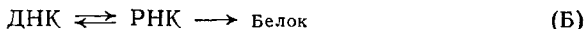
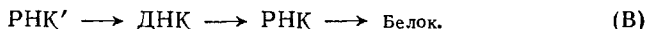


численные факты не нарушают «догму», но требуют ее дополнения. Вместо схемы А следует пользоваться схемой



или



Основное положение молекулярной биологии, согласно которому происходит передача информации от нуклеиновой кислоты к белку, но не обратно, естественно, остается справедливым. Нуклеиновые кислоты обладают «законодательной», а белки «исполнительной» функцией. Причины этого подробно рассмотрены Эйгеном [57].

§ 9.3. ТРАНСКРИПЦИЯ

Синтез РНК на матрице ДНК происходит с помощью РНК-полимеразы. Большинство исследований проведено на РНК-полимеразе из *E. coli* или из бактерии *Azotobacter vinelandii*. Эти ферменты являются своего рода молекулярными машинами — они имеют сложную четвертичную структуру и выполняют ряд функций: узнавание начального локуса синтеза и специфическое связывание в этом локусе ДНК, инициацию синтеза РНК (образование первой межнуклеотидной связи), непосредственно синтез РНК и терминацию — обрыв синтезируемой цепи РНК в конце гена или линейной последовательности генов (при синтезе полицистронной РНК) и «сваливание» фермента с матрицы.

При низких ионных силах РНК-полимераза является димерным ферментом с молекулярным весом, несколько меньшим 10^6 и константой седиментации 23 S. При ионных силах, больших 0,1 M, фермент обратимо распадается на два мономера; $21 \text{ S} \rightleftharpoons 2 \cdot 13 \text{ S}$. Показано, что мономер 13 S является ферментативно активной формой [35], но относительно димера 21 S мнения расходятся (см. [14]).

Мономерный фермент 13 S в свою очередь состоит из субъединиц: двух больших субъединиц β и β' (м.в. 150 000 и 165 000 соответственно), двух одинаковых меньших субъединиц α (м.в. каждой около 40 000), и так называемого σ -фактора (м.в. 80 000). Таким образом, РНК-полимераза 13 S может быть символически представлена в виде $\sigma\alpha_2\beta\beta'$ [36].

Вопрос о роли субъединиц не решен, но известно, что σ -фактор обеспечивает специфическое «считывание» определенной системы генов. Если от РНК-полимеразы отделить σ -фактор, то эффективность транскрипции так называемых предранних генов фага T4 понижается на два порядка, тогда как на неспецифической для этого фермента матрице (тимусной ДНК) влияние σ -фактора незначительно. В самом синтезе РНК σ -фактор не

участвует и, как только полимеразы начинают двигаться по матрице, выделяется в раствор, чтобы опять состыковаться с основной частью $\alpha_2\beta\beta'$ после отделения фермента от матрицы. Следует подчеркнуть, что сложное строение полимеразы связано с многообразием функций, которые выполняет этот фермент, и необходимостью регуляции процесса транскрипции. В тех случаях, когда единственная функция РНК-полимеразы состоит в синтезе РНК, структура фермента может быть значительно проще. Так, например, специфическая РНК-полимераза из фага T7 состоит из одной лишь полипептидной цепи с молекулярным весом около 100 000. Терминация синтеза *in vivo* осуществляется с помощью еще одного так называемого ρ -фактора, представляющего собой отдельный белок, нормально не связанный с РНК-полимеразой. Этот фактор «узнает» конец цепи и заставляет полимеразу прекращать синтез РНК [37].

Обсуждаемые РНК-полимеразы более активны с двуспиральной, чем с денатурированной ДНК и *in vivo* используется именно такая матрица, локально расплетаемая в точке роста цепи РНК [38]. Скорости синтеза РНК *in vivo* и в оптимальных условиях *in vitro* близки и составляют 20—30 нуклеотидов в секунду. *In vivo*, а на специфичной и неразрушенной матрице и *in vitro* считывается лишь одна нить ДНК, но для разных последовательностей генов (разных оперонов) эта нить не всегда одна и та же. Поэтому начала последовательностей должны давать информацию о том, какую из нитей ДНК должна читать полимеразы. В связи с этим интересна гипотеза Шибальского [39], согласно которой начала геновой последовательности характеризуются неравномерным распределением пуриновых и пиримидиновых оснований между цепями ДНК: одна нить богата пуринами, другая — пиримидинами. Однако расшифровка последовательностей в местах связывания полимеразы не подтвердила гипотезу Шибальского [153].

Рентгеноструктурное исследование полинуклеотидов, у которых одна нить содержит лишь пурины, а другая — пиримидины, показало отличие пространственной структуры таких полимеров от структуры В-формы ДНК [40]. Таким образом, возможно, что РНК-полимераза узнает начало считывания по пространственной структуре.

Применению физических методов для изучения механизма транскрипции в значительной степени препятствует то, что РНК-полимераза «сидит» на ДНК очень редко, и конформационные превращения матрицы, сопровождающие синтез РНК, захватывают лишь незначительную часть длинной молекулы ДНК. Поэтому большой интерес представляет изучение комплексов РНК-полимеразы с отрезками ДНК минимальной длины, еще несущими все специфические функции, исключая разве лишь

терминацию растущей цепи. Их можно получить, если обработать комплекс полимеразы с ферментом ДНКазой. При этом остается нетронутым связанный с полимеразой отрезок ДНК размером несколько менее трех витков спирали (около 30 нуклеотидных пар). Оказалось, что такой комплекс способен выполнять основную функцию полимеразы (синтез РНК), создавая короткие молекулы РНК длиной в 15—20 нуклеотидных звеньев [41]. Можно надеяться, что применение различных физических методов, позволит выяснить механизм процессов, идущих при перемещении РНК-полимеразы вдоль ДНК, которое происходит со скоростью 20 нуклеотидов в секунду.

Флорентьев и Иванов предложили модель действия РНК-полимеразы [42]. При росте цепи РНК (рис. 9.6) происходит связывание 3'-гидроксила рибозы с 5'-фосфатной группой атакующего нуклеотида. Последовательность оснований РНК определяется этой последовательностью в ДНК [43].

Известно, что расщепление фосфоэфирной связи идет через промежуточное состояние, в котором пять ковалентных связей атома Р находятся в тригональной бипирамидальной конфигурации. Поэтому реакцию присоединения нуклеотида можно представить двухстадийной схемой (рис. 9.7). Образование промежуточной системы II требует энергии; напротив, выделение пиррофосфата освобождает свободную энергию. Модель исходит из представления о перекрывании обеих стадий. Предполагается, что при раскручивании ДНК и возникновении гибридной двойной спирали ДНК—РНК матрица ДНК функционирует в *A*-, а не в обычной *B*-форме, т. е. *A*-форма стабилизируется в участке матрицы, примыкающем к активному центру системы. Это положение аргументировано рядом фактов [42]. Локальный переход *B*-формы в *A*-форму во время действия полимеразы может индуцироваться удалением молекул воды из участка ДНК, связанного с ферментом, что благоприятствует поликонденсации нуклеотидов. Как показывает изучение молекулярных моделей, нет стерических препятствий для выхода основания в одной цепи ДНК из гликозидной выемки в *A*-форме ДНК после разрыва водородных связей с основанием комплементарной цепи. При этом конформация второй цепи не меняется.

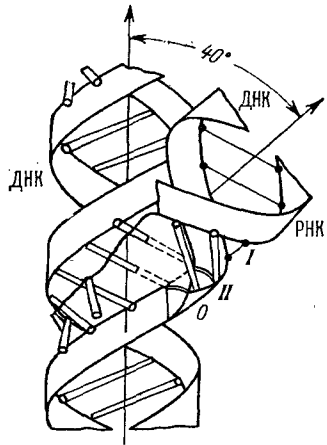


Рис. 9.6. Структура двуспиральной матрицы ДНК и растущего конца РНК при действии РНК-полимеразы.

Для «перекрывания» стадий необходимо предположить одновременное участие в процессе двух нуклеотидов, один из которых находится в состоянии *I*, а другой в состоянии *II* (см. рис. 9.7) и оба комплементарны нуклеотидам ДНК. Модель показывает, что ось образующейся гибридной спирали наклонена к оси исходной двойной спирали ДНК под углом 40° (см. рис. 9.6).

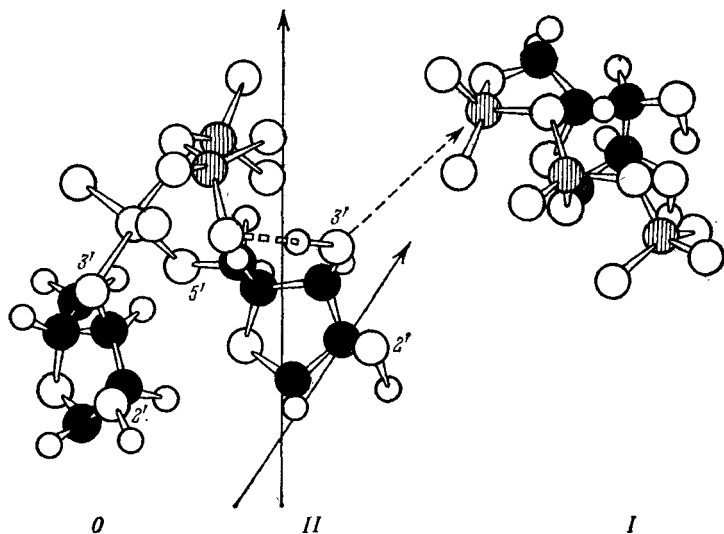


Рис. 9.7. Двухстадийная схема присоединения нуклеотида.

Слева изображена конформация двух последних рибонуклеотидов в точке роста цепи РНК, справа — вьюсь присоединяющийся нуклеозидтрифосфат. 0 — нуклеотид, образовавший ковалентную связь с *II*, но еще не отщепивший пирофосфат.

Таким образом, при каждом шаге новое основание «извлекается» из матрицы ДНК, и дезоксирибонуклеотид, комплементарный рибонуклеотид которого лишился пирофосфата, поворачивается назад в ДНК с восстановлением водородных связей. Ось гибридной спирали движется вдоль ДНК винтовым способом с одновременным перемещением фермента.

Известно, что в отсутствие субстратов (нуклеозидтрифосфатов) РНК-полимераза слабо связывается с ДНК. Напротив, во время синтеза РНК образуется недиссоциирующий комплекс ДНК — фермент [43]. Согласно описываемой модели этот комплекс стабилизирован связями между пирофосфатными группами двух взаимодействующих рибонуклеозидтрифосфатов и катионными группами субъединиц полимеразы. Основания этих три-

фосфатов образуют уотсон-криковские пары с основаниями ДНК. Нуклеотиды I и II вместе с нуклеотидами O образуют переходную гибридную область. В любой момент одновременно функционируют два рибонуклеозидтрифосфата; тем самым модель объясняет сильное связывание фермента. Модель позволяет установить конформации сахаро-фосфатной части нуклеотидов O и II и аргументировать предположение о конформации нуклеотида I. При перемещении фермента вдоль ДНК происходят конформационные изменения, способствующие реакции. Модель учитывает субъединичную структуру полимеразы.

Качественно энергетический аспект процесса транскрипции сводится к сопряжению экзергонических и эндергонических стадий между двумя последовательными реакционными циклами. Предлагаемая модель сходна с моделью действия трансминазы (см. стр. 380) в том отношении, что фермент создает надлежащие условия на каждом этапе полистадийного процесса. Эти условия обеспечиваются структурными перестройками на предыдущей стадии. По существу, модель исходит из рассмотрения ЭКВ (см. стр. 408).

Альтернативная модель была одновременно предложена Райли [44], считающим, что транскрипция происходит без раскручивания двойной спирали ДНК. РНК растет в широкой бороздке двойной спирали ДНК в результате специфического стереохимического взаимодействия между рибонуклеотидами и парами оснований ДНК. На промежуточных стадиях транскрипции образуются триплеты из двух оснований ДНК и основания РНК. Модель Райли не рассматривает работу фермента.

Экспериментальные данные, появившиеся вскоре после работ [42, 44], подтвердили модель с раскручиванием. Воспользовавшись формальдегидным методом (см. стр. 524), Косаганов и соавторы исследовали комплекс ДНК из фага T2 с РНК-полимеразой из *E. coli* в присутствии всех четырех нуклеозидтрифосфатов [38]. Формальдегидный метод позволяет обнаружить дефекты в ДНК в количестве 1 на 10 000 пар оснований. В полной системе была установлена концентрация дефектов в ДНК, равная $(6 \pm 2) \cdot 10^{-4}$, что соответствует среднему расстоянию между двумя дефектами в 1600 ± 500 пар оснований. В исходной ДНК и в комплексе ДНК — РНК-полимераза в отсутствие НТФ концентрация дефектов менее 10^{-4} и расстояние между двумя соседними дефектами превышает 10^4 пар оснований. Инактивация полимеразы нагреванием также уменьшает число дефектов до 10^{-4} . Позднее, пользуясь модифицированным формальдегидным методом, те же авторы обнаружили расплетание ДНК уже на стадии ее связывания с ферментом.

Исследование упомянутых выше (см. стр. 566) комплексов РНК-полимеразы с короткими отрезками ДНК, проведенное

методом кругового дихроизма, показало, что в ходе синтеза мРНК возникает ранее отсутствовавшая А-форма либо ДНК, либо гибридного участка ДНК — РНК [149].

§ 9.4. ТРАНСПОРТНЫЕ РНК

Транспортные РНК (тРНК), впервые открытые в 1957 г. [45, 46], составляют около 10% от общего содержания РНК в клетке. Для ряда тРНК полностью определена первичная структура, что связано с наличием в тРНК минорных азотистых оснований — метилированных в различных местах аденозина, гуанозина и т. д. Минорные нуклеотиды служат идентифицируемыми реперами при расщеплении тРНК под действием нуклеаз. тРНК расщепляют на блоки, получающиеся олигонуклеотиды фракционируют и производят концевой анализ и определение структуры олигонуклеотидов. Впервые этот метод был применен Холли и сотрудниками [47, 48] к Ала-тРНК из дрожжей. В работах Баева и сотрудников, завершившихся определением первичной структуры дрожжевой Вал-тРНК₁ [49], при идентификации олигонуклеотидов широко применялись оптические методы — спектрофотометрия и исследование КД [50, 51]. Подробное описание этих исследований приведено в монографии [52]. К началу 1975 г. установлена первичная структура около семидесяти тРНК различного происхождения.

Можно наглядно представить вторичную структуру тРНК, исходя из возможности спаривания комплементарных оснований А с У и Г с Ц и считая, что неспаривающиеся участки представляют собой петли. Тогда все известные тРНК могут быть изображены схемой «клеверного листа», с четырьмя или пятью двуспиральными участками (рис. 9.8). Определенная различными методами степень спирализации согласуется с такой схемой. «Клеверный лист» изображает проекцию на плоскость развернутой молекулы тРНК и передает лишь топологию молекулы, т. е. расположение двуспиральных участков.

Принципиально задача нахождения вторичной структуры РНК по последовательности нуклеотидов была решена Туманяном с сотрудниками [53—55]. Алгоритм нахождения решения включает два этапа. Во-первых, строится треугольная матрица всех возможных пар по простому правилу: элемент таблицы a_{ij} , стоящий на пересечении i -го столбца и j -й строки, равен 1 или 0, если i -й и j -й нуклеотиды соответственно комплементарны или некомплементарны. Если надо учесть разную свободную энергию образования пар Г — Ц и А — У, то вместо 1 ставятся соответствующие веса.

Первая часть алгоритма Туманяна была спустя более чем 5 лет воспроизведена Тиноко и др. [56]. После составления