф^{Мет}. Вследствие этого антикодон и акцепторный конец могут совершать свободные движения, которые, возможно, необходимы для функционирования тРНК на рибосоме.

Приведенная выше последовательность плавления тРНК_Ф^{Мет} представляет собой прямой путь. Однако нельзя исключить возможность возникновения промежуточных процессов с обратным порядком плавления. Подобное усложнение характера плавления, например, возможно для перехода τ_4 , который перекрывается с переходами τ_3 и τ_4 .

Метод дифференциальной УФ-спектроскопии, таким образом, позволяет детально исследовать конформационные переходы в тРНК и определять термодинамические и кинетические параметры отдельных этапов плавления.

Спектроскопия в инфракрасной области интенсивно применяется для исследования биологических макромолекул, в том числе нуклеиновых кислот. Переходы в ИК-области имеют значительно меньшую интенсивность (\sim в 100 раз) по сравнению с электронными переходами. Поэтому для получения ИК-спектров биополимеров необходимы большие концентрации вещества. В первом приближении ИК-спектр тРНК можно рассматривать как суперпозицию спектров отдельных компонентов полинуклеотидной цепи: азотистых оснований, остатков сахара, фосфатных групп. Наличие внутримолекулярных взаимодействий в тРНК приводит к дополнительным изменениям в спектрах, что усложняет их интерпретацию. Однако исследования на модельных системах позволяют произвести однозначные отнесения наблюдаемых линий к отдельным молекулярным группам.

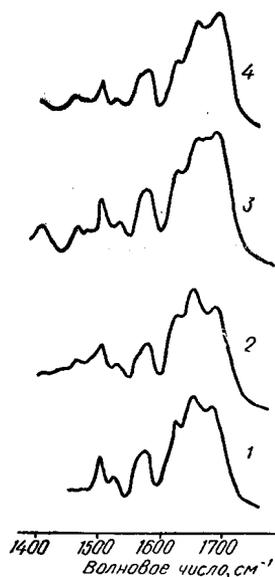


Рис. 32. ИК-спектры поглощений в области 1400—1750 см^{-1} дейтерированных пленок четырех образцов тРНК из дрожжей (влажность 92%) [123]:

1 — тРНК^{Тир}, 2 — тРНК^{Мет}, 3 — тРНК^{Вал}, 4 — тРНК^{Ала}.

Приготовление образцов для ИК-спектроскопии отличается от методов, применяемых в УФ-спектроскопии. Это связано с тем фактом, что практически все растворители в инфракрасной области спектра непрозрачны. Поэтому вместо обычной воды используют растворы в тяжелой воде, D_2O . Перспективным подходом при изучении полимеров представляется использование тонких пленок исследуемого вещества. Пленки получают осаждением полимера на подложку из негигроскопического материала. Метод тонких пленок применялся при изучении некоторых образцов тРНК с помощью ИК-спектроскопии [123]. Спектры ИК-поглощения в области 1450—1750 см^{-1} были получены для дейтерированных пленок

аланиновой и валиновой тРНК из дрожжей и тирозиновой и формилметиониновой тРНК из *E. coli* (рис. 32). Поглощение обусловлено валентными колебаниями двойных связей $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}=\text{N}$ и $\text{C}=\text{C}$ и плоскими деформационными колебаниями групп NH и NH_2 . Спектральные исследования в этой области позволяют определить число спаренных и свободных оснований во вторичной структуре. В работе [123] на основании модели «клеверного листа» были рассчитаны теоретические ИК-спектры для тРНК, которые хорошо согласовались с экспериментальными спектрами,

что служит подтверждением правильности модели «клеверного листа».

Исследование водных растворов тРНК методом ИК-спектроскопии было предпринято в работе Тсубои и сотр. [124]. ИК-спектры в области $1500\text{—}1800\text{ см}^{-1}$ были получены для формил-метиониновой тРНК. По положению и относительной интенсивности линий в ИК-спектре авторы рассчитали количество АУ- и GC-пар, а также число неспаренных оснований. Линии поглощения в ИК-спектре тРНК с частотами 1520 и 1500 см^{-1} относятся к остаткам цитозина, находящимся, соответственно, в связанном и свободном состояниях. Данные об отношении интенсивностей этих линий позволяют изучать плавление вторичной структуры тРНК [124].

Экспериментальные исследования различных фрагментов тРНК_Ф^{Мет} методом ИК-спектроскопии были предприняты в работах [125, 126]. Интерпретация ИК-спектров фрагментов основывалась на серии рассчитанных модельных спектров. Число пар оснований рассчитывали по отношению интенсивностей в области $1670\text{—}1960\text{ см}^{-1}$ и $1640\text{—}1650\text{ см}^{-1}$. Полученные данные подтверждают схему спаривания оснований по типу «клеверного листа». Предполагается, что водородные связи в каждом отдельном двуспиральном фрагменте формируются независимо от остальных частей молекулы. Рекомбинация комплементарных фрагментов приводит к восстановлению вторичной структуры тРНК. Изучение температурной зависимости ИК-спектров отдельных фрагментов тРНК_Ф^{Мет} позволило изучить их термодинамическую стабильность [125, 126].

СПЕКТРОСКОПИЯ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ СВЕТА

В процессе рассеяния света веществом обнаруживается характерное рассеяние, которое отличается от падающего излучения на частоту внутримолекулярных колебаний. Этот эффект называется комбинационным рассеянием света (Рамановское рассеяние). Комбинационное рассеяние (КР) обусловлено нерезонансным поглощением энергии. Спектроскопия КР позволяет изучать переходы между колебательными и вращательными уровнями энергии в молекулах и служит хорошим дополнительным методом к ИК-спектроскопии. В последнее время метод КР развивается особенно интенсивно благодаря широкому использованию лазеров в качестве источников возбуждения. Усовершенствование экспериментальной техники позволило получить спектры КР для целого ряда биологических соединений, в том числе и для транспортных РНК.

В работах Тсубои [127] и Томаса с сотр. [128—131] были получены спектры КР различных индивидуальных тРНК: формилметиониновой, валиновой, фенилаланиновой и глутаминовой. КР-спектр водного раствора тРНК в области $200\text{—}2000\text{ см}^{-1}$ со-

стоит приблизительно из 35 линий, которые обусловлены колебаниями азотистых оснований, остатков сахара и фосфатных групп. Для отнесения линий КР к отдельным молекулярным группам были использованы результаты исследований на модельных системах: нуклеозидах, нуклеотидах и т. д. На рис. 33 приведены спектры КР фенилаланиновой тРНК в растворах H_2O и D_2O ; показаны частоты отдельных линий и их соответствующие отнесения (точность $\pm 2 \text{ см}^{-1}$). Наиболее интенсивные

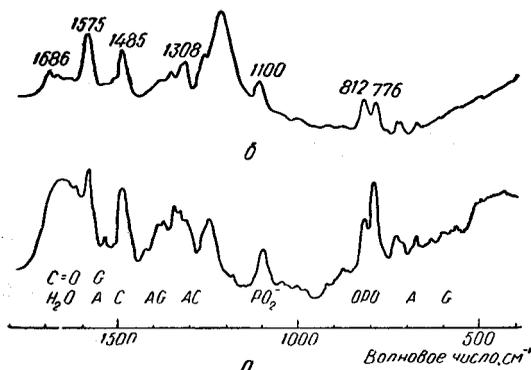


Рис. 33. Спектры комбинационного рассеяния света фенилаланиновой тРНК из дрожжей в растворах H_2O (а) и D_2O (б) [130].

линии в КР-спектре тРНК обусловлены валентными колебаниями СС- и СN-связей пуриновых и пиримидиновых оснований. Интенсивность линий деформационных колебаний СН-, NH- и ОН-групп — на порядок меньше, а линии фосфатных групп имеют промежуточную интенсивность. Переход от H_2O к D_2O приводит к существенным изменениям в КР-спектре, особенно в области $1200\text{—}1700 \text{ см}^{-1}$. Это связано с зависимостью валентных колебаний в кольце от деформационных колебаний NH-связей азотистых оснований. Линии колебаний фосфатных групп с частотами 814 и 1100 см^{-1} при дейтерообмене изменяются незначительно.

Согласно Томасу и Хартману [128], отношение интенсивностей линий колебаний фосфатных групп 814 и 1100 см^{-1} отражает процентное содержание нуклеотидов, включенных в двуспиральные участки. Для тРНК^{Фен} это отношение составляет $1,40 \pm \pm 0,03$, что соответствует включению $\sim 85\%$ всех фосфатных групп в упорядоченную структуру [130]. Аналогичные величины были получены и для других индивидуальных тРНК [128]. Рассмотренные данные хорошо соответствуют моделям третичной структуры тРНК [47, 49], в которых число спаренных оснований значительно больше, чем в открытой модели «клеверного листа».

Для различных индивидуальных тРНК наблюдаются существенные отличия в области $1150\text{--}1450\text{ см}^{-1}$. По мнению авторов [130], это может быть связано с различным характером упаковки пуриновых оснований в разных тРНК. Кроме того, дополнительные изменения в этой спектральной области, очевидно, обусловлены присутствием минорных компонентов.

Линия с частотой 725 см^{-1} в спектре фенилаланиновой тРНК была отнесена к колебаниям дигидроуридиновых остатков D16 и D17. В спектре КР глутаминовой тРНК из *E. coli*, которая не содержит остатков дигидроуридина, эта линия отсутствует [130]. В этой же области спектра наблюдаются колебания и других минорных оснований, например 4-тиоуридина [128].

Тепловая денатурация тРНК приводит к характерным изменениям в спектрах КР. На основании проведенных исследований Томас и сотр. [128] сделали следующие выводы о структуре тРНК:

1) конформационные структуры различных тРНК близки друг другу;

2) конформация сахаро-фосфатного остова тРНК отличается от конформации остова в рибосомальной РНК;

3) тепловая денатурация при повышении температуры до 75° приводит к разрыву пар оснований и к уменьшению межплоскостных взаимодействий.

Спектры комбинационного рассеяния могут быть получены не только для водных растворов, но и для твердых препаратов. Так, Хен и сотр. [141] получили спектры КР двух кристаллических форм тРНК^{Фен}: орторомбической и гексагональной. Спектры КР обеих форм оказались практически идентичными, что свидетельствует о сохранении структуры тРНК при различном способе упаковки молекул в кристалле. Был также проведен сравнительный анализ спектров КР тРНК^{Фен} в кристаллическом состоянии и в растворе. Положение и интенсивность характеристических линий КР в кристалле и в водном растворе оказались весьма близкими. Например, для линии колебаний фосфодиэфирных связей 814 см^{-1} при переходе от кристаллического состояния к раствору наблюдается только незначительное изменение интенсивности (1,2%), которое находится в пределах погрешности измерений. Таким образом, данные КР подтверждают вывод о том, что при кристаллизации структура тРНК не претерпевает существенных изменений. Хен и Томас [130] провели исследование лиофильно высушенных образцов тРНК. У безводного препарата тРНК в области спектра $1600\text{--}1700\text{ см}^{-1}$ обнаружена интенсивная широкая линия с частотой 1692 см^{-1} . Линия была отнесена к валентным колебаниям двойных связей карбонильных групп в урidine, гуанозине и цитидине. Соотношение интенсивностей симметричных колебаний фосфатных групп с частотами 814 и 1100 см^{-1} имеет такую же величину, как и в водных растворах тРНК. На основании этого авторы заключили, что упорядочен-

ная конфигурация сахаро-фосфатного остова тРНК сохраняется и в лиофилизированном состоянии. Однако отсутствие характерной линии колебаний ОН-групп в области $3300\text{--}3600\text{ см}^{-1}$ предполагает, что в этом случае степень гидратации тРНК сильно уменьшена.

КРУГОВОЙ ДИХРОИЗМ

В настоящее время при исследовании конформационных превращений в биополимерах широкое распространение получили спектрополяриметрические методы, в том числе круговой дихроизм (КД). Основное преимущество КД по сравнению с другими физическими методами состоит в возможности исследования малых количеств вещества в разбавленных растворах, когда отсутствуют межмолекулярные взаимодействия. Кроме того, не нужно проводить специального препарирования исследуемых образцов. Однако существенная сложность метода состоит в трактовке полученных результатов, поскольку до сих пор нет теории, которая бы удовлетворительно объясняла спектры КД.

Исследования двухтяжевых нуклеиновых кислот показали, что спектры КД очень чувствительны к изменению геометрических параметров двойной спирали. Вследствие этого метод КД эффективно применяется при изучении переходов между различными формами двуспиральных нуклеиновых кислот (основные результаты этих исследований суммированы в обзоре В. И. Иванова [132]). Двойная спираль РНК, согласно рентгенографическим данным [40], может существовать в А-форме (11 пар оснований на виток спирали, угол между соседними основаниями $\alpha = 32,7^\circ$) или же А'-форме (12 пар оснований на виток, $\alpha = 30^\circ$). Переходы между А- и А'-формами можно вызвать изменением концентрации соли в растворе. В работах [133, 134] показано, что увеличение концентрации NaCl в водном растворе тРНК приводит к сдвигу положительной полосы КД в длинноволновую сторону и к увеличению амплитуды полосы при 210 нм . Естественно предположить, что такое изменение связано с закручиванием двойной спирали тРНК под действием катионов (переход А12→А11). Переход имеет некооперативный характер и представляет собой непрерывное изменение структуры. Действие соли можно объяснить тем, что увеличивая концентрацию катионов, мы нейтрализуем заряды фосфатных групп и стабилизируем конформацию с более узким спиральным желобом.

Представляет интерес поведение двойной спирали тРНК в малополярных условиях, например при добавлении органических растворителей. В работах [133, 136] были получены спектры КД тРНК в водно-этанольных растворах. Оказалось, что в этом случае увеличение концентрации катионов приводит к обратному эффекту — раскручиванию двухтяжевых фрагментов (переход А11→А12). Такое различие объясняется тем, что в водно-спир-

товых растворах не образуется дебаевская оболочка из катионов вокруг фосфатных групп, а происходит формирование прочных комплексов гидратированных катионов с фосфатными группами. В этих условиях форма спирали в значительной степени зависит от геометрии комплекса. Аналогичные выводы об изменении конформации тРНК в водно-органических растворах были получены и Крамером с сотр. [59]. Таким образом, данные КД указывают на то, что в органических растворителях молекулы тРНК могут находиться в частично разупорядоченной форме.

Детальный анализ влияния различных катионов на конформацию тРНК был проведен в работе [134]. На рис. 34 показаны спектры КД тРНК в зависимости от концентрации катионов в растворе. При низкой ионной силе (10^{-4} М) в отсутствие двухвалентных ионов молекулы тРНК находятся в неупорядоченном состоянии (кривая 1).

Добавление ионов Mg^{2+} до концентрации 10^{-2} М приводит к образованию упорядоченной структуры (кривая 2). Кривая 1 отличается меньшей величиной амплитуды положительной полосы. Уменьшение амплитуды положительного максимума КД, очевидно, вызвано нарушением вертикальной стопочной упаковки оснований в тРНК при низкой ионной силе. Дальнейшее увеличение концентрации ионов магния выше 1,0 М приводит к разрушению нативной структуры тРНК, при этом наблюдается резкое снижение амплитуды положительной линии КД и ее сдвиг до 278 нм (кривая 3). Разрушение структуры тРНК связано с тем, что конформационные возможности двойной спирали РНК ограничены (из-за стерических препятствий 2'-ОН-группы) и дальнейшее закручивание спирали невозможно. Кроме того, при больших концентрациях $MgCl_2$ значительная часть воды гидратирована ионами, что приводит к изменению гидрофобных взаимодействий между основаниями в тРНК.

Исследования температурной зависимости спектров КД валлиновой тРНК и ее половин в работе [135] позволили сделать ряд выводов о термодинамической стабильности различных участков макромолекулы. Начало плавления тРНК и отдельных фрагментов в отсутствие ионов магния характеризуется смещением максимума положительной полосы КД в длинноволновую

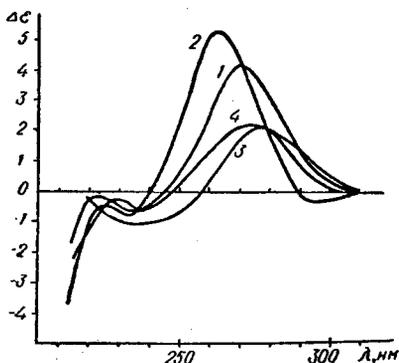


Рис. 34. Спектры кругового дихроизма различных форм тРНК [134]:

1 — $1,5 \cdot 10^{-4}$ М NaCl; 2 — 0,01 М $MgCl_2$;
3 — 4,8 М $MgCl_2$; 4 — 10^{-4} М $MnCl_2$.

область. Такое изменение предполагает возможность перехода A11→A12 и коррелирует с изменением третичной структуры тРНК. При дальнейшем повышении температуры плавится дигидроуридиновая ветвь, а затем антикодонная шпилька. В конце плавится непрерывная двойная спираль, состоящая из акцепторной и ТфС-ветвей [136]. Добавление ионов магния приводит к стабилизации структуры тРНК, и процесс плавления приобретает кооперативный характер. В целом, характер температурной зависимости спектров КД согласуется со схемой спаривания оснований по типу «клеверного листа».

В работе Виллика и Кея [137] методом КД были изучены конформационные переходы в некоторых индивидуальных тРНК из *E. coli*. При повышении концентрации ионов магния в растворе наблюдалось увеличение амплитуды полос КД при 210 и 260 нм. Специфические спектральные изменения были обнаружены в области 310—380 нм, которая обусловлена наличием минорного нуклеозида — 4-тиоуридина.

Спектры КД фенилаланиновой тРНК из дрожжей в области 310—340 нм также значительно изменяются при добавлении в раствор ионов магния [138]. Добавление ионов магния приводит к разрушению нативной структуры тРНК, при этом наблюдается резкое снижение амплитуды линии КД при 325 нм и к параллельному росту интенсивности флуоресценции Y.

Приведенные экспериментальные данные хорошо иллюстрируют возможности метода КД для изучения конформационных переходов в тРНК. Различные аспекты применения кругового дихроизма в исследованиях нуклеиновых кислот и их компонентов более детально рассмотрены в обзорных публикациях [132, 139, 140].

Таким образом, интенсивные исследования последних лет с применением ряда физических методов завершились установлением молекулярной структуры тРНК. Предложенная ранее эмпирическая модель «клеверного листа» получила строгое экспериментальное подтверждение. Рентгеноструктурный анализ с разрешением 3 Å позволил установить пространственную геометрию молекул тРНК в кристалле. С помощью методов ЯМР, комбинационного рассеяния и люминесцентных меток определены некоторые детали структуры тРНК в растворе. В большинстве случаев отмечена хорошая корреляция с параметрами кристаллической структуры. Данные о статической конформации хорошо дополняются исследованиями динамических свойств молекул тРНК. Совместное использование методов релаксационной кинетики и ЯМР позволило детально изучить молекулярный механизм разворачивания тРНК и определить термодинамические и кинетические характеристики отдельных переходов. Для интерпретации результатов и количественных расчетов широко использовались результаты изучения модельных систем.

В настоящее время основное внимание привлечено к проблеме специфических взаимодействий тРНК с другими компонентами белоксинтезирующей системы: ферментами, информационной РНК, рибосомами. Можно надеяться, что большой объем информации о структуре тРНК, полученный с помощью физических методов, будет способствовать успешному развитию этих исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Tissieres A. Some properties of soluble ribonucleic acid from *E. coli*.— *J. Mol. Biol.*, 1959, **1**, 365.
2. Doctor B. P., Fuller W., Webb N. L. Arrangement of the helical regions in *E. coli* tyrosine tRNA.— *Nature*, 1969, **221**, 58.
3. Holley R., Apgar J., Everett G., Madison J., Marquisee M., Merrill S., Penswick J., Zamir A. Structure of a ribonucleic acid.— *Science*, 1965, **147**, 1462.
4. Henley D., Lindahl T., Fresco J. Hydrodynamic-changes accompanying the thermal denaturation of transfer ribonucleic acid. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1966, **55**, 191.
5. Киселев Н. А., Киселев Л. Л. Электронная микроскопия растворимых рибонуклеиновых кислот.— *ДАН СССР*, 1961, **141**, 980.
6. Fröholm L. O., Olsen B. R. Electron microscopy of transfer RNA.— *J. Mol. Biol.*, 1969, **40**, 305.
7. Fröholm L. O., Olsen B. R. A conformational model of serine transfer RNA, proposed on the basis of electron microscopy.— *FEBS Lett.*, 1969, **3**, 182.
8. Fröholm L. O., Olsen B. R. Electron microscopy of transfer RNA. *J. Ultrastruct. Res.*, 1969, **29**, 564.
9. Price P., Hancock R. Electron microscopy of negatively stained tRNA.— *Nature*, 1973, **241**, 529.
10. Aberman R., Yoshikami D. High-resolution shadowing of transfer RNA.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1972, **69**, 1587.
11. Ottensmeyer F. D. Macromolecular fine structure by dark field electron microscopy.— *Biophys. J.*, 1969, **9**, 1144.
12. Korn A., Ottensmeyer F. D. Structure determination of transfer RNA using dark field electron microscopy.— *Federat. Proc.*, 1974, **33**, 1353.
13. Krigbaum W., Godwin R. Small-angle X-ray study of transfer RNA.— *Science*, 1966, **154**, 423.
14. Krigbaum W., Godwin R. Small-angle X-ray study of alanine transfer ribonucleic acid and bulk yeast transfer ribonucleic acid.— *Macromolecules*, 1968, **1**, 375.
15. Connors P. G., Labanauskas M., Beeman W. W. Structural studies of transfer RNA: the molecular conformation in solution.— *Science*, 1969, **166**, 1528.
16. Ninio J., Favre A., Yaniv M. Molecular model for transfer RNA.— *Nature*, 1969, **223**, 1333.
17. Ninio J., Luzatti V., Yaniv M. Comparative small-angle X-ray scattering studies on unacylated, acylated and cross-linked *E. coli* transfer RNA_{Val}.— *J. Mol. Biol.*, 1972, **71**, 217.
18. Вайнштейн Б. К., Фейгин Л. А. Об упорядоченном расположении молекул растворимой РНК в водных растворах.— *ДАН СССР*, 1965, **161**, 1444.
19. Туманян В. Г., Есипова Н. Г., Киселев Л. Л. Исследование формы и размеров молекул тРНК методом рассеяния рентгеновских лучей под малыми углами.— *ДАН СССР*, 1966, **168**, 211.
20. Pilz J., Kratky O., Gramer F., Haar F., Schlimme E. On the conformation of phenylalanine specific transfer RNA.— *Europ. J. Biochem.*, 1970, **15**, 401.

21. Clark B. F. C., Doctor B. P., Holmes K. C., Klug A., Marcker K., Morris S. J., Paradies H. H. Crystallization of transfer RNA.— *Nature*, 1968, **219**, 1222.
22. Kim S. H., Rich Single crystal of transfer RNA an X-ray diffraction study.— *Science*, 1968, **162**, 1381.
23. Hampel A., Labanauskas M., Connors P. G., Kirkegaard L., Raj Bhandary U., Sigler P. B., Bock R. M.— *Science*, 1968, **162**, 1384.
24. Cramer F., Haar F., Saenger W., Schlimme E. Einkristalle von phenylalanin spezifischer Transfer-Ribonucleinsäure.— *Angewandte Chem.*, 1968, **80**, 969.
25. Fresco J. R., Blake R. D., Langridge R. Crystallization of transfer ribonucleic acids from unfractionated mixtures.— *Nature*, 1968, **220**, 1285.
26. Kim S. H., Rich A. Crystalline transfer RNA: the three-dimensional Patterson function of 12-Angström resolution.— *Science*, 1969, **166**, 1621.
27. Vold B. S. Crystallization of yeast phenylalanine transfer RNA.— *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1969, **35**, 222.
28. Young J., Bock R., Nishimura S., Ishikura H., Yamada Y., Raj Bhandary U., Labanauskas M., Connors P. G. Structural studies on transfer RNA: crystallization of formalmethionine and leucy-cyane transfer RNA's.— *Science*, 1969, **166**, 1527.
29. Paradies H. H., Sjöquist J. Crystallographic study of valine tRNA from yeast.— *Nature*, 1970, **226**, 159.
30. Cramer F., Haar F., Holmes K., Saenger W., Schlimme E., Schulz G. Crystallization of yeast phenylalanine transfer ribonucleic acid.— *J. Mol. Biol.*, 1970, **51**, 521.
31. Blake R. D., Fresco J. R., Langridge R. High resolution X-ray diffraction by single crystals of mixtures of transfer RNA's.— *Nature*, 1970, **225**, 32.
32. Васильченко В. М., Мацука Г. Х., Осика В. Д., Бабій Т. П., Горячева Л. О., Коваленко М. Й. Кристалізація сумарної транспортної РНК тваринного походження.— *Укр. біохім. журн.*, 1973, **45**, 284.
33. Васильченко В. М., Веркін Б. І., Мацука Г. Х., Осика В. Д., Бабій Т. П., Коваленко М. Й., Горячева Л. О. Кристалізація сумарної транспортної РНК печінки кролів в системі діоксан — вода.— *Доп. АН УРСР*, сер. Б, 1973, **5**, 449.
34. Осика В. Д., Васильченко В. Н. Кристаллографія нуклеиновых кислот.— В кн.: *Молекулярная биология*, Вып. 9. Киев, «Наукова думка», 1973, **30—52**.
35. Мелик-Адамян В. Р., Жилыева Т. И. Кристаллизация белков и транспортных рибонуклеиновых кислот.— В кн.: *Молекулярная биология*, 2. М., ВИНТИ, 1973, **7—54**.
36. Kim S. H., Quigley G. Y., Suddath F. L., Rich H. High-resolution X-ray diffraction patterns of crystalline transfer RNA that show helical regions.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1971, **68**, 841.
37. Mirzabekov A. D., Rhodes D., Finch Y. T., Klug A., Clark B. Crystallization of tRNA's as acetyltrimethylammonium salts.— *Nature New Biol.*, 1972, **237**, 27.
38. Kim S. H., Quigley G., Suddath F. L., McPherson A., Sneden D., Kim J. J., Weinzierl J., Rich A. X-ray crystallographic studies of polymorphic forms of yeast phenylalanine transfer RNA.— *J. Mol. Biol.*, 1973, **75**, 421.
39. Cramer F. Three-dimensional structure of tRNA.— *Progr. Nucl. Acid. Res. and Mol. Biol.*, 1971, **11**, 391.
40. Arnott S. The structure of transfer RNA.— *Progr. Biophys. and Mol. Biol.*, 1970, **21**, 265.
41. Есіпова Н. Г. Рентгеноструктурний аналіз белков.— В кн.: *Молекулярная биология*, 2. М., ВИНТИ, 1973, **55—131**.

42. Туманян В. Г. Рентгеноструктурный анализ нуклеиновых кислот.— В кн.: Молекулярная биология, 2. М., ВИНТИ, 1973, 132—182.
43. Schmidt F. J., Bock R. M., Hecht S. M. Chemical modification of transfer RNA species heavy atom derivatization of aminoacyl tRNA.— *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1972, 48, 451.
44. Kim S. H., Quigley G., Suddath F., McPherson A., Sneden D., Kim J. J., Weinzierl J., Blattmann P., Rich A. The three-dimensional structure of yeast phenylalanine transfer RNA: shape of the molecule at 5.5 Å resolution.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1972, 69, 3746.
45. Kim S. H., Quigley G., Suddath F., McPherson A., Sneden D., Kim J. J., Rich A. The three-dimensional structure of yeast phenylalanine transfer RNA: folding of the polynucleotide chain seen at 4.0 Å resolution.— *Science*, 1973, 179, 285.
46. Suddath F., Quigley G., McPherson A., Sneden D., Kim J. J., Kim S. H., Rich A. The three-dimensional structure of yeast phenylalanine transfer RNA at 3.0 Å resolution.— *Nature*, 1974, 248, 20.
47. Kim S. H., Suddath F., Quigley G., McPherson A., Susman J., Wang A., Seeman N., Rich A. Three-dimensional tertiary structure of yeast phenylalanine transfer RNA.— *Science*, 1974, 185, 435.
48. Ladner J., Finch Y. T., Klug A., Clark B. F. High-resolution X-ray diffraction studies on pure species of transfer RNA.— *J. Mol. Biol.*, 1972, 72, 99.
49. Robertus J. D., Ladner Y. E., Finch J. T., Rhodes D., Brown R., Clark B. F., Klug A. Structure of yeast phenylalanine tRNA at 3.0 Å resolution.— *Nature*, 1974, 250, 546.
50. Rossmann M. G., Blow D. M. Solution of the phase equations representing non-crystallographic symmetry.— *Acta cryst.*, 1964, 17, 1474.
51. Levitt M. Detailed molecular model for transfer ribonucleic acid.— *Nature*, 1969, 224, 759.
52. Levitt M. Orientation of double-helical segments in crystals of yeast phenylalanine transfer RNA.— *J. Mol. Biol.*, 1973, 80, 255.
53. Yaniv M., Favre A., Barrell B. G. Evidence for interaction between two non-adjacent nucleotide residues in tRNA^{Val} from *E. coli*.— *Nature*, 1967, 223, 1331.
54. Fuller W., Hodgson A. Conformation of the anticodon loop in tRNA.— *Nature*, 1967, 215, 817.
55. Quigley G., Suddath F., McPherson A., Kim J. J., Sneden D., Rich A.— The molecular structure in monoclinic crystals.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1974, 71, 2146.
56. Klug A., Robertus J., Lander Y., Brown R., Finch J. Conservation of the molecular structure of yeast phenylalanine transfer RNA in two crystal forms.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1974, 71, 3711.
57. Robertus J., Ladner Y., Rhodes D., Brown R., Klwakwrkw kw Clark B., Klug A. Correlation between three-dimensional structure and chemical reactivity of tRNA.— *Nucl. Acid. Res.*, 1974, 1, 927.
58. Schevitz R., Rosa J., Pasek M., Navia M., Cornick G., Hewitt W., Sigler P. Crystallographic structure analysis of initiator tRNA.— *Federat. Proc.*, 1974, 33, 1353.
59. Prinz H., Maelicke A., Cramer F. Unfolding of yeast transfer ribonucleic acid species caused by addition of organic solvents and studied by circular dichroism.— *Biochemistry*, 1974, 13, 1322.
60. Johansen J., Velez B. Differences between the conformation of arsanilazatyrosine 248 of carboxypeptidase A in the crystalline state and in solution. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1971, 68, 2532.
61. Yardenetzky O., Wade-Yardenetzky N. G. Applications of nuclear magnetic resonance spectroscopy to the study of macromolecules.— *Ann. Rev. Biochem.*, 1971, 40, 605.
62. Kearns D. R., Patel D., Shulman R. G., Yamane T. High reso-

- lution nuclear magnetic resonance study of base pairing in four purified transfer RNA molecules.— *J. Mol. Biol.*, 1971, **61**, 265.
63. Kearns D. R., Patel D., Shulman R. G. High resolution nuclear magnetic resonance studies of hydrogen bonded protons of tRNA in water.— *Nature*, 1971, **229**, 338.
 64. Wong Y. P., Kearns D. R., Reid B. R., Shulman R. G. Investigation of exchangeable protons and the extent of base pairings in transfer RNA by high resolution NMR.— *J. Mol. Biol.*, 1972, **72**, 725.
 65. Shulman R. G., Hilbers C. W., Kearns D., Reid B., Wong Y. P. Ring-current shifts in 300 MHz NMR spectra of six purified transfer RNA molecules.— *J. Mol. Biol.*, 1973, **78**, 57.
 66. Lightfoot D. R., Wong K. L., Kearns D., Reid B., Shulman R. G. Assignment of the low field proton NMR spectrum of yeast phenylalanine transfer RNA to specific base pairs.— *J. Mol. Biol.*, 1973, **78**, 71.
 67. Giessner-Pretre C., Pullman B. Intermolecular nuclear shielding values for protons of purines and flavins.— *J. Theor. Biol.*, 1970, **27**, 87.
 68. Hibbers C. W., Shulman R. G., Kim S. H. High resolution NMR study of the melting of tRNA^{Phe}.— *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1973, **55**, 953.
 69. Crothers D. M., Hilbers C. W., Shulman R. G. Nuclear magnetic resonance study of hydrogen-bonded ring protons in Watson-Crick base pairs.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1973, **70**, 2899.
 70. Kearns D. R., Wong K. L., Wong Y. P. Effect of the removal of the Y base on the conformation of yeast tRNA^{Phe}.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1973, **70**, 3843.
 71. Hilbers C. W., Shulman R. G. Assignment of the hydrogen bonded proton resonances in *E. coli* tRNA^{Glu} by sequential melting.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1974, **71**, 3239.
 72. Crothers D., Cole P., Hilbers C. W., Shulman R. G. The molecular mechanism of thermal unfolding of *E. coli* formylmethionine transfer RNA.— *J. Mol. Biol.*, 1974, **87**, 63.
 73. Adams A., Lindahl T., Fresco J. R. Conformational differences between the biologically active and inactive forms of a tRNA.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1967, **57**, 1684.
 74. Wong Y. P., Kearns D., Shulman R., Yamane T., Chang S., Chirikjian J. G., Fresco J. R. High resolution NMR study of base pairing in the native and denatured conformers of transfer RNA₃^{Leu}.— *J. Mol. Biol.*, 1973, **74**, 403.
 75. Kearns D., Wong Y. P., Hawkins E., Chang S. Model for the secondary structure of the denatured conformer of yeast tRNA₃^{Leu}.— *Nature*, 1974, **247**, 541.
 76. Webb P. K., Fresco J. R. Tritium exchange studies of transfer RNA in native and denatured conformations.— *J. Mol. Biol.*, 1973, **74**, 387.
 77. Wong Y. P., Reid B. R., Kearns D. Conformation of charged and uncharged tRNA^{Phe}.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1973, **70**, 2193.
 78. Shulman R. G., Hilbers C. W. High resolution proton NMR of tRNA^{Glu} *E. coli* complexes with EF Tu and synthetase.— *Federat. Proc.*, 1974, **33**, 1353.
 79. McDonald C. C., Phillips W. D. NMR study of the secondary structure of sRNA.— *Biopolymers*, 1965, **3**, 603.
 80. Inoue Y., Nakanishi K. PMR study of nucleic acids.— *Biochim. Biophys. Acta*, 1966, **120**, 311.
 81. Smith J., Yamane T., Shulman R. G. Proton magnetic resonance of tRNA.— *Science*, 1968, **159**, 1360.
 82. Smith Y., Yamane T., Shulman R. G. Proton magnetic resonance studies at 220 MHz of alanine transfer RNA.— *Canad. J. Biochem.*, 1969, **47**, 480.
 83. Беккер Ж. М., Молин Ю. Н. Интерпретация спектров ЯМР транспортной РНК.— *Биофизика*, 1969, **14**, 1001.

84. Корнелюк А. И., Благоей Ю. П., Васильченко В. Н., Гусева И. С., Мадука Г. Х. Исследование конформационных переходов в тРНК методом ЯМР.— ДАН УССР, сер. Б, 1975, 1, 64.
85. Kreishman G. P., Miller J., Dea P., Hussain Z., Wilson L. A., Schweizer M. P. 300 MHz PMR studies on the conformation of the hexanucleotide from anticodon loop of torula yeast tRNA^{Phe}.— Biochem. Biophys. Res. Commun., 1974, 58, 27.
86. Koehler K. M., Schmidt P. G. NMR study of the modified base resonances of tRNA^{Tyr} *E. coli*.— Biochem. Biophys. Res. Commun., 1973, 50, 370.
87. Kan L. S., Ts'o P., Haar F., Sprinzl M., Cramer F. NMR study on the methyl and methylene proton resonances of tRNA^{Phe} from yeast.— Biochem. Biophys. Res. Commun., 1974, 59, 22.
88. Backer J. M., Molin Y. N., Sorokin A. S. PMR study of the interaction of aminoacids and dipeptides with sRNA.— Biochem. Biophys. Res. Commun., 1970, 38, 871.
89. Вайнер Л. М., Беккер Ж. М., Молин Ю. Н. Исследование взаимодействия низкомолекулярных соединений, содержащих катионный центр, с тРНК методом ПМР.— Биофизика, 1973, 18, 12.
90. Weiner L. M., Backer J. M., Molin Y. N. PMR study of tRNA complexes with low-molecular-weight compounds using Mn-ions.— FEBS Lett., 1973, 29, 348.
- 90a. Weiner L. M., Backer J. M., Rezvukhin A. I. Participation of manganese ions complexed with tRNA in the interaction with aminoacids and dipeptides.— Biochim. Biophys. Acta, 1975, 383, 316.
- 90b. Backer J. M., Vocel S. V., Weiner L. M., Oshevskii S. I., Lavrik O. I. Coordination of Mn²⁺ ions at contact sites between tRNA and aminoacyl-tRNA synthetase.— Biochem. Biophys. Res. Commun., 1975, 63, 1019.
91. Komoroski R., Allerhand A. Natural abundance carbon-13 FT NMR-spectra and spin-lattice relaxation times of unfractionated yeast transfer RNA.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1972, 69, 1804.
92. Komoroski R., Allerhand A. Observation of resonances from some minor bases in the natural abundance carbon-13 NMR spectrum of unfractionated yeast transfer RNA. Evidence for fast internal motion of dihydrouracil rings.— Biochemistry, 1974, 13, 369.
93. Gueron M. ³¹P-magnetic resonance of purified tRNA.— FEBS Lett., 1971, 19, 264.
94. Weiner L. M., Rezvukhin A. I. ³¹P-NMR studies of tRNA.— FEBS Lett., 1974, 41, 40.
95. Лихтенштейн Г. И. Метод спиновых меток в молекулярной биологии. М., «Наука», 1974.
96. Smith I., Yamane T. Spin-labeled nucleic acids.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1967, 58, 884.
97. Hoffman B., Schofield P., Rich A. Spin-labeled transfer RNA.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1969, 62, 1195.
98. Schofield P., Hoffman B., Rich A. Spin-labeling studies of aminoacyl transfer ribonucleic acid.— Biochemistry, 9, 2525, 1970.
99. Kabat D., Hoffman B., Rich A. Synthesis and properties of spin-labeled aminoacyl transfer RNA.— Biopolymers, 1970, 9, 95.
100. Hara H., Horiuchi T., Saneyoshi M., Nishimura S. 4-thiouridine-specific spin labeling of *E. coli* transfer RNA.— Biochem. Biophys. Res. Commun., 1970, 38, 305.
101. McIntosh A., Caron M., Dugas H. A specific spin labeling of the anticodon of *E. coli* tRNA^{Glu}.— Biochem. Biophys. Res. Commun., 1973, 55, 1356.
102. Sprinzl M., Kramer E., Steglik D. On the structure of tRNA^{Phe} from yeast. Spin-label studies.— Eur. J. biochem., 1974, 49, 595.
103. Girshovich A. S., Grachev M. A., Knorre D. G., Kuma-

- rev V. P., Levintahl V. I. Reaction of a spin-labeled carbodiimid with nucleotides, poly-U and tRNA. FEBS Lett., 1971, 14, 199.
104. Сухоруков Б. И., Вассерман А. М., Козлова Л. А., Бучаченко А. Л. Использование метода парамагнитного зонда для изучения системы нуклеиновая кислота — вода. ДАН СССР, 1967, 177, 454.
 105. Vocel S. V., Slepnevа I. A., Backer J. M. Influence of Mn^{2+} ions coordination on tRNA^{Val} macrostructure and determination of some coordination sites of Mn^{2+} ions in tRNA^{Val}.—Biopolymers, 1976, in press.
 106. Seno T., Kobayashi M., Nishimura S. Characteristic behavior of 4-thiouridine region of individual amino acid-specific *E. coli* tRNA's upon heat denaturation.—Biochim. Biophys. Acta, 1969, 174, 71.
 107. Pochon F., Cohen S. 4-thiouridine and the conformation of *E. coli* tRNA induced by spermidine.—Biochem. Biophys. Res. Commun., 1972, 47, 720.
 108. Robinson B., Zimmerman T. A conformational study of yeast phenylalanine transfer RNA.—J. Biol. Chem., 1971, 246, 110.
 109. Yoshikami D., Katz G., Keller E., Dudock K. A fluorescence assay for phenylalanine transfer RNA.—Biochim. Biophys. Acta, 1968, 166, 714.
 110. Förster T. Zwischenmolekulare energiewanderrung und fluoreszenz.—Annalen für Physik, 1948, 2, 55.
 - 110a. Галанин М. Д.—Труды Физического института АН СССР, 1960, 12, 3.
 111. Beardsley K., Cantor C. Studies of transfer RNA tertiary structure by singlet-singlet energy transfer.—Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1970, 65, 39.
 112. Tao T., Nelson J., Cantor C. Conformational studies on transfer ribonucleic acid. Fluorescence lifetime and nanosecond depolarisation measurements on bound ethidium bromide.—Biochemistry, 1970, 9, 3514.
 113. Трубицын С. Н., Суrowая А. Н., Борисова О. Ф. Миграция энергии между молекулами красителей, адсорбированных на ТРНК.—Мол. биол., 1971, 5, 419.
 114. Dale R., Eisinger J. Intramolecular distances determined by energy transfer. Dependence on orientational freedom of donor and acceptor.—Biopolymers, 1974, 13, 1573.
 115. Blumberg W., Dale R., Eisinger J., Zucherman D. Energy transfer in tRNA^{Phe} (yeast). The solution structure of transfer RNA.—Biopolymers, 1974, 13, 1607.
 116. Wintermeyer W., Zachan H. Replacement of Y-dase dihydrouracil and 7-methylguanine in tRNA by artificial odd bases.—FEBS Lett., 1971, 18, 214.
 117. Yang C., Söll D. Studies of transfer by singlet-singlet energy transfer.—Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, 71, 2838.
 118. Römer R., Riesner D., Maass G. Resolution of five conformational transitions in phenylalanine specific tRNA from yeast.—FEBS Lett., 1970, 10, 352.
 119. Riesner D., Römer R., Maass G. Thermodynamic properties of the three conformational transitions of alanine specific transfer RNA from yeast.—Biochem. Biophys. Res. Commun., 1969, 35, 369.
 120. Römer R., Reisner D., Coutts S., Maass G. The coupling of conformational transitions in alanine specific transfer ribonucleic acid from yeast studied by a modified differential absorption technique.—Eur. J. Biochem., 1970, 15, 77.
 121. Reisner D., Römer R., Maass G. Kinetic study of the three conformational transitions of alanine specific transfer RNA from yeast.—Eur. J. Biochem., 1970, 15, 85.
 122. Reisner D., Maass G., Thiebe R., Philippsen P., Zachau H. The conformational transitions in yeast tRNA^{Phe} as studied with tRNA^{Phe} fragments.—Eur. J. Biochem., 1973, 36, 76.

123. Tsuboi M., Shuto K., Takemura S., Nishimura S. Infrared spectral of several transfer RNA.—Bull. Chem. Soc. Japan, 1969, 42, 102.
124. Tsuboi M., Highuchi S., Kyogoku Y., Nishimura S. Infrared spectra of tRNA's. II. tRNA^{Met} from *E. coli* in water solution.—Biochim. Biophys. Acta, 1969, 195, 23.
125. Katsura T., Morikawa K., Tsuboi M., Kyogoku Y., Seno T., Nishimura S. Infrared spectra of transfer RNA's. III. Fragments of formylmethionine tRNA from *E. coli*.—Biopolymers, 1971, 10, 681.
126. Morikawa K., Tsuboi M., Kyogoku Y., Seno T., Nishimura S. Infrared spectrum of an anticodon fragment of a transfer RNA.—Nature, 1969, 223, 537.
127. Tsuboi M., Takakashi S., Muraishi S., Kajura T., Nishimura S. Raman-spectrum of transfer RNA.—Science, 1971, 174, 1142.
128. Thomas G., Medeiros G., Hartman K. Raman-studies on nucleic acids. VI. Conformational structure of tRNA^{FMet}, tRNA^{Val} and tRNA^{Phe}.—Biochim. Biophys. Acta, 1972, 277, 71.
129. Thomas G., Hartman K.—Biochim. Biophys. Acta, 1973, 312, 311.
130. Chen M., Thomas G. Raman spectral studies of nucleic acids. XI. Conformations of yeast tRNA^{Phe} and *E. coli* ribosomal RNA in aqueous solution and in solid state.—Biopolymers, 1974, 13, 615.
131. Thomas G., Chen M., Lord R., Kotsiopoulos P., Tritton T., Mohr S.—Biochem. Biophys. Res. Commun, 1973, 54, 570.
132. Иванов В. И. Круговой дихроизм и структура комплементарных нуклеиновых кислот.—В кн.: «Молекулярная биология». М., ВИНТИ, 1973, 1, 105.
133. Полетаев А. И., Завигельский Г. Б., Мирзабеков А. Д., Баев А. А. Исследование структуры транспортной РНК и ее фрагментов методом кругового дихроизма. Конформационные изменения биополимеров в растворах. М., «Наука», 1973, 76.
134. Полетаев А. И. Влияние некоторых катионов на конформацию транспортной РНК.—Молекул. биол., 1973, 7, 84.
135. Завигельский Г. Б., Мирзабеков А. Д., Полетаев А. И., Баев А. А. Круговой дихроизм дрожжевой валиновой тРНК и ее половин.—Молекул. биол., 1972, 6, 231.
136. Полетаев А. И. Исследование комплексов нуклеиновых кислот с низкомолекулярными веществами оптическими методами. Автореф. канд. дис. 1974.
137. Willick G., Kay C. Magnesium-induced conformational change in transfer ribonucleic acid as measured by circular dichroism.—Biochemistry, 1971, 10, 2216.
138. Takasaki Y., Imahori K. Circular dichroism and fluorescence studies of tRNA^{Phe} from baker yeast.—J. Biochem., 1973, 74, 513.
139. Yang J. T., Samejima T. Optical rotatory dispersion and circular dichroism of nucleic acids.—Progr. Nucl. Acid. Res. and Mol. Biol., 1969, 9, 223.
140. Bush G., Brahm G. Conformation of nucleic acids, oligo- and polynucleotides by circular dichroism investigation. Physico-chemical properties of nucleic acids, 2. London, Acad. Press, 1973.
141. Chen M., Giege R., Lord R., Rich A. Raman spectra and structure of yeast phenylalanine transfer RNA in the crystalline state and in solution.—Biochemistry, 1975, 14, 4385.
142. Reid B., Robillard G. Demonstration and origin of six tertiary base pair resonances in the NMR spectrum of *E. coli* tRNA^{Val}.—Nature, 1975, 257, 287.
143. Daniel W. F., Cohn M. Proton nuclear magnetic resonance of spin-labeled *E. coli* tRNA^{Met}.—Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1975, 72, 2582.

**Геннадий Харлампиевич Мацука,
Анна Валентиновна Ельская,
Марина Иосифовна Коваленко,
Александр Иванович Корнелюк**

**ТРАНСПОРТНЫЕ
РИБОНУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ**

*Печатается по постановлению ученого совета
Института молекулярной биологии и генетики АН УССР*

Редактор *Н. С. Колосок*
Художественный редактор *Р. И. Калыш*
Оформление художника *Д. Д. Грибоев*
Технический редактор *А. М. Капустина*
Корректор *Д. Я. Канер*

БФ 07414. Сдано в набор 18.XI 1975 г. Подписано в печать 28.VII 1976 г. Бумага № 1, 60×90^{1/16}. Усл. печ. л. 13,75. Учетно-изд. л. 15,91. Тираж 1450. Изд. № 299. Заказ 5-869. Цена 1 руб. 75 коп.

Издательство «Наукова думка», Киев, Репина, 3.

Киевская книжная типография научной книги
Республиканского производственного объединения
«Полиграфкнига» Госкомиздата УССР, 252004, Киев-4, ул. Репина, 4.