

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-тРНК<sub>1</sub> [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

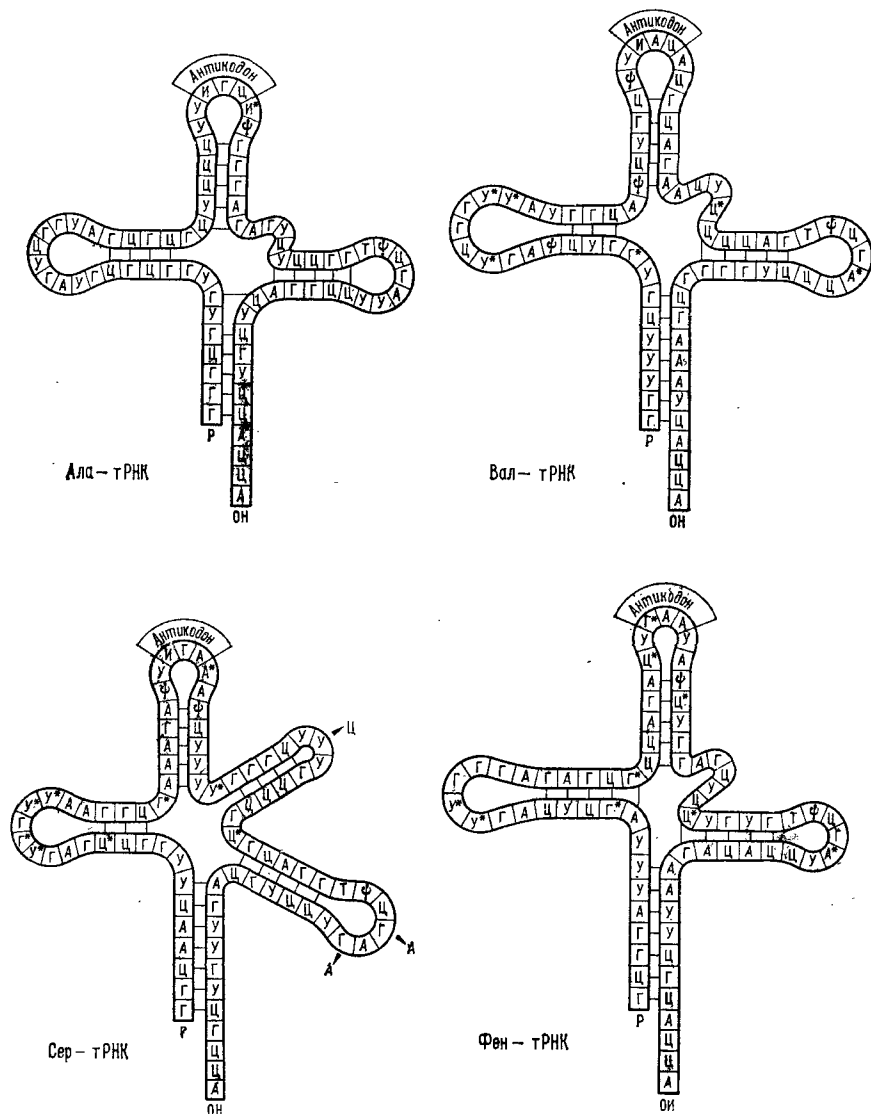


Рис. 9.8. Вторичные структуры некоторых тРНК.

ψ. А\*, У\*, Г\*, И\*—минорные нуклеотиды.

матрицы пар задача может решаться перебором (как у Тиноко) всевозможных вариантов последовательности пар (разумеется, допустимых топологически) с учетом свободной энергии образования разного рода петель.

Алгоритм Туманяна дополнен еще вторым этапом — алгоритмом построения «максимальных шпилек» («максимальной шпилькой» называется вторичная структура с одной двуспиральной областью, обладающая максимальной отрицательной свободной энергией, что соответствует в первом приближении максимуму числа пар). Справедливость алгоритма доказана методом полной математической индукции. Затем осуществляется уже довольно ограниченный перебор вторичных структур с разным числом найденных максимальных шпилек.

Такой алгоритм дает полное решение задачи нахождения вторичных структур РНК, но при этом, разумеется, необходимо использование правильных параметров (величин свободных энергий образования различных пар, петель разной конфигурации и т. д.).

В работе [56] предложены оценки свободной энергии образования петель (см. стр. 499) и двуспиральных участков. Инициирование спаривания оснований в одноцепочечной молекуле РНК включает образование петли. Свободная энергия инициации есть  $-RT \ln \gamma_m$ , где  $\gamma_m$  — вероятность образования петли из  $m$  неспаренных звеньев. С уменьшением  $m$   $\gamma_m$  возрастает, пока образованию петли не помешают стерические факторы. Если  $T_m^\infty$  — температура, при которой равные количества двуспиральных и одноцепочечных участков находятся в равновесии, т. е. температура плавления двойной спирали, то для спирализации  $\Delta F(\text{спир}) = 0$  и

$$\Delta S(\text{спир}) = \Delta H(\text{спир})/T. \quad (9.1)$$

При температуре  $T$  для короткой двойной спирали РНК

$$\Delta F(\text{спир}) = \Delta H(1 - T/T_m^\infty) \quad (9.2)$$

и полная свободная энергия образования двойной спирали оказывается равной

$$\Delta F = \Delta H(1 - T/T_m^\infty) - RT \ln \gamma_m. \quad (9.3)$$

Наиболее устойчива структура с наименьшим значением  $\Delta F$ . Образование пары А — У дает  $\Delta F = -1,2$  ккал/моль. Примем это значение за «число стабильности»  $\beta$ , равное +1. Тогда из данных, относящихся к температурам плавления и термодинамическим характеристикам двуспиральных олигонуклеотидов, получаются следующие значения  $\beta$ : 1) пара А — У +1; 2) пара Г — Ц +2; 3) пара Г — У 0; 4) шпильчатые петли от —5 до —7;

5) внутренние петли от  $-4$  до  $-7$ ; 6) односторонние петли от  $-2$  до  $-6$ . С помощью этих данных в работе [53] вычислены  $\Delta F$  для трех возможных структур (рис. 9.9), отвечающих последовательности 55 оснований РНК из вируса R17 и показанных

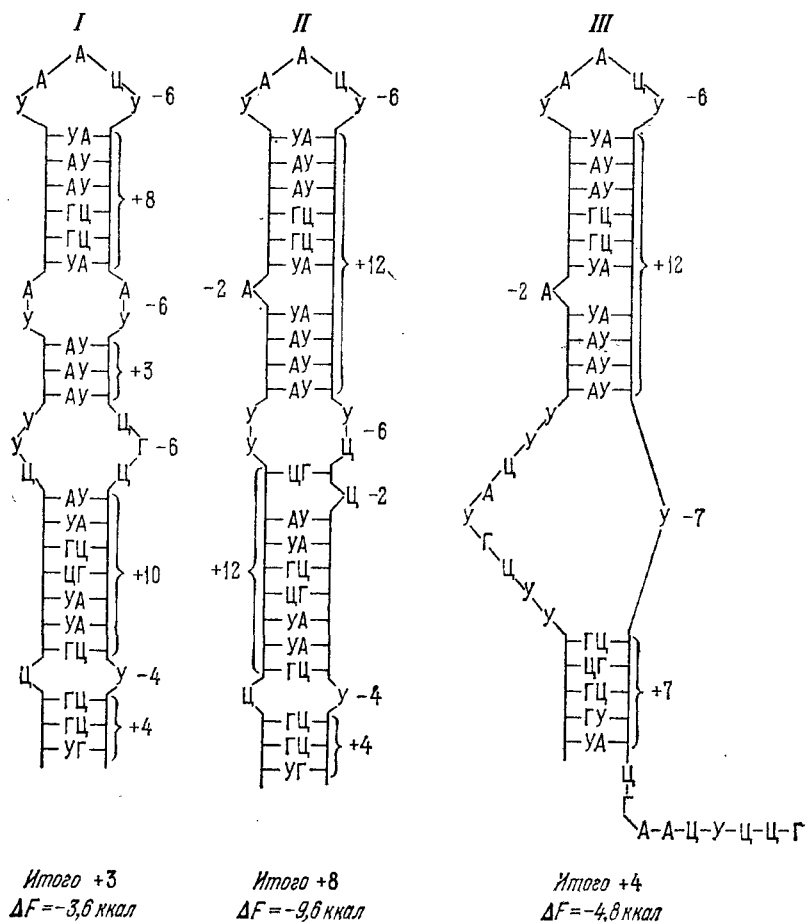


Рис. 9.9. Три возможные структуры фрагмента вирусной РНК.

на рис. 9.9. Наиболее стабильна структура II. Эти расчеты основаны на предварительных данных и не учитывают факторов среды. В дальнейшем результаты работы [56] были уточнены в [150]. Вместо того чтобы приписывать определенное значение свободной энергии каждой паре оснований, рассматриваются две соседние пары оснований и, тем самым, учитывается их

взаимодействие. Необходимые для этого термодинамические данные получены из исследований олигонуклеотидов. Изменены также оценки свободных энергий для петель.

Причины возникновения структуры «клеверного листа» у тРНК наглядно выявляются в «игре в тРНК», описанной Эйгеном [57]. Представим себе двух игроков, которым дана беспорядочная последовательность  $N$  единиц четырех сортов А, У, Г, Ц и тетраэдрическая кость, каждая грань которой представляет одну из этих единиц. Бросая кость по очереди и заменяя полученной единицей заранее объявленную единицу в последовательности, каждый игрок стремится получить двуспиральную структуру с максимальным числом пар А—У или Г—Ц. Игра кончается, когда игрок объявляет «полную» структуру. Выигрывает тот, кто набрал большее число очков — пара Г—Ц дает два очка, пара А—У — одно. Наложено ограничение, состоящее в том, что пары образуются лишь в минимальных последовательностях 2(Г—Ц) или 1(Г—Ц) + 2(А—У), или 4(А—У). (кооперативность). Каждая петля в структуре должна содержать не менее пяти неспаренных единиц. Результатом игры действительно оказывается «клеверный лист». «Шпилька» с одной петлей имеет наибольшее число оснований, которые могут спариться, но «клеверный лист» более гибок — дает больше комбинаций, чем «шпилька». Для 80 нуклеотидов оптимум отвечает 3—4 «листьям». По мнению Эйгена, природа давно «играла в эту игру».

Пространственное строение тРНК характеризуется большой компактностью молекул в нативном состоянии. Положение спиральных участков фиксировано, вероятно, в результате взаимодействия неспиральных участков. В этом смысле молекула тРНК сходна с белковой глобулой. Для поддержания нативной пространственной структуры необходимы ионы Mg. Термически денатурированная тРНК способна к ренатурации. Эти особенности структуры установлены путем исследования гидродинамических свойств и рентгеновского рассеяния под малыми углами (см., в частности, [58, 59]).

тРНК удалось получить в кристаллической форме и исследовать структуру кристаллов методом рентгенографии [60—62]. При разрешении 12 Å были найдены молекулярные размеры формилметиониновой тРНК из *E. coli*, равные  $80 \times 25 \times 35 \text{ Å}^3$ . Высокое разрешение 2,3 Å, примененное к исследованию кристаллов дрожжевой Фен-тРНК, дало молекулярные размеры  $80 \times 33 \times 28 \text{ Å}^3$ . Размеры орторомбической единичной ячейки  $a = 33,2$ ,  $b = 56,1$ ,  $c = 161 \text{ Å}$ . Дифракционная картина вдоль оси  $a$  (но не вдоль оси  $b$ ) характерна для двуспиральных нуклеиновых кислот. Отсюда, видимо, следует, что длины двуспиральных участков отвечают не менее, чем половине оборота

спирали, т. е. содержат более 4—7 пар оснований. Эти результаты согласуются с моделью клеверного листа [63].

тРНК кристаллизуется в различных элементарных ячейках, разные кристаллические формы получаются при изменении условий кристаллизации.

Позднее Рич с сотрудниками провели полную расшифровку пространственной структуры Фен-тРНК на основе рентгенограмм с разрешением до 4 Å [154]. Третичная ее структура состоит из двух спиральных сегментов, соединенных под прямым углом друг к другу так, что получается подобие буквы Г. Антикодоновая шпилька объединяется в одну спиральную систему со шпилькой, содержащей дегидроуридиловую петлю. Эта структура показана на рис. 9.10 (см. также [152]).

Компактная структура тРНК стабилизирована горизонтальными и вертикальными взаимодействиями оснований. В их упаковке играют роль также гидрофобные взаимодействия и кулоновское отталкивание заряженных фосфатных групп. Исследования триетиевого обмена и реакции формальдегида с молекулами тРНК показали наличие в структуре молекул стабильного двутяжевого остова (48 медленно обменивающихся протонов, что количественно согласуется с моделью «клеверного листа»), окруженного основаниями, формирующими более лабильную третичную структуру [64].

Ионы Mg нейтрализуют отрицательные заряды фосфатных групп и обеспечивают наибольшую стабилизацию компактной структуры молекулы, которая в этих условиях приобретает характерную оптическую активность [65, 66]. Спектр КД тРНК имеет интенсивный положительный максимум при 2640 Å ( $\Delta\epsilon \sim 5,5$ ), отрицательные максимумы 2960 ( $\Delta\epsilon = -0,35$ ), 2330 ( $\Delta\epsilon = -1,0$ ) и 2100 Å ( $\Delta\epsilon \sim -5,0$ ); кроме того, при 1880 Å наблюдается интенсивный положительный максимум ( $\Delta\epsilon \sim 18$ ), величина которого крайне чувствительна к структурным изменениям [67, 68]. Интенсивности полос 2640, 2100 и 2960 Å также чувствительны к изменениям конформации тРНК [67—69]. У частично разупорядоченных молекул (низкая ионная сила, повышенная температура среды, отсутствие ионов Mg, присутствие органического растворителя) исчезает полоса 2960 Å, уменьшается интенсивность полосы 2640 на 20—25%, а полосы 2100 Å — на 50—55% [67, 70]. Разупорядочение структуры

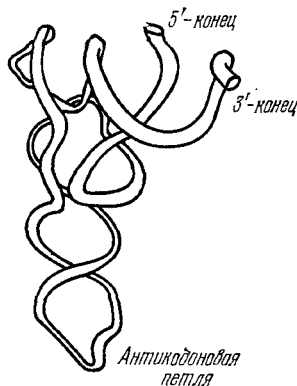


Рис. 9.10. Пространственная структура Фен-тРНК.

сопровождается сдвигом максимума 2640 Å в длинноволновую сторону [71]. Этот эффект, а также исчезновение полосы 2960 Å вызваны изменением взаимной ориентации пентоз и оснований и самих оснований друг относительно друга [70, 71]. Исследование температурной зависимости спектров КД тРНК показало наличие нескольких ступенчатых изменений конформации молекул в процессе плавления и вновь подтвердило схему вторичной структуры типа «клеверного листа» (см. [70—73]).

Упорядочение структуры молекул тРНК сопровождается появлением гипохромизма (до 22%) [64], увеличением числа медленно обменивающихся протонов [74], уменьшением числа оснований, доступных для формальдегида [64] и различных нуклеаз [75], увеличением коэффициента седиментации и уменьшением характеристической вязкости. Полная стабилизация ионами  $Mg^{++}$  и  $Ca^{++}$  происходит при отношении их концентрации к концентрации фосфатов 1 : 2 [70].

Плавление молекул тРНК в отсутствие ионов Mg имеет некооперативный характер, ширина интервала плавления ( $\Delta T$ ) примерно равна  $55^\circ$  [76]. Добавление ионов Mg делает процесс кооперативным ( $\Delta T \approx 18^\circ$ ) и повышает температуру до  $75-80^\circ$  [76]. Теоретический анализ кривых плавления тРНК вновь подтверждает структуру «клеверного листа» [64, 77].

При нагревании молекул тРНК обнаружены изменения их структуры при температуре  $30-40^\circ C$ , т. е. до начала плавления. Эти изменения наблюдались по гидродинамическим характеристикам [78] и при исследовании поляризации люминесценции присоединенных к тРНК молекул красителей. Очевидно, что в молекулах тРНК еще до плавления остова появляются степени свободы, позволяющие отдельным фрагментам молекулы перемещаться друг относительно друга. Данные по поляризации люминесценции показали, что молекулы тРНК имеют в растворе форму эллипсоидов с соотношением полуосей 1 : 4 [79].

Исследование миграции энергии между люминесцирующим основанием, находящимся в петле антикодона молекул Фен-тРНК, и хромофорами акридинового типа, ковалентно привязанными к акцепторному концу, позволило оценить расстояние между ними [80]. Оно оказалось больше 40 Å. Изучение миграции энергии между молекулами акридиновых красителей, адсорбированными на молекулах тРНК, говорит в пользу компактной третичной структуры [81].

Антикодонный триплет расположен в верхнем лепестке клеверного листа. Как правило, он содержит минорный нуклеотид — инозин (И). Абрахам предложил для Фен-тРНК модель, имеющую столько же вертикальных взаимодействий, сколько и «клеверный лист», но в одной непрерывной двойной спирали с дефектами. Основной аргумент этой работы — необходимость

совместной упаковки двух тРНК, связанных с соседними кодонами мРНК, в рибосоме [82]. Эта модель не имеет структурных подтверждений.

Естественный путь для выяснения структурно-функциональных свойств тРНК состоит в ее ферментативном расщеплении на фрагменты и в исследовании их свойств. Баев и сотрудники [83] показали, что половины молекулы, полученные из дрожжевой Вал-тРНК<sub>1</sub> расщеплением фосфодиэфирной связи в пределах антикодона и сами по себе неактивные, будучи смешаны, полностью восстанавливают акцепторную активность к аминокислоте. В то же время расщепление фосфодиэфирной связи в антикодоне необратимо уничтожает его способность взаимодействовать с кодоном [84]. В дальнейшем было установлено, что восстановлению активности предшествует самосборка фрагментов, причем агрегированная молекула тРНК может быть даже лишена части полинуклеотидной цепи [85, 86]. При самосборке 3'- и 5'-половины агрегируют в эквимольном соотношении, и самосборка проходит количественно менее чем за 2 мин. Самосборка специфична — 3'- 5'-половины Вал-тРНК в присутствии 5'-половины других тРНК образуют только гомологичный комплекс. В каждой тРНК существует своя нуклеотидная последовательность. Половины не обладают сродством к Вал-тРНК-синтетазе. Баев считает, что структурные участки Вал-тРНК, входящие в состав половин, непосредственно не участвуют в узнавании Вал-тРНК-синтазы, но спирализованные части антикодоновой и акцепторной ветвей необходимы для образования активной конформации тРНК.

Пространственное строение тРНК исследуется и косвенными методами. Акридиновые красители сорбируются на двуспиральных участках нуклеиновых кислот между соседними парами А—У (или А—Т в ДНК) попарно. Изучая тушение люминесценции красителей, вызванное миграцией энергии от одной сорбированной молекулы к другой, можно установить относительное расположение двойных пар (А—У)<sub>2</sub> (см. [73]).

Изоакцепторные тРНК различаются своей первичной структурой. По-видимому, это определяется не только вырождением генетического кода (см. § 9.6). В строении тРНК проявляются видовые различия. Установлено, что минорные основания имеют вторичное, а не генетическое происхождение — тРНК метилируется под действием фермента метилазы.

## § 9.5. РИБОСОМЫ

Рибосомы непосредственно наблюдаются с помощью электронной микроскопии как округлые гранулы диаметром 150—250 Å. Физические характеристики рибосом *E. coli* приведены в табл. 9.1 [87].