

Р. А. ЗАХАРЯН, Т. В. ВЕНКСТЕРН, А. А. БАЕВ

## N(1)-МЕТИЛ-АДЕНОЗИНТРИФОСФОРНАЯ КИСЛОТА, ПОЛУЧЕНИЕ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

В этой работе поставлена задача разработать метод получения N(1)-метил-АТФ и установить, какое значение имеет метилирование АТФ для двух энзиматических реакций.

(1) аминокислота + АТФ  $\rightleftharpoons$  аминоациладенилат + PP неорг.

(2) (тРНК) — С — С<sub>он</sub> + АТФ  $\rightleftharpoons$  (тРНК) — С — С — А<sub>он</sub> + PP, из которых первая катализируется аминокил · тРНК-лигазами (К.Ф.6.1.1), а вторая — тРНК-нуклеотидил-трансферазами (К.Ф.2.7.7.25).

**Методы. Получение т-РНК.** Препарат суммарной т-РНК из пекарских дрожжей получали фенолцетавлоновым методом, описанным ранее [6, 3]. Активирование аминокислот определяли по [17].

Гидроксамат (Куханова и др. [5]) разделяли восходящей хроматографией в 0,05—0,1 М Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7,0. Свободная аминокислота движется с фронтом растворителя. R<sub>f</sub> гидроксамата равен приблизительно 0,5.

Радиоактивность измеряли на карботриметре в жидком сцинтилляторе: 0,4% РРО и 0,010 РОРОР в толуоле. Эффективность счетчика — 40%. т-РНК-нуклеотидил-трансферазная реакция была использована для регенерации концевой акцепторной аденилила, поскольку т-РНК пекарских дрожжей содержит только от 25 до 50% концевой аденозина.

В этом случае поступали так же, как при определении акцепторной способности т-РНК [6], используя pH 5 фракцию в качестве источника т-РНК-нуклеотидил-трансферазы. Получение бессолевого гидроксилamina по [17], определение концевой аденозина и концевой цитидина проводили по нашей методике [4].

**Результаты опытов.** Получение N(1)-метил-аденозинтрифосфорной кислоты. Насколько нам известно, получение N(1)-метил-аденозинтрифосфорной кислоты с помощью диметилсульфата до сих пор не было описано, хотя N(1)-метил-АМФ была синтезирована Бруксом и Лоули [18, 9] Гриффином и Ризом [15]. При выборе способа получения N(1)-метил-АТФ был использован предшествующий опыт метилирования тРНК [4], используя диметилсульфат при слабокислом pH. При этом нужно было считаться с возможностью метилирования фосфатных остатков АТФ.

По данным Бримакомбе и др. [8], межнуклеотидные диэфирные фосфорной кислоты недоступны действию диметилсульфата. Метилирование первичной и вторичной группы концевой фосфата АТФ в какой-то степени может происходить. На это указывают Гриффини и Риз, которые

получили с помощью ДМС N (1)-метил-АМФ с небольшой примесью ее монометилового эфира [15].

При изучении ЯМР комплекса АТФ-металл, дисперсии оптического вращения и инфракрасных спектров ряд авторов [13, 16, 10] считает вероятной модель АТФ, сформулированную в свое время Сент-Дьердьи [20]. Если это справедливо, то введение в реакционную смесь  $Mg^{++}$  могло бы существенно повысить специфичность метилирования за счет блокирования диссоциированных групп концевой фосфата и образования координационных связей с аминогруппой при С(6) и N(7) аденина.

Нужно заметить, что  $Mg^{++}$  улучшает условия осаждения метилированной и неметилированной АТФ спиртом (первоначально для этой цели мы пользовались NaCl в кислой среде).

**Метилирование АТФ.** 100 мг натриевой соли АТФ растворяли в 150 мл 0,4 М раствора ацетата калия, содержащего  $Mg^{++}$  в концентрации 0,01 М. Добавляли 2 мл перегнанного диметилсульфата и реакцию вели при 4° в течение 24 часов. Метилированную АТФ и остаток непрореагировавшей АТФ осаждали, добавляя к реакционной смеси 800—1000 мл абсолютного этанола, охлажденного до 4°. Осадок оставляли на 12 час. в холодной комнате.

Опыт показал, что  $Mg^{++}$  не ингибирует метилирование аденина по N(1), в то время как, например, метилирование гуаниловых остатков по N(7) в составе тРНК [4] заметно угнетается  $Mg^{++}$ , нужно думать, в связи с тем, что N(7) гуанина является наиболее вероятным местом присоединения металлов [7, 11].

**Выделение 1-метил-АТФ.** Осадок отделяют центрифугированием на низкооборотной центрифуге или фильтрованием через ультрафильтры. Затем осадок растворяют в минимальном объеме дистиллированной воды и наносят на колонку с ДЕАЕ-сефадексом (ацетатная форма). Для 100 мг АТФ пользуются колонками 15×1,5 см. Элюцию ведут в линейном градиенте 0,02—0,35 М ацетатом аммония в 7 М мочевины при pH 7,0; объем элюента 500 мл; скорость пропускания довольно высокая—120 мл/час. В случае разделения 300—400 мг используют колонки размером 20×3 см, объем элюента 1800 мл, скорость пропускания 200 мл/ч. В этой системе 1-метил-АТФ и АТФ разделяются полностью; как показывает хроматографический профиль на рис. 1, 1-метил-АТФ (пик 1) снимается значительно раньше неметилированной АТФ (пик 2). Причина этого заключается в уменьшении суммарного заряда молекулы метилированной АТФ за счет протонизации N(1) аденина даже при нейтральной реакции.

Фракции, соответствующие пику 1, объединяют, разводят в 3 раза для уменьшения концентрации солей и пропускают через колонку с дауэксом 1×4 (форминатная форма). Это делают с целью освобождения раствора от мочевины, мешающей при осаждении 1-метил-АТФ спиртом. Последнюю элюируют 40—50 мл 2 М формиата аммония непосредственно в 500 мл (8—10 объемов) охлажденного до 4° абсолютного этанола. При добавлении  $Mg^{++}$  до 0,01 М концентрации выпадает хлопьевид-

ный осадок, который несколько раз промывают на ультрафильтре абсолютным спиртом и высушивают затем в вакуум-эксикаторе. Выход 1-метил-АТФ—30%.

Таким же образом можно поступить с АТФ, содержащейся в пике 2.

**Идентификация 1-метил-АТФ.** При идентификации 1-метил-АТФ был использован известный феномен миграции метильного остатка с N (1) аденина на  $\text{NH}_2$ -группу в щелочных условиях. Для этого 1-метил-АТФ подвергают гидролизу в 1 н  $\text{HCl}$  в течение часа при  $100^\circ$ , получая 1-метиладенин. Отбирают алиquot гидролизата и подвергают его воздей-

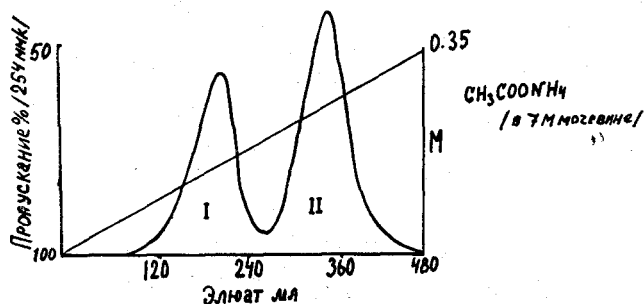


Рис. 1. Хроматография N(1)-метил-аденозинтрифосфорной кислоты на ДЕАЕ-сепадэксе. Колонка с сепадэксом А-25 (ацетатная форма)  $10 \times 1$  см, сорбировано 3 мг препарата. Линейный градиент 0,02—0,35 М  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  рН 7,0 в 7 М мочеvine; объем элюента 500 мл. Скорость пропускания 120 мл/час; запись на „Увикорде“ LKB. I—1-метил-АТФ; II—АТФ. В препаративном масштабе основным пикам 1-метил-АТФ и АТФ предшествуют соответственно в 5—8% 1-метил-АДФ и АДФ.

ствию 1 н  $\text{KOH}$  при  $100^\circ$  в течение 1 часа; при этом получают 6-метиладенин. Затем хроматографируют на бумаге пробу кислотного гидролизата 1-метил-АТФ и пробу после щелочной обработки наряду с растворами аутентичного аденина и 6-метиладенина (рис. 2).

Результаты хроматографии не оставляют сомнений в том, что мы имеем дело с 1-метиладенином и 6-метиладенином. Кроме того, идентификацию проводили в системе метанол— $\text{HCl}$ —вода (70 : 20 : 10).

На рис. 3 показаны спектры поглощения 1-метиладенина и 6-метиладенина, полученных из 1-метил-АТФ; эти спектры совпадают с приведенными в литературе [2].

Определение молярного отношения Р : аденин (последний определяли по поглощению) в 1-метил-АТФ дало значение 3 : 1. Нужно заметить, что присутствие полифосфатной группы 1-метил-АТФ существенно облегчает миграцию метила с N(1) на  $\text{NH}_2$ -группу при С(6). Если в случае 1-метиладенина для этого необходимо 1 н  $\text{KOH}$  и  $100^\circ$ , то миграция метила в 1-метил-АТФ происходит в 0,3 н  $\text{KOH}$  при  $37^\circ$ .

**Функциональные свойства N(1)-метил-АТФ.** Как было нами показано, N (1)-метил-АТФ не обеспечивает аминоацилирования нативной т-РНК [4], из этих данных не следует, что препятствия возникают только на стадии присоединения аминоациладенилата к т-РНК. Это вполне

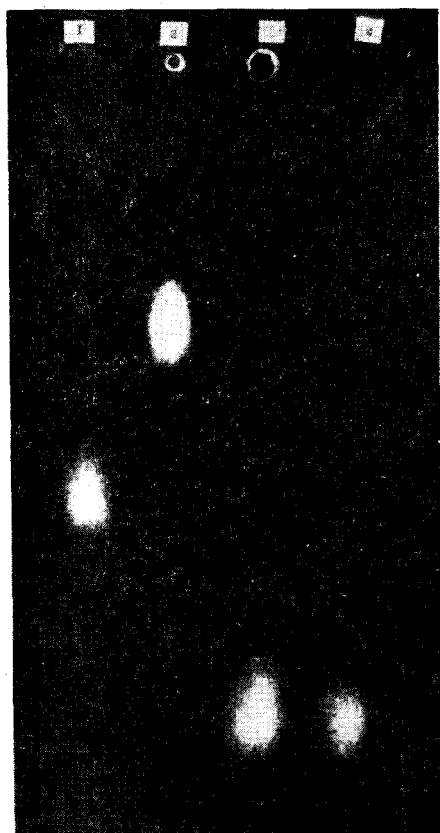


Рис. 2. Хроматография на бумаге N (1)-метиладенина. Растворитель Н-бутанол-Н<sub>2</sub>О (84:16)—5%-й NH<sub>4</sub>OH на дне хроматографического сосуда. 1—аденин, 2(—)1-метиладенин, после гидролиза 1-метил-АТФ в 1 н НСl 1 час при 100°; 3—6-метил-аденин—продукт превращения N-метиладенина АТФ после инкубации в 1 н КОН, 1 час при 100°; 4—6-метиладенин (свидетель).

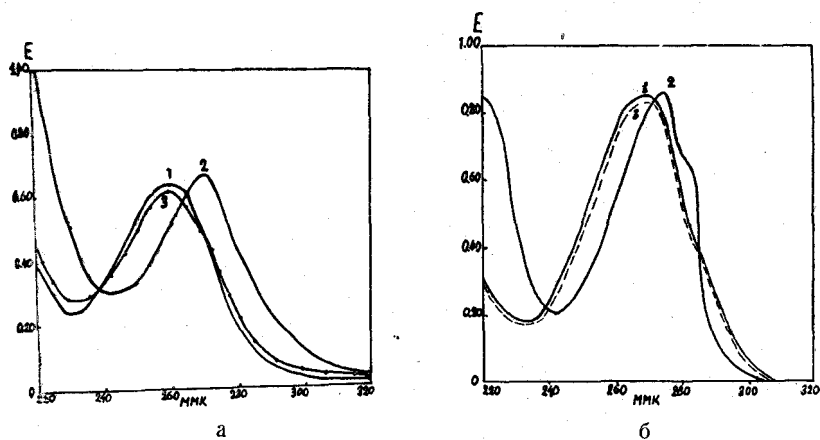


Рис. 3. Спектры поглощения метилированных аденинов. а—1 метиладенин; б—6-метиладенин. 1—в 0,1 н НСl; 2—в 0,1 н КОН; 3—после бромирования.

Таблица 1

Спектральные характеристики 1-метиладенина и 6-метиладенина приведены в таблице

| Характеристика       | 1-метиладенин |              | 6-метиладенин |              |
|----------------------|---------------|--------------|---------------|--------------|
|                      | в 0,1 н НСl   | в 0,1 н, КОН | в 0,1 и, НСl  | в 0,1 н, КОН |
| $\lambda$ макс (ммк) | 259           | 270          | 267           | 273          |
| $\lambda$ мин (ммк)  | 230           | 242          | 232           | 239          |
| E 250/E 260          | 0,82          | 0,70         | 0,63          | 0,54         |
| E 280/E 260          | 0,36          | 0,92         | 0,74          | 1,16         |
| E 290/E 260          | 0,14          | 0,56         | 0,37          | 0,23         |

может произойти на предшествующем этапе активирования аминокислоты.

С этой целью были поставлены опыты с активированием  $C^{14}$ -валина в присутствии обычной и метилированной АТФ в системе, описанной Лофтфильдом и Эйгнером [17] с небольшими изменениями, внесенными Кухановой и др. [15] (табл. 2).

Таблица 2

Активирование валина с помощью N(1)-метил-АТФ

| Система                              | Образование гидроксамата $C^{14}$ -валина |     |
|--------------------------------------|-------------------------------------------|-----|
|                                      | имп/мин                                   | %   |
| Система с АТФ . . . . .              | 7300                                      | 100 |
| Система с АТФ <sup>+</sup> . . . . . | 7500                                      | 100 |
| Система с N(1)-метил-АТФ . . . .     | 1800                                      | 25  |

Таким образом, метилирование АТФ по N(1) резко угнетает активирование валина, и отрицательный результат опыта, представленного в (4), зависел прежде всего от выключения реакции, предшествующей аминоацилированию—т-РНК. Далее, наше внимание было направлено на т-РНК-нуклеотидил-трансферазную реакцию, протекающую с участием метилированной по N(1) АТФ.

Для этого не пришлось прибегать к пирсфосфоролизу т-РНК, так как препараты суммарной т-РНК обычно содержат значительное количество нуклеиновой кислоты, лишенной концевой аденозина. В наших препаратах т-РНК из пекарских дрожжей обычно только 20% вещества содержало концевой аденозин, в 80% обнаруживался в концевом положении цитидин. Грей и Лейн [14] указывают, что т-РНК пекарских дрожжей в противоположность пивным особенно легко теряет концевой аденозин (табл. 3).

Система регенерации акцепторной последовательности т-РНК описана выше. Различия проб касаются только препарата АТФ. АТФ<sup>+</sup> — препарат, полученный при разделении на колонке АТФ после метили-



Հավանաբար N (1) ԱՆՖ թթվում անմիջականորեն մասնակցում է ֆերմենտոսուբստրատային միացման ստեղծմանը՝

### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Венкстерн Т. В. Успехи биологической химии, 6, 3, 1964.
2. Венкстерн Т. В., Баев А. А. Атлас «Спектры поглощения минорных оснований», Наука, 1965.
3. Захарян Р. А., Баев А. А. Биологический журнал Армении, XIX, 2, 71, 1966.
4. Захарян Р. А., Венкстерн Т. В., Баев А. А. Биохимия, 32, 5, 1068, 1967.
5. Куханова М. К., Парин А. В., Киселев Л. Л., Биохимия, 32, 735, 1967.
6. Мирзабеков А. Д., Венкстерн Т. В., Баев А. А. Биохимия, 30, 825, 1965.
7. Antony T. Tu, Jose A. Reinosa Biochemistry 5, 10, 3375, 1966.
8. Bricamombe R. L. C., Griffin B. E., Haslam W. E., Reese C. B. Biochemistry, 4, 2452, 1965.
9. Brookes P., Lawley P. D., J. Chem. Soc., 539, 1960.
10. Cohn M., Hughes I. R. T. J. Biol. Chem., 237, 178, 1962.
11. Daune M., Dekker C. A., Shachmann H. K. Biopolimers, 4, 51, 1966.
12. Egami F., Takahasi K., Uchida F. Progress in nucleic acid research, vol. 3, 59, 1964.
13. Epp A., Ramasarama T., Wetter L. T. J. Am. Chem. Soc. 80, 724, 1958.
14. Gray M. W., Laane B. G. Biochem. Biophys. Acta, 134, 243, 1967.
15. Griffin B. E., Reese B. Biochem. Biophys. Acta, 68, 185, 1963.
16. Levedahl B. H., James T. W. Biochem. Biophys. Acta, 21, 298, 1956.
17. Loftfield R. B., Eigner E. A. Biochem. Biophys. Acta, 72, 372, 1963.
18. Lawley P. D., Brookes P. Biochem. J., 80, 496, 1961.
19. Michelson A., Pochon F. Biochem. Biophys. Acta, 114, 468, 1966.
20. Szent-Gyorgyi A. Introduction to a Submolecular Biology, Academic Press, New York, 1960.