

57
А-26



На правах рукописи

Г. П. МИРОШНИЧЕНКО

**Действие рентгеновских лучей
на функциональную активность
транспортных РНК
и аминоацил-тРНК-синтетаз азотобактера**

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель доктор биологических наук **Г. И. ЗАПЦЕВА**

ИЗДАТЕЛЬСТВО МОСКОВСКОГО УНИВЕРСИТЕТА • 1967

Работа выполнена на кафедре биохимии растений биолого-почвенного факультета Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова.

Защита состоится на заседании Ученого совета биолого-почвенного факультета МГУ.

1967 г.

Автореферат разослан

1967 г.

Ваши отзывы и замечания просьба присылать по адресу: Москва, В-234, Ленинские горы, МГУ, биолого-почвенный факультет, ученому секретарю.

Проблема действия радиации на живые организмы является одной из наиболее актуальных в современной биологии. Изменения нормальной жизнедеятельности клетки под действием излучений крайне разнообразны.

В настоящее время достаточно четко установлено, что различные виды излучений весьма значительно влияют на азотистый и фосфорный обмен как у многоклеточных, так и у одноклеточных организмов (Мейсель, 1958, 1964; Зайцева и др., 1961; Кузин, 1962; Whitfield, 1965). При этом нарушения биосинтеза белков, их обмена, а также структуры и функций нуклеиновых кислот играют большую роль в общем механизме биологического действия излучений (Блохина, 1964).

Генетический эффект радиации связан, прежде всего, с повреждениями ДНК. Поэтому вопрос о влиянии радиации на ДНК изучен в настоящее время наиболее полно (Дубинин, 1963; Villen, Hewitt, 1965; Looney, 1966). Однако в последние годы появились сообщения о том, что в механизме биологического действия излучений могут играть роль не только повреждения ДНК и нарушения передачи генетической информации. Обнаружены также радиационные нарушения процессов, происходящих на начальных этапах биосинтеза белков за счет изменения активности аминоксил-тРНК-синтетаз и «растворимых» (транспортных) РНК (тРНК) (Smit, Stocken, 1963, 1964; Fawaz-Estrup, Setlow, 1964; Harriman, Zachau, 1966).

Согласно современным представлениям, биосинтез белка начинается с активации аминокислот аминоксил-тРНК-синтетазами. Синтетазы также катализируют присоединение активированных аминокислот к соответствующим молекулам тРНК. Акцептирование аминокислот является одной из основных биологических функций тРНК. Ее адапторная функция в клетке проявляется в переносе связанной аминокислоты в рибосому и в нахождении на информационной РНК (иРНК) нужного кодона, т. е. триплета нуклеотидов, кодирующего данную аминокислоту. Изучение нарушений функциональной активности аминоксил-тРНК-синтетаз и тРНК может дать дополнительные сведения о механизме действия радиации на биосинтез белка.

296260

Наша работа является частью исследований, проводимых в лаборатории А. Н. Белозерского под руководством Г. Н. Зайцевой по изучению биохимии азотобактера, в частности по исследованию влияния рентгеновского излучения на метаболизм этой бактерии. Мы попытались изучить действие рентгеновских лучей на функциональную активность аминоксил-тРНК-синтетаз и тРНК. Помимо некоторой дополнительной информации о механизме влияния рентгеновского излучения на биосинтез белка такой подход может быть связан с изучением структуры функциональных участков тРНК и синтетаз.

Большая часть работ по исследованию действия излучений на синтез белков и особенно на нуклеиновые кислоты посвящена ультрафиолетовым лучам. Поэтому нам казалось целесообразным попытаться выяснить, оказывают ли ионизирующие излучения, в частности рентгеновские лучи, аналогичное воздействие на начальные этапы биосинтеза белка.

1. Действие рентгеновского излучения на активность аминоксил-тРНК-синтетаз

Первой частью работы явилось исследование влияния различных доз рентгеновского излучения на активность аминоксил-тРНК-синтетаз у азотобактера.

Мы использовали клетки *Azotobacter vinelandii*, собранные в ранней логарифмической стадии роста. Облучение проводилось *in vivo*, на рентгеновской установке РУМ-11 при напряжении 180 кв, силе тока 15 ма без фильтра, с мощностью дозы 2100 р/мин. Применялись дозы 5,25 и 40 кр. После облучения клетки подращивались на свежей среде в течение периода, равного времени одной генерации при нормальных условиях роста (предварительными опытами было показано, что при выделении синтетаз непосредственно из облученных клеток активность ферментов меняется незначительно). После подращивания из облученных клеток выделяли аминоксил-тРНК-синтетазы. В качестве контроля использовали синтетазы, полученные из необлученных клеток азотобактера. Выделение суммарного препарата аминоксил-тРНК-синтетаз проводили, в основном, по методу Келлера и Замечника (Keller, Zamecnik, 1956) с некоторыми изменениями. Для удаления эндогенной тРНК препарат обрабатывали стрептомицин-сульфатом с последующей очисткой на колонке с Сефадексом G-25. Количество белка определяли по Лоури (Lowry et al., 1951).

тРНК получали из необлученных клеток во всех случаях согласно методу Хогланда (Hoagland et al., 1958) с модификациями. Для удаления эндогенных аминокислот и других примесей использовали фильтрацию через Сефадекс G-25 или хроматографию на колонках с ДЭАЭ — целлюлозой. Количество тРНК опре-

деляли спектрофотометрически (24 единицы оптической плотности при 260 мμ соответствуют 1 мг РНК).

О нарушениях функциональной активности аминоксил-тРНК-синтетаз после облучения судили по изменению активации аминокислот и образования комплексов аминоксил-тРНК.

Определение активирующей способности синтетаз по обмену P^{32} пирофосфата с АТФ в присутствии аминокислот проводили согласно методике Бергмана (Bergmann et al., 1961) и др. с некоторыми модификациями¹. Процент обмена P^{32} пирофосфата с АТФ рассчитывали согласно Хогланду и др. (Hoagland et al., 1958). Радиоактивность фосфора измеряли на счетчике СИ-25.

Активность синтетаз при образовании аминоксил-тРНК определяли по Бергу и др. (Berg et al., 1956). В каждую пробу брали 150, 300 или 450 мкг тРНК и 0,5—1 мг белка фермента. Радиоактивность проб просчитывали на торцовом счетчике БФЛ-25. Результаты выражали в виде удельной активности (цмп/мин/мг тРНК).

В табл. 1 и на рис. 1 представлены данные по изменению активности ферментов в реакции активирования аминокислот у азо-

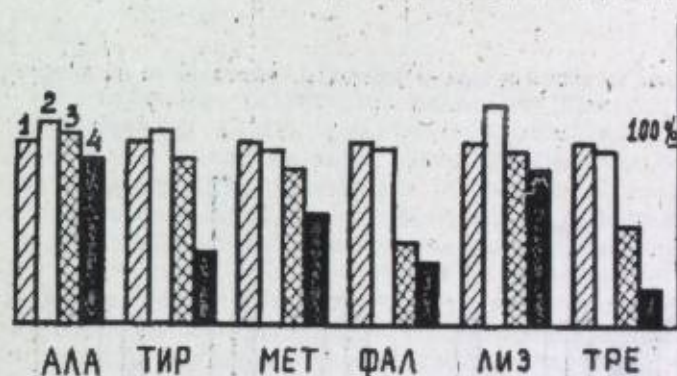


Рис. 1. Сохранение активирующей способности аминоксил-тРНК-синтетаз по отношению к аминокислотам после облучения клеток *Azotobacter vinelandii* рентгеновскими лучами: 1 — контроль; 2 — 5 кр; 3 — 25 кр; 4 — 40 кр.

тобактера, облученного рентгеновскими лучами. Как видно из таблицы и рисунка, при облучении разными дозами активность ферментов, специфичных для аланина и лизина, почти не меняется. Активность аминоксил-тРНК-синтетаз в реакциях активации метионина и тирозина остается примерно на одном уровне с нормой при облучении клеток дозой 25 кр, но заметно снижается при 40 кр. Доза 40 кр. резко инактивирует большинство аминоксил-тРНК-синтетаз. Действие низкой дозы (5 кр) обычно не влияет

¹ В выполнении этой части работы участвовал стажер из ГДР Д. Бирбаум.

ВНИИ РАДИОБИОФИЗИКИ
АН ССРСР
117 700000 Москва

Таблица 1

Изменение активности аминоксил-тРНК-синтетаз при облучении в реакции образования аминоксил-аденилатов (процент обмена P^{32} пирофосфата с Р АТФ в присутствии аминоксилот)

Активируемая аминокислота	Контроль ¹	Доза облучения		
		5 кр	25 кр	40 кр
Аланин	3,85	4,25	4,04	3,50
Тирозин	2,55	2,68	2,31	1,48
Метионин	4,48	4,23	3,80	2,30
Фенилаланин	0,64	0,59	0,30	0,21
Лизин	8,75	10,17	8,43	8,20
Треонин	7,10	6,70	4,01	1,31

¹ Контроль во всех случаях — ферменты, выделенные из необлученных клеток.

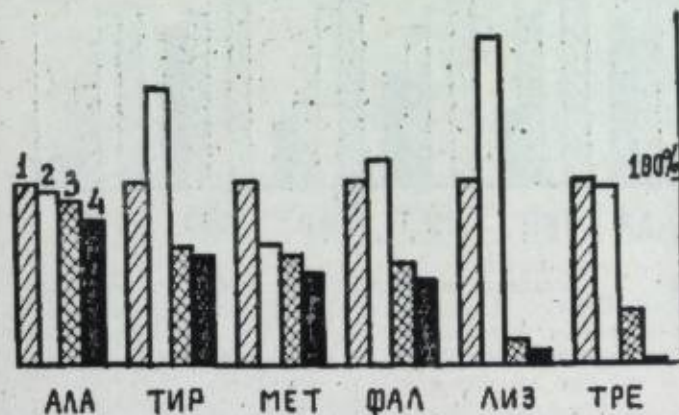


Рис. 2. Сохранение активности аминоксил-тРНК-синтетаз в реакции образования аминоксил-тРНК после облучения клеток *Azotobacter vinelandii* рентгеновскими лучами (обозначения см. на рис. 1)

на образование аминоксил-аденилатов, а иногда даже несколько активирует этот процесс (например, для лизина).

В табл. 2 и на рис. 2 представлены данные по действию рентгеновских лучей на ферментативное образование аминоксил-

Таблица 2

Изменение активности аминоксил-тРНК-синтетаз в реакции образования аминоксил-тРНК под действием рентгеновских лучей на клетки *Azotobacter vinelandii* (и.мл/мин/мг тРНК)

Активируемая аминокислота	Контроль ¹	Дозы облучения		
		5 кр	25 кр	40 кр
Аланин	246	228	218	194
Тирозин	1740	2614	1085	1022
Метионин	265	176	158	133
Фенилаланин	1196	1280	658	562
Лизин	1388	2443	224	131
Треонин	1572	1476	491	0

¹ См. таб. 1.

тРНК. Из полученных результатов видно, что при действии рентгеновских лучей на клетки азотобактера отдельные аминоксил-тРНК-синтетазы в этой реакции также поражаются по-разному. Аланил-тРНК-синтетаза устойчива к облучению. Тирозил-, метионил- и фенилаланил-тРНК-синтетазы относятся к ферментам средней устойчивости. Весьма радиочувствительными являются лизил- и особенно треонил-тРНК-синтетазы. При этом разные дозы оказывают на ферменты, катализирующие присоединение отдельных аминоксилот к соответствующим тРНК, неодинаковое воздействие. Так, активность ферментов при образовании аланил-, треонил- и фенилаланил-тРНК при облучении низкой дозой (5 кр) не меняется, а при образовании метионил-тРНК снижается в 1,5 раза по сравнению с нормой. Интересно, что при облучении дозой 5 кр активность лизил- и тирозил-тРНК-синтетаз в реакции присоединения соответствующей аминокислоты к тРНК увеличивается. Доза 25 кр заметно снижает активность большинства аминоксил-тРНК-синтетаз, уменьшая образование тирозил- и фенилаланил-тРНК почти в 2 раза, треонил-тРНК — в 3, а лизил-тРНК — в 6 раз по сравнению с нормой. Максимальное действие на образование аминоксил-тРНК оказывает доза 40 кр, после облучения которой активность некоторых ферментов, например треонил-тРНК-синтетазы, полностью исчезает.

При сравнении данных табл. 1 и рис. 1 с табл. 2 и рис. 2 видно, что характер действия рентгеновских лучей на две функции синтетаз, а именно на активацию аминоксилот и на образование

аминоацил-тРНК, в ряде случаев совпадает. Так, под действием дозы 40 кр ферментативное образование как аминоацил-аденилата, так и аминоацил-тРНК для аланина почти не нарушается, а для тирозина и фенилаланина снижается в несколько раз по сравнению с нормой. Напротив, для лизил- и метионил-тРНК-синтетаз активирующая способность мало меняется при облучении, тогда как в реакции образования аминоацил-тРНК данные ферменты оказались весьма радиочувствительными. Исходя из этого, можно предположить, что подобные различия связаны с функционированием в обеих реакциях различных участков молекул фермента, по-разному чувствительных к радиации. О правоте такого предположения свидетельствует неодинаковая специфичность к аминокислоте у двух изучаемых функций аминоацил-тРНК-синтетаз (Norris, Berg, 1964; Loftfield, Eigner, 1965), а также отмечавшиеся в литературе различия в чувствительности этих двух функций к внешним воздействиям (Arca et al., 1964; Stern et al., 1966; Peterkofsky et al., 1966).

Результаты, полученные нами при изучении действия рентгеновских лучей на активность аминоацил-тРНК-синтетаз у азотобактера, совпадают с имеющимися в литературе указаниями относительно радиационной инактивации этих ферментов, выделенных из тканей млекопитающих (Logan, 1959; Logan et al., 1959; Smit, Stocken, 1963).

Очевидно, имеется определенное сходство в действии рентгеновских лучей на аминоацил-тРНК-синтетазы у бактерий и млекопитающих.

При объяснении причин обнаруженных нами нарушений активности аминоацил-тРНК-синтетаз необходимо указать следующее.

Поскольку изменения функциональной активности синтетаз наиболее заметно проявляются при подраживании облученных клеток, представляется вероятным, что эти изменения связаны, прежде всего, с повреждениями генетического аппарата клетки в результате воздействия рентгеновских лучей на ДНК. Полученные нами экспериментальные данные, по-видимому, согласуются с гипотезой о радиационном декодировании ДНК (Савич, Шальнов, 1965). Согласно этой гипотезе, радиационно-химические изменения ДНК могут вести к синтезу измененных белков. Не исключена возможность того, что обнаруженные нами нарушения функциональной активности аминоацил-тРНК-синтетаз под влиянием рентгеновских лучей в некоторой степени связаны именно с такими вторичными изменениями ферментных белков в новых генерациях, полученных из облученных клеток.

Следует отметить, что после подраживании облученных клеток получается смешанная популяция, в состав которой могут входить не только клетки новой генерации, но и облученные клетки, оставшиеся живыми, но потерявшие в результате облучения способность к делению. Поэтому не все изменения активности

синтетаз в получаемой после подраживании бактериальной массе объяснимы радиационными повреждениями генетического аппарата клетки. Очевидно, часть этих нарушений может быть обусловлена первичными изменениями ферментов в облученных клетках, попадающих в смешанную популяцию. В этом случае инактивацию аминоацил-тРНК-синтетаз можно, по-видимому, связать с окислением под действием рентгеновских лучей SH-групп, входящих в состав активных центров некоторых аминоацил-тРНК-синтетаз. Окисление SH-групп способно привести к нарушению нормальной конформации молекул аминоацил-тРНК-синтетаз, а следовательно, к изменению их активности. Следует отметить, однако, что изменения синтетаз за счет повреждения генетического аппарата клетки при облучении играют, очевидно, основную роль.

Что касается обнаруженной нами активации лизил- и тирозил-тРНК-синтетаз при облучении дозой 5 кр, то на основании имеющихся данных трудно сделать однозначный вывод о возможном механизме этого явления. Однако сам по себе этот факт представляет определенный интерес. Не исключено, что некоторая стимуляция белкового синтеза под действием слабых доз излучения, отмечавшаяся в литературе, может быть связана с такого рода активацией синтетаз (Ильина, Петров, 1959, 1960).

Таким образом, полученные нами экспериментальные данные свидетельствуют о нарушении функциональной активности аминоацил-тРНК-синтетаз при облучении. Известно, что скорость синтеза белка в клетке и активность аминоацил-тРНК-синтетаз взаимосвязаны. Поэтому на основании полученных данных можно предположить, что обнаруженные нами изменения аминоацил-тРНК-синтетаз под действием рентгеновских лучей могут влиять на скорость дальнейших реакций биосинтеза белков.

2. Действие рентгеновского излучения на акцепторную функцию тРНК

В связи с общепринятыми представлениями о роли тРНК в биосинтезе белков нам казалось целесообразным попытаться изучить влияние рентгеновских лучей на активность тРНК, прежде всего на ее акцепторную функцию.

О нарушении функциональной активности тРНК судили по изменению образования комплексов аминоацил-тРНК. Препараты тРНК, выделенные из нормальных клеток азотобактера, облучали дозой 25 кр. Концентрация тРНК при облучении была около 1 мг/мл. Затем способность облученных препаратов акцептировать различные аминокислоты сравнивали с контрольной (необлученной) тРНК.

В табл. 3 приведены результаты, полученные при исследовании влияния рентгеновских лучей на способность тРНК азотобактера акцептировать различные аминокислоты. Из табл. видно, что некоторые тРНК подвергаются радиационно-химическому пораже-

Таблица 3

Влияние рентгеновского излучения на акцепторную активность тРНК

Аминокислота, акцептируемая тРНК	Удельная активность (имп/мин/мг тРНК)		Сохранение ак- цепторн. актив- ности тРНК (% от контроля)
	контроль ¹	25 кр	
Изолейцил	3643	1187	32
Аргинил	1997 1316 ²	798 1028 ²	40 78
Треонил	7614 6019 ²	3280 3430 ²	43 57
Лизил	1399	708	51
Глютаминовая к-та	5840	3690	63
Гистидил	3047	2090	68
Пролил	5366	3804	70
Тирозил	2656	2183	82
Валил	1390	1150	85
Триптофан	14 216	12 300	87
Фенилаланил	896	805	89
Метионил	2350	2266	90
Лейцил	1921	1885	97

¹ Необлученная тРНК.² тРНК, выделенная из предварительно облученных клеток (в остальных случаях облучение тРНК проводили *in vitro*).

нию. Вследствие этого способность к акцептированию аминокислот у облученной тРНК, по сравнению с нормальной, снижается. При этом облученные тРНК, специфичные к отдельным аминокислотам, ведут себя по-разному.

тРНК, специфичные к изолейцину, аргинину, треонину, лизину, глютаминовой кислоте, особенно чувствительны к радиации. Это выражается в значительном снижении их акцепторной активности при облучении. Способность гистидин- и пролин-специфичных тРНК акцептировать соответствующие аминокислоты также за-

метно снижается, хотя и в меньшей степени. тРНК, акцептирующие тирозин, валин, триптофан, фенилаланин, метионин и лейцил, очень незначительно меняют свою акцепторную активность при облучении дозой 25 кр. Это указывает на относительную радиоустойчивость данных тРНК.

Следует отметить некоторые различия в изменении акцептирующей способности треонин- и аргинин-специфичных тРНК при облучении дозой 25 кр. *in vitro* и при выделении данных тРНК из предварительно облученных клеток азотобактера. Как видно из табл. 3, акцепторная активность этих тРНК при облучении *in vitro* снижается сильнее, чем при выделении тРНК из облученных той же дозой клеток. Это может указывать на существование в клетке определенных радиозащитных механизмов.

В литературе имеются указания на уменьшение акцепторной активности тРНК при облучении ультрафиолетом (Fukutome et al., 1964; Fawaz-Estrup, Sellow, 1964a; Swerfson, Nishimura, 1964; Gottschling, Zachau, 1965), а также электронами с высокой энергией (Fawaz-Estrup, Sellow, 1964b). Таким образом, наши и литературные данные свидетельствуют о нарушении акцепторной функции тРНК под влиянием излучений в разной степени для отдельных тРНК.

На основании результатов, полученных в этой части работы, было сделано предположение о том, что изменение акцепторной активности некоторых тРНК после облучения может быть связано с гетерогенностью тРНК, а именно с различиями в радиочувствительности отдельных изоакцепторных тРНК. Для проверки этого предположения мы попытались исследовать влияние рентгеновских лучей на разные типы лизиновых, изолейциновых, глютаминовых и треониновых тРНК. Были выбраны те типы тРНК, для которых найдено уменьшение акцепторной активности при облучении (см. табл. 3).

О радиочувствительности отдельных изоакцепторных тРНК судили по изменению профилей элюции соответствующих C^{14} -аминоацил-тРНК, при фракционировании на колонках с метилированным альбумином (колонки МАК). Комплексы получали с нормальной тРНК и с тРНК, облученной дозой 25 кр. Использовали несколько измененную методику, предложенную Sueoka и Ямане (Sueoka, Yamane, 1962). Для фракционирования на колонках МАК в качестве носителя применяли кремневую кислоту. Элюцию проводили при линейном градиенте концентрации NaCl от 0,2 до 1,0 М в 0,02 М Na-ацетатном буфере (рН 5,2). После определения оптической плотности отдельных фракций и осаждения C^{14} -аминоацил-тРНК их радиоактивность просчитывали в жидком сцинтиллаторе на счетчике марки «Карботриметр» (СТМ-2).

На рис. 3—6 представлены результаты фракционирования C^{14} -лизил-, C^{14} -изолейцил-, C^{14} -глютамил- и C^{14} -треонил-тРНК на колонках МАК. Для всех 4 случаев было найдено изменение некоторых изоакцепторных форм тРНК под действием рентгеновско-

го излучения. Так, на рис. 3, А видно, что азотобактер в норме содержит две лизин-специфичных тРНК. После облучения дозой 25 кр преимущественно сохраняется один пик радиоактивности, тогда как второй заметно снижается (рис. 3, Б). Изолейцин-специфическая тРНК содержит в норме 3 компонента (рис. 4). Относительные величины II и III пиков меняются под действием рентгеновского излучения.

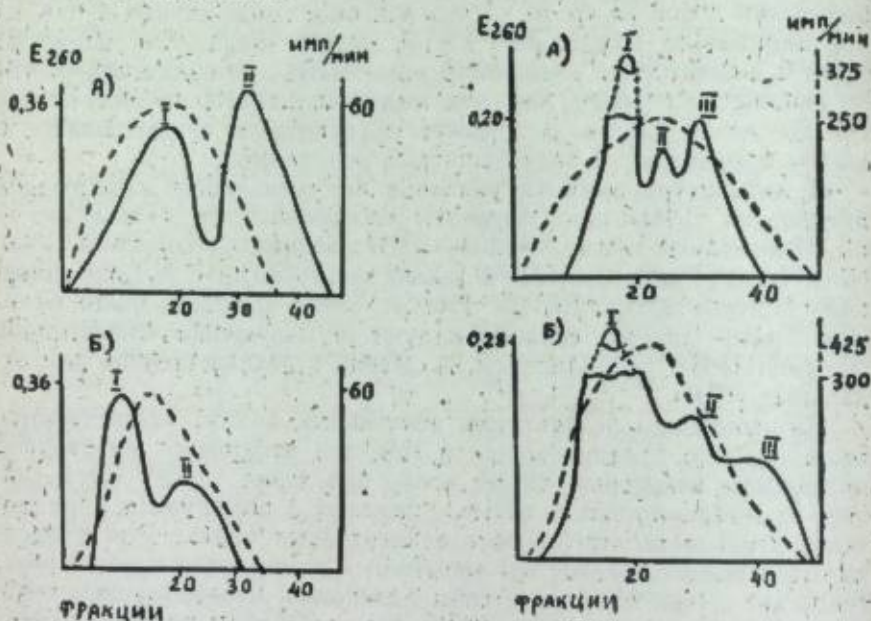


Рис. 3. Хроматографическое разделение C^{14} -лизил-тРНК на колонке МАК: А — контроль (необлученная тРНК); Б — тРНК, облученная дозой 25 кр; — — — оптическая плотность при 260 мμ; — радиоактивность

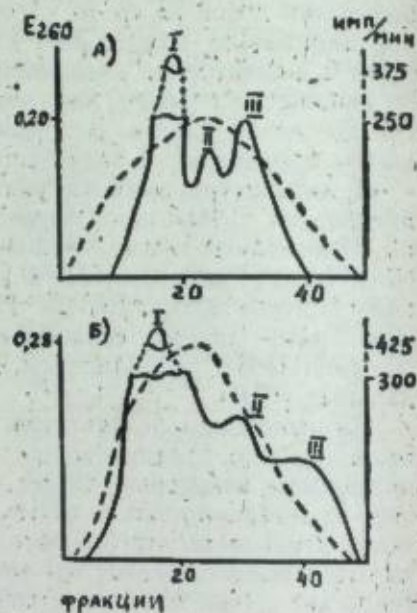


Рис. 4. Хроматографическое разделение C^{14} -изолейцил-тРНК на колонке МАК (обозначения см. на рис. 3)

облучения РНК может свидетельствовать об изменении под действием радиации хроматографических свойств отдельных изоакцепторных тРНК. За счет этого изменения та или иная изоакцепторная тРНК может после облучения не обнаружиться в виде отдельного пика при хроматографии на колонках МАК.

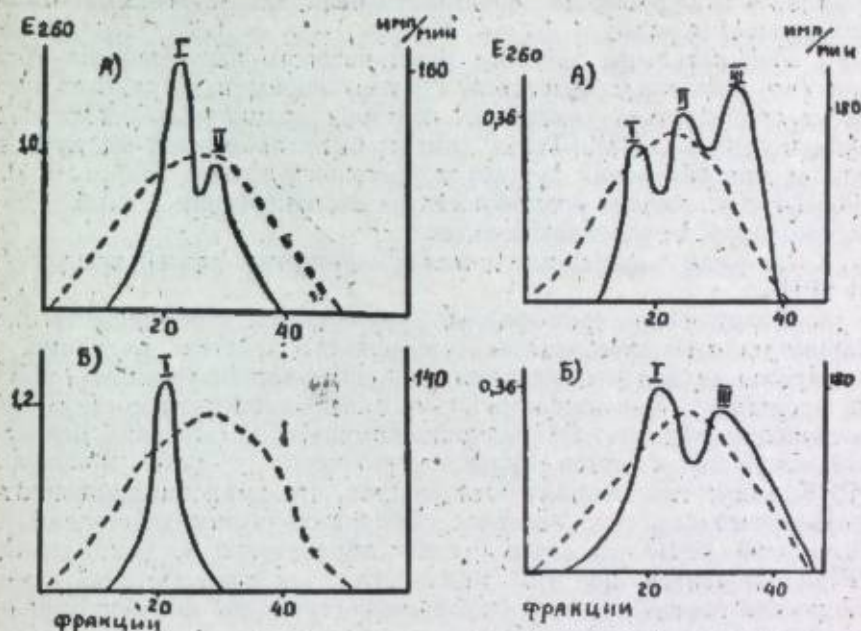


Рис. 5. Хроматографическое разделение C^{14} -глутамил-тРНК на колонке МАК (обозначения см. на рис. 3)

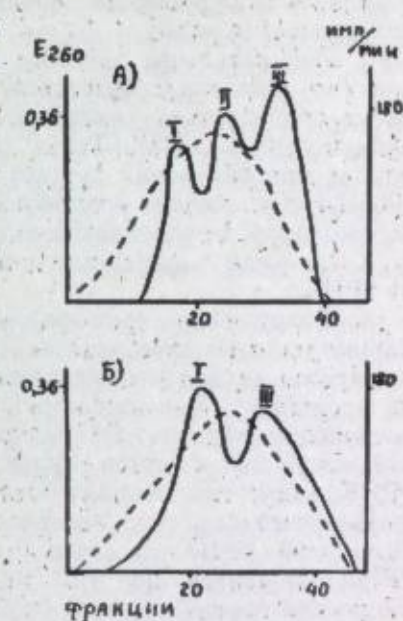


Рис. 6. Хроматографическое разделение C^{14} -треонил-тРНК на колонке МАК (обозначения см. на рис. 3)

В случае тРНК, специфичной к глутаминовой кислоте, в норме имеется две изоакцепторных формы тРНК. После облучения дозой 25 кр остается только один пик радиоактивности (рис. 5).

Для треонин-специфичной тРНК в норме найдены 3 изоакцепторных компонента (рис. 6). После облучения один из пиков радиоактивности не обнаруживается. Таким образом, отдельные изоакцепторные тРНК оказались по-разному чувствительными к облучению дозой 25 кр.

Различия в радиочувствительности могут выражаться в сохранении акцепторной способности у одних изоакцепторных форм тРНК при уменьшении ее у других. С другой стороны, изменение профилей элюции при хроматографии на колонках МАК после

Данных по влиянию излучений на отдельные изоакцепторные тРНК в литературе не найдено. В работе Фукутоме с сотр. (Fukutome et al., 1964) из анализа кривой инактивации глициновой тРНК ультрафиолетом делается вывод о том, что глициновая тРНК является смесью двух по-разному чувствительных к УФ форм тРНК. Аналогичное предположение высказано для лизин-специфичной тРНК также на основе анализа кривой ультрафиолетовой инактивации ее акцепторной функции (Gottshling, Zachau, 1965). Это является косвенным указанием на различия в радиочувствительности отдельных изоакцепторных тРНК и совпадает с представленными нами результатами, полученными при помощи колонок с метилированным альбумином.

Таким образом, наши экспериментальные данные, а также имеющиеся в литературе косвенные указания позволяют сделать вывод о различиях в чувствительности отдельных изоакцепторных тРНК к излучениям.

В основе радиационно-химических изменений структуры молекулы тРНК, сопровождающихся нарушением ее функциональной активности, может лежать ряд факторов:

1. Возможное преимущественное изменение радиочувствительных пиримидиновых оснований в молекуле тРНК за счет их гидратации и блокирования свободными радикалами, возникающими при радиоллизе воды.

2. Избирательное действие рентгеновского излучения на урацил (по аналогии с действием УФ-излучения), в результате чего могут образоваться димеры из соседних урацильных остатков в цепи молекулы тРНК. Такие димеры были найдены в модельных опытах при облучении растворов урацила γ -лучами (Nofre et al., 1965). Не исключена возможность их возникновения и в облученных молекулах нуклеиновых кислот.

3. Разрывы водородных и межнуклеотидных связей в молекуле тРНК.

4. Разрушение хромофорных группировок преимущественно пиримидиновых оснований за счет прямого действия радиации.

Исходя из полученных нами экспериментальных данных, можно представить причины нарушения акцепторной активности тРНК следующим образом. Радиационно-химические изменения оснований, входящих в состав фермент-узнающего участка молекулы тРНК, могут так изменить этот участок, что аминоксил-аденилат-ферментный комплекс потеряет способность взаимодействовать с молекулой тРНК. В связи с этим образование C^{14} -аминоацил-тРНК нарушится. При этом может оказаться существенным изменение как первичной, так и вторичной структуры фермент-узнающего участка молекулы тРНК.

Отличия в радиочувствительности акцепторной функции у тРНК, специфичных к тем или иным аминокислотам, а также у отдельных изоакцепторных тРНК, могут быть связаны с различиями в их первичной и вторичной структуре. В частности, возможно, что эти различия обусловлены неодинаковым распределением радиочувствительных пиримидиновых оснований в фермент-узнающих участках молекул соответствующих тРНК. Сходными причинами могут быть вызваны неодинаковые изменения хромографических свойств отдельных изоакцепторных тРНК после облучения при фракционировании на колонках с метилированным альбумином.

3. Действие рентгеновского излучения на адапторную функцию тРНК

В связи с обнаруженным в предыдущей части работы изменением акцепторной способности тРНК при облучении рентгеновскими лучами встает вопрос о том, оказывает ли рентгеновское излучение аналогичное воздействие и на адапторную функцию тРНК.

Изменения адапторной функции тРНК исследовались на бесклеточных системах включения меченых аминокислот в рибосомы при участии нормальной и облученной дозой 25 кр тРНК, с использованием синтетических полинуклеотидных матриц. Были выбраны C^{14} -лизин и C^{14} -фенилаланин, перенос которых в рибосомы стимулируется соответственно матрицами поли-А и поли-У. Выбор аминокислот был связан с избирательностью действия излучений на пиримидиновые основания. Известно, что кодоны для фенилаланина содержат только пиримидиновые остатки, а для лизина — только пуриновые. Поэтому предполагаемые антикодоны у соответствующих тРНК должны быть противоположны по содержанию пуриновых и пиримидиновых оснований. Поскольку антикодон участвует в выполнении тРНК ее адапторной функции, можно было ожидать, что адапторные функции у лизиновой и у фенилаланиновой тРНК по-разному поражаются рентгеновскими лучами.

В работе использовали бесклеточную систему включения C^{14} -аминокислот в рибосомы, описанную Ниренбергом (Nirenberg, Matthaei, 1961) с некоторыми изменениями. Рибосомы выделяли из разрушенных лизоцимом клеток азотобактера и несколько раз промывали буфером (Gillchriest, Bock, 1958; Зайцева, Антонова, 1966). Трансферазы («фактор переноса») получали из супернатанта $105\,000\times g$ по методу Алленде (Allende et al., 1964) (в ряде случаев в качестве источника трансфераз использовали неочищенный супернатант $105\,000\times g$). Непосредственно перед опытом рибосомы и трансферазы преинкубировали для удаления эндогенных матриц (Nirenberg, Matthaei, 1961). После инкубации и осаждения C^{14} -полилизина и C^{14} -полифенилаланина осадки отмывались от непрореагировавших C^{14} -аминокислот на миллипоровых фильтрах RUF5 или AUF5. Затем радиоактивность проб просчитывалась на счетчике БФЛ-25 или на сцинтилляционном счетчике марки «Карботриметр».

В табл. 4 приводятся данные по влиянию облучения тРНК на ее способность к переносу C^{14} -лизина и C^{14} -фенилаланина в соответствующие полипептиды, синтезируемые в рибосомах. Из табл. видно, что полинуклеотидная матрица поли-А по-разному стимулирует перенос C^{14} -лизил-тРНК в рибосомы для нормальной и облученной тРНК. В случае облученной тРНК перенос C^{14} -лизил-тРНК в рибосомы сильно ингибируется. Это свидетельствует о значительной радиочувствительности изучаемой функции у тРНК, специфичной к лизину. Что касается фенилаланин-специфичной тРНК, то, как видно из табл. 4, облучение дозой 25 кр практически не влияет на стимулируемый поли-У перенос C^{14} -фенилаланил-тРНК в рибосомы.

При облучении тРНК до ее ацилирования C^{14} -аминокислотой могут повреждаться одновременно как фермент-узнающий участок молекулы тРНК, так и участок, необходимый для взаимодействия молекулы тРНК с рибосомой. Поэтому изменение переноса C^{14} -

Таблица 4

Перенос в рибосомы C^{14} -лизил-тРНК и C^{14} -фенилаланил-тРНК с участием нормальной и облученной тРНК

Аминокислота	№ опыта		Имп/мин		Стимуляция ²
			без матрицы	с матрицей	
C^{14} -лизин	1	Контроль ¹	627	1257	1,9
		25 кр	670	700	0
	2	Контроль	282	541	1,9
		25 кр	300	371	0
	3	Контроль	353	1284	3,6
		25 кр	387	437	0
C^{14} -фенилаланин	1	Контроль	316	1152	3,6
		25 кр	307	1088	3,5
		Контроль	289	543	1,9
		25 кр	294	517	1,7

¹ Контроль во всех случаях — необлученная тРНК.

² Стимуляция в n раз по сравнению с системой без матрицы.

Реакционная смесь в общем объеме 1 мл содержала (в мкМ): трис-буфера pH 7,5 — 100; Mg (CH₃COO)₂ — 8 — 12; NH₄Cl — 25; KCl — 25; фосфоэнолпирувата (K — соль) — 5; фосфоэнолпируват-киназа — 20 мкг; K-АТФ — 3; меркаптоэтанол — 6; Na-ГТФ — 0,3; Na-ЦТФ — 0,2; смеси C^{14} -аминокислот (кроме лизина или фенилаланина) — по 0,05 каждой; ФП — 150 мкг; рибосом — 3 мг белка; матрицы (поли-А или поли-У) — 20 мкг; тРНК — 500 мкг; препарата аминоацил-тРНК-синтетаз — 1 — 3 мг белка; C^{14} -аминокислоты — 1500 000 имп/мин.

аминокислот в рибосомы при участии облученной тРНК может быть результатом суммарного воздействия излучения на оба этих функциональных участка молекулы тРНК. Как было показано в предыдущей части работы (см. табл. 3), акцептирование фенилаланина практически не меняется после облучения тРНК. С другой стороны, как видно из табл. 4, суммарное воздействие облучения одновременно на «акцепторный» и «адапторный» участки фенилаланин-специфичной тРНК не влияет на синтез C^{14} -полифенилаланина в рибосомах. Поэтому представляется возможным вывод об относительной радиоустойчивости и того участка молекулы фенилаланин-специфичной тРНК, который ответственен за ее

взаимодействие с рибосомой. Если принять во внимание большую радиоустойчивость пиримидиновых оснований по сравнению с пуриновыми, то обнаруженная радиоустойчивость фенилаланин-специфичной тРНК коррелирует с составом приписываемого ей антикодона 2'-ОМеГ-АА, содержащего только пуриновые остатки (RajBhanjary et al., 1967).

Что касается лизиновой тРНК, то можно предположить, что при ее облучении обнаруженное нами уменьшение включения C^{14} -лизина в полипептиды, синтезируемые в рибосомах, может быть вызвано двумя причинами. С одной стороны, уменьшается акцептирование C^{14} -аминокислоты (как видно из табл. 3, акцепторная способность облученной тРНК по отношению к лизину снижается на 50%). Кроме того, одновременно может повреждаться участок молекулы тРНК, ответственный за ее взаимодействие с рибосомой. Для проверки этого предположения были проведены опыты по переносу в рибосомы C^{14} -лизил-тРНК с использованием тРНК, ацилированной C^{14} -аминокислотой перед облучением. В этих опытах предварительно получали C^{14} -аминоацил-тРНК с нормальной тРНК. Затем полученный комплекс облучали дозой 25 кр. Можно было предполагать, что излучение действует только на участок молекулы тРНК, ответственный за ее взаимодействие с рибосомой. В таком случае все нарушение адапторной функции тРНК будет связано с повреждением именно этого функционального участка молекулы тРНК. Однако предварительно необходимо было убедиться в том, что комплекс C^{14} -лизил-тРНК не распадается при его облучении рентгеновскими лучами. О сохранности комплекса после облучения судили по удельной активности фракции C^{14} -лизил-тРНК, получаемой при фильтровании облученных и контрольных комплексов через колонку с Сефадексом G-50 (Фролова, Киселев, 1963). Как видно из рис. 7, облучение существенно не влияет на стабильность комплекса C^{14} -лизил-тРНК.

Следовательно, распад C^{14} -лизил-тРНК, очевидно, не может быть причиной снижения переноса C^{14} -лизина в рибосомы после облучения комплекса.

Убедившись в этом, мы поставили опыты по переносу нормального и облученного C^{14} -лизил-тРНК в рибосомы. Результаты этих опытов отражены в табл. 5. Из табл. видно, что при использовании тРНК, ацилированной C^{14} -лизинном перед облучением, стимуляция переноса C^{14} -лизил-тРНК в рибосомы под действием поли-А заметно снижается по сравнению с контрольной, необлученной тРНК. В этих опытах фермент-узнающий участок молекулы тРНК проявил свою функциональную активность до облучения. Распад комплекса за счет отщепления C^{14} -лизина под воздействием радиации, как это следует из предварительных опытов (рис. 7), исключается. Поэтому можно предположить, что нарушение адапторной функции тРНК в данном случае происходит исключительно за счет повреждения участка молекулы тРНК,

Таблица 5

Перенос в рибосомы C^{14} -лизил-тРНК с участием нормальной тРНК и облученной тРНК, нагруженной аминокислотой перед облучением

№ опыта		Дцл/мин		Стимуляция
		без матрицы	с матрицей	
1	Контроль	114	652	5,3 ¹
	25 кр	89	124	1,4
2	Контроль	168	1040	5,6
	25 кр	186	270	1,5

¹ Стимуляция в п раз по сравнению с системой без матрицы.

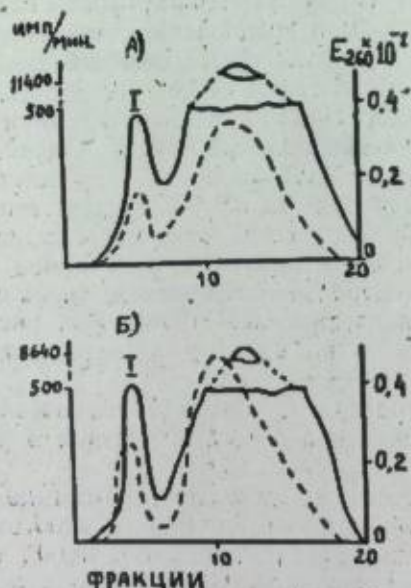


Рис. 7. Элюция нормальных и облученных C^{14} -лизил-тРНК с Сефадекса G-50: — — — $E_{260} \times 10^{-7}$; — радиоактивность
I — фракция C^{14} -лизил-тРНК: А — контроль (необлученный комплекс). Удельная активность 3310 имп/мин/мг тРНК; Б — комплекс, облученный дозой 25 кр. Удельная активность 3260 имп/мин/мг тРНК

ответственного за взаимодействие с рибосомой. Обнаруженная нами чувствительность лизин-специфичной тРНК к ретигоновским лучам коррелирует с составом приписываемого ей антикодона УУУ, представленного радиочувствительными пиримидиновыми основаниями.

Полученные нами результаты, касающиеся нарушения адапторной функции лизин-специфичной тРНК и относительной радиостойчивости тРНК, специфичной к фенилаланину, совпадают с имеющимися в литературе немногочисленными данными для УФ излучения (Fukutome et al., 1964; Kawade et al., 1965; Gottschling, Zachau, 1965; Harriman, Zachau, 1966). Инактивирующее воздействие УФ на тРНК связывают с модификацией пиримидиновых оснований, в частности с образованием димеров из соседних в молекуле тРНК остатков урацила. Не исключена возможность, что при действии рентгеновских лучей существует в какой-то степени сходный механизм. Об этом может свидетельствовать обнаруженная нами корреляция между радиочувствительностью адапторной функции тРНК и содержанием пиримидиновых оснований в соответствующих антикодонах, участвующих в выполнении этой функции.

Кроме того, в антикодоне лизин-специфичной тРНК имеются соседствующие урацильные остатки, что увеличивает вероятность образования димеров урацила при облучении. Таким образом, исходя из полученных результатов, можно высказать предположение о некотором сходстве в молекулярных механизмах действия рентгеновского и ультрафиолетового излучения на тРНК.

На основании наших экспериментальных данных кажется возможным среди перечисленных на стр. 12 гипотетических механизмов радиационно-химического повреждения молекулы тРНК отдать предпочтение преимущественному воздействию рентгеновских лучей на пиримидиновые основания, в частности на урацил. Однако надо учитывать значительную сложность и многообразие действия ионизирующей радиации. Поэтому следует подчеркнуть, что не исключена вероятность существования и других механизмов воздействия рентгеновского излучения.

При нарушении адапторной функции тРНК радиация способна влиять не только на антикодон, но и на другие звенья молекулы тРНК, участвующие в ее взаимодействии с рибосомой.

Необходимо отметить, что действие рентгеновского излучения относительно малоспецифично. Поэтому нельзя объяснить нарушения функциональной активности тРНК только изменениями пиримидиновых оснований. Здесь, по-видимому, проявляется сложный комплекс воздействий, приводящих к нарушению первичной и вторичной структуры тРНК, что выражается в изменении ее функциональной активности.

Таким образом, полученные нами экспериментальные данные, наряду с имеющимися в литературе указаниями, свидетельствуют о нарушениях функциональной активности аминоацил-тРНК-син-

тетаз и тРНК под действием радиации. Эти нарушения могут влиять на биосинтез белков и, следовательно, играть определенную роль в общем механизме биологического действия излучений.

Выводы

1. Разные дозы рентгеновского излучения влияют на активность некоторых аминоксил-тРНК-синтетаз, снижая образование аминоксил-тРНК для лизина, треонина, тирозина, метионина и фенилаланина. Аланил-тРНК-синтетаза устойчива к облучению. Слабые дозы вызывают некоторую активацию лизил- и тирозил-тРНК-синтетаз.

2. Акцепторная активность тРНК после облучения *in vitro* дозой 25 кр заметно снижается для изолейцина, аргинина, треонина, лизина, глутаминовой кислоты, гистидина и пролина. Для тирозина, валина, триптофана, фенилаланина, метионина, лейцина акцепторная активность соответствующих тРНК устойчива к облучению.

3. При облучении *in vivo* обнаружена более высокая радиостойчивость для треониновой и аргининовой тРНК, чем при их облучении той же дозой *in vitro*. Это свидетельствует о наличии в клетке некоторых радиозащитных механизмов.

4. Разные формы изоакцепторных тРНК, специфичных к лизину, изолейцину, глутаминовой кислоте и треонину, имеют неодинаковую радиочувствительность, что выражается в изменении профилей элюции этих тРНК при хроматографии на колонках с метилированным альбумином.

5. Адапторная функция лизиновой тРНК азотобактера при облучении дозой 25 кр повреждается сильнее, чем та же функция у фенилаланиновой тРНК.

6. Радиочувствительность адапторной функции у лизиновой и фенилаланиновой тРНК коррелирует с содержанием пиримидиновых оснований в соответствующих антикодонах, составляющих часть функционального участка молекулы тРНК, ответственного за ее взаимодействие с рибосомой.

7. Нарушения функциональной активности тРНК под действием рентгеновского излучения близки к нарушениям под действием ультрафиолетового излучения. Поэтому возможно определенное сходство в молекулярных механизмах действия рентгеновского и ультрафиолетового излучений.

ОСНОВНЫЕ МАТЕРИАЛЫ ДИССЕРТАЦИИ ОПУБЛИКОВАНЫ В СЛЕДУЮЩИХ СТАТЬЯХ:

1. Мирошниченко Г. П., Зайцева Г. Н., Бирibaум Д., Белозерский А. И. Действие рентгеновских лучей на активность аминоксил-с-РНК-синтетаз (pH-5-ферментов) азотобактера. «Докл. АН СССР», 164, 1421, 1965.
2. Мирошниченко Г. П., Зайцева Г. Н., Мацука Г. Х., Ахмедов Г. И. Действие рентгеновского излучения на акцепторную активность «растворимых» РНК азотобактера. «Биохимия», 32, 150, 1967.
3. Мирошниченко Г. П., Зайцева Г. Н. Влияние рентгеновского излучения на адапторную функцию «растворимых» РНК азотобактера. «Докл. АН СССР», 176, № 2, 1967.

Сдано в набор 4/VIII 1967 г.
Л-42130.

Печ. л. 1,25.

Подписано к печати 4/IX 1967 г.
Зака. 275. Тираж 200 экз.

Издательство Московского университета, Москва, Ленинские горы
Административный корпус
Типография Изд-ва МГУ (филиал), Москва, проспект Маркса, 20

Библиотека

Е. РИКОТЕНА

Библиотека