

Расшифровка генетического кода — крупнейшее достижение молекулярной биологии, биохимии и биофизики. От постановки задачи до ее решения прошло лишь 10 лет — срок очень малый.

Установление кода выдвинуло новые проблемы.

Имеет ли генетический словарь физический, молекулярный смысл или корреляция между кодонами и аминокислотами совершенно случайна? Что можно сказать об эволюции кода в этой связи? Какие факторы влияют на чтение кода, на процессы транскрипции и трансляции? Что и как искажает код? Каковы физико-химические причины мутаций?

Код есть программа трансляции. Чрезвычайно важно понять условия реализации этой программы. Молекулярные механизмы ответственны за кинетику взаимодействия антикодонов с кодонами, за действие рибосом и ацилирующих ферментов. Сегодня мы почти ничего не знаем об этих механизмах и еще не располагаем физической теорией чтения кода (см. § 9.8).

### § 9.7. ФИЗИЧЕСКИЙ СМЫСЛ ГЕНЕТИЧЕСКОГО КОДА

Генетически кодируется только первичная структура белка. Однако биологические функции определяются его пространственным строением. Первичная структура и пространственное строение однозначно связаны (см. § 4.9). Тем самым, генетически закодированы пространственное строение и биологическая функция белка. В то же время естественный отбор идет не по первичной, а по пространственной структуре — по биологическому поведению.

Различные мутационные замещения по-разному сказываются на строении белка. Из изложенного в § 4.6 следует, что мутации, сильно изменяющие гидрофобность аминокислотного остатка, должны сильнее сказываться на биологических свойствах белка, чем мутации, мало меняющие гидрофобность. Первый тип мутаций более опасен для существования вида, чем второй. Можно думать, что генетический код построен природой таким образом, чтобы обеспечить преимущество мутациям первого типа. Нужно выявить эти особенности кода.

Такая формулировка проблемы содержалась в работах [112], где было показано, что код обладает большой надежностью по отношению к неблагоприятным заменам полярных аминокислотных остатков на неполярные и наоборот. Между аминокислотами и кодонами имеется осмысленная корреляция (см. также [113]).

Прежде всего следует установить, какой характер имеют мутационные аминокислотные замещения. Мы уже видели, что внутренние аминокислотные остатки в гемоглобине и миоглобине варьируют, но остаются неполярными (см. стр. 232).

Марголиаш обратил внимание на постоянство расположения полярных (основных) и неполярных остатков в цитохроме *c* позвоночных пяти видов [114]. В связи с этим Марголиаш писал: «... является ли такое эволюционное постоянство следствием давления отбора на структурные особенности цитохрома или, хотя бы частично, результатом генетической изменчивости ... Это вопрос, на который сейчас нельзя ответить». Анализ кодового словаря дает искомый ответ [112, 115].

Уже отмечалось, что последовательность остатков вблизи активного центра гемоглобинов подчиняется той же закономерности. Большая часть природных мутантов гемоглобина человека характеризуется сохранением класса аминокислоты — чаще всего в мутантах полярная аминокислота заменяется на неполярную. И во многих других случаях большая часть мутаций такова, что класс аминокислоты сохраняется.

Наблюдаемая ситуация может иметь два объяснения. Во-первых, «неправильные» мутации, меняющие класс аминокислоты, могут быть настолько опасны для функции белка, что они элиминируются естественным отбором. Эти мутации летальны и поэтому не наблюдаются. Во-вторых, сам генетический код может быть устроен таким образом, что он обеспечивает преимущественно для правильных мутаций. Рассмотрим подробно вторую возможность.

Как мы видели (см. стр. 229), гидрофобность аминокислотного остатка может быть оценена, согласно Тенфорду, количественно — изменением свободной энергии  $\Delta F$  при переносе аминокислоты из  $C_2H_5OH$  в воду (см. табл. 4.11). Вычислим среднюю разность величин  $\Delta F$  при произвольном замещении любого остатка на любой — без учета различной встречаемости остатков, пользуясь данными табл. 4.11. По всем 20 аминокислотам  $\Delta\Delta F = 1280$  кал/моль. В пределах условно введенных первого и второго классов — гидрофобных аминокислот (первые 10) и гидрофильных аминокислот (вторые 10) средние разности равны 805 и 392 кал/моль соответственно.

Представим словарь кодонов, обозначаемых *xyz*, квадратной таблицей (рис. 9.13). На рисунке заштрихованы гидрофобные остатки. Характерно, что при *У* на втором месте кодона ( $y = Y$ ) остаток всегда гидрофобен. При замене одного из нуклеотидов в кодоне *xyz* получается следующее распределение «правильных» и «неправильных» мутаций:

	120 «правильных»	74 «правильных»	156 «правильных»
Замена <i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>	
	54 «неправильных»	102 «неправильных»	20 «неправильных»

Всего 350 (т. е. 66,5%) «правильных» замен и 176 (33,5%) «неправильных». Вероятность «правильной» мутации вдвое больше, чем вероятность «неправильной».

Вычислим средние разности  $\Delta F$  для однократных замещений нуклеотидов. Получаем (в кал/моль)

при замене  $x$  1000,  $y$  1280,  $z$  340.

В среднем по всем трем нуклеотидам имеем 870 кал/моль, что существенно меньше величины 1280 кал/моль для случайного замещения аминокислот.

Средняя разность степеней гидрофобности исходной и замещающей аминокислот для 70 мутанов человеческого гемоглобина составляет 834, средняя разность для шести цитохромов  $c$  (безпозвоночных и позвоночных) 900, средняя разность для мутантов триптофансинтетазы А [116] 1030 кал/моль. Процент «правильных» замещений в этих трех случаях соответственно равен 57,0%, 56,3% и 61,3%. Анализ 423 замещений при сопоставлении шести гомологичных белков различных видов (цитохром  $c$ , гемоглобина  $\alpha$  и  $\beta$ , инсулина А и В, ферредоксин [117]) дает среднее значение разности степеней гидрофобности, равное 772 кал/моль. Все эти данные удовлетворительно согласуются с кодовой таблицей.

Наиболее опасно замещение среднего нуклеотида  $y$ .

Оно приводит к наибольшим изменениям гидрофобности. Наименее опасно замещение  $z$ .

Эта закономерность выражает физический смысл кодового словаря. Преимущество «правильных» мутаций определяется пространственным строением белка в водном окружении и, тем самым, особыми физическими свойствами воды. Таким образом, корреляция кодонов с аминокислотами продиктована физикой воды. Код обладает высокой, хотя и не абсолютной, надежностью по отношению к «неправильным» мутациям.

Ичас указывает, что и слишком большая, и слишком малая частота мутаций эволюционно невыгодны, необходима промежуточная оптимальная частота [5]. Если мутабельность,

$x \backslash y$	A	Ц	Г	У	z
A	Лиз	Тре	Арг	Иле	A
	Асп	Тре	Сер	Иле	Ц
	Лиз	Тре	Арг	Мет	Г
	Асп	Тре	Сер	Иле	У
Ц	Глн	Про	Арг	Лей	A
	Гис	Про	Арг	Лей	Ц
	Глн	Про	Арг	Лей	Г
	Гис	Про	Арг	Лей	У
Г	Глу	Ала	Гли	Вал	A
	Асп	Ала	Гли	Вал	Ц
	Глу	Ала	Гли	Вал	Г
	Асп	Ала	Гли	Вал	У
У	—	Сер		Лей	A
	Тир	Сер	Цис	Фен	Ц
	—	Сер	Три	Лей	Г
	Тир	Сер	Цис	Фен	У

Рис. 9.13. Таблица генетического кода.

определяемая кодом, ниже оптимальной, то изложенная аргументация до некоторой степени обесценивается. Однако мы ничего еще не знаем об оптимальной мутабельности, и нет оснований думать, что код ей не соответствует. Указанная его помехоустойчивость является несомненным фактом.

Молекулярный механизм, определяющий корреляцию кодонов и аминокислот, заключен в ацилирующем ферменте, обеспечивающем присоединение надлежащей аминокислоты к надлежащей тРНК, т. е. корреляцию между антикодоном тРНК и аминокислотами.

По-видимому, фермент чувствителен как к аминокислоте, так и к структуре тРНК как целого. Мы еще очень мало об этом знаем. Не исключено, что фермент обладает аллостерическими свойствами (см. § 7.5).

Румер отметил, что 16 дублетов  $xy$  можно сгруппировать в два октета так, чтобы в первом октете содержались дублеты  $xy$ , которые однозначно, независимо от  $z$ , определяют кодируемый остаток, а во втором октете — дублеты  $xy$ , кодирующие одни остатки при  $z =$  пурин, а другие при  $z =$  пиримидин (табл. 9.6) ([118], ср. [119]).

Таблица 9.6

Система кодонов

Первый октет					Второй октет					
$z=A, Г, У, Ц$					$z=У, Ц$	$z=A, Г$				
$x$	$y$	остаток	группа	$n$	остаток	$x$	$y$	остаток	группа	$n$
Ц	Ц	Про	I	6	Фен	У	У	Лей { Иле $z=A$ Мет $z=Г$	I	4
Ц	У	Лей	I	5	Иле	А	У		I	4
Г	У	Вал	I	5	Цис	У	Г	{ — $z=A$ Три $z=Г$	II I	5
Ц	Г	Арг	II	6	Тир	У	А		—	I
Г	Ц	Ала	II	6	Гис	Ц	А	Гли	I II	5
А	Ц	Тре	II	5	Асп	А	А	Лиз	II I	4
У	Ц	Сер	II	5	Асп	Г	А	Глу	II	5
Г	Г	Гли	II	6	Сер	А	Г	Арг	II	5

Группа I — гидрофобные, II — гидрофильные остатки.

Дублеты  $xy$  первого и второго октета резко различаются по составу. В первом октете А встречается только один раз, во втором Ц присутствует один раз. В первом октете и для  $x$  и для  $y$   $\frac{Г+Ц}{А+У} = 3$ , во втором  $\frac{Г+Ц}{А+У} = \frac{1}{3}$ .

В последних столбцах левой и правой сторон таблицы приведены числа  $n$  водородных связей между нуклеотидами  $xу$  кодона и комплементарными нуклеотидами  $x'y'$  антикодона. Значения  $n$  (можно назвать эту величину степенью комплементарности) в первом октете равны 6 и 5, во втором — 5 и 4. Можно думать, что при  $n = 6$  взаимодействие  $z - z'$  кодона и антикодона не имеет существенного значения, так как связь  $xу - x'y'$  достаточно прочна и обеспечивает необходимую комплементарность. Поэтому кодоны первого октета «безразличны» к  $z$ . В этом случае возможны 16 сочетаний кодон — антикодон, при которых одна и та же аминокислота включается в белковую цепь и отвечает любым  $z$  и  $z'$  при фиксированных  $xу$  и, следовательно,  $x'y'$ . Если в первом октете  $n = 5$ , то возможно, что взаимодействие  $z - z'$  уже играет некоторую роль в обеспечении комплементарности, и число допустимых сочетаний кодон — антикодон может оказаться меньше 16, но больше 4. Из сказанного, конечно, не следует, что все мыслимые сочетания встречаются в природе. Было бы интересно экспериментально определить число различных антикодонов, т. е. различных тРНК, отвечающих данной аминокислоте, и, конечно, число соответствующих кодонов. Возможно, что опыт действительно покажет наличие большего числа антикодонов и кодонов для тех аминокислот первого октета, для которых  $n = 6$ , и меньшего их числа для  $n = 5$ . Мутационные замещения  $z$  в кодонах мРНК могут заметно отличаться по эффективности для  $n = 6$  и  $n = 5$ .

Таблица 9.7

## Образование пар третьим нуклеотидом антикодона

Нуклеотид антикодона $z'$	Нуклеотиды кодона, соединяющиеся с $z'$	Нуклеотид антикодона $z'$	Нуклеотиды кодона, соединяющиеся с $z'$
У	{ А Г	Г	{ У Ц
Ц	Г	И	{ У Ц
А	У		{ А

Во втором октете существен тип последнего нуклеотида — пурин это или пиримидин. При  $n = 5$  максимальное число сочетаний кодон — антикодон, отвечающее одной и той же аминокислоте, равно восьми (если  $z'$  не фиксировано). При  $n = 4$  связи  $z - z'$ , надо думать, фиксированы однозначно, и это число равно двум,

Крик охарактеризовал свойства третьего нуклеотида антикодона гипотезой «виляний» (wobbles) [120]. В то время как комплементарное спаривание кодон — антикодон по первым двум нуклеотидам антикодона  $x'y'$  стандартно и однозначно, нуклеотид  $z'$  связывается с  $z$  кодона неоднозначно. Анализ возможных структур образующихся пар приводит к результатам, суммированным в табл. 9.7.

$z \backslash y$	А	Ц	Г	У
А	Лиз	Тре ①	Арг	Иле
	Асн ②		Сер ②	Иле ②
	Лиз		Арг ②	Мет ②
	Асн		Сер	Иле
Ц	Гли	Про ①	Арг ①	Лей ①
	Гис ②			
	Гли ②			
	Гис			
Г	Глу	Ала ①	Гли ①	Вал ①
	Асп ②			
	Глу ②			
	Асп			
У	—	Сер ①	—	Лей
	Тир ②		Цис ②	Фен ②
	—		Три ②	Лей ②
	Тир		Цис	Фен

Рис. 9.14. Таблица дублетов.

Эти результаты подтверждаются опытом. Неоднозначность спаривания  $z - z'$  имеет структурное объяснение. Минорный нуклеотид, инозин И, фигурирующий в антикодоне, особенно полифункционален.

На рис. 9.14 представлена таблица дублетов  $xу$ , указывающая кодоны первого и второго октетов (1 и 2) и распределение гидрофобных аминокислот (штриховка).

Корреляция кодонов с аминокислотами имеет прямое отношение к эволюции кода. Если современный код оптимален по отношению к мутациям, нарушающим пространственную структуру

белка, то можно думать, что код возник в результате биохимической эволюции. Однако мы не располагаем пока серьезными аргументами в пользу оптимальности кода, за исключением его помехоустойчивости по отношению к неправильным мутациям.

Как отмечает Везе, существенны не столько ошибки в трансляции, сколько биологическая значимость этих ошибок [121]. Везе предполагает, что код примитивной клетки был весьма неоднозначен, различал не отдельные аминокислоты, но их «функциональные» или «нефункциональные» группы. В дальнейшем код совершенствовался таким образом, чтобы свести ошибки при трансляции и их влияние к минимуму. Имеется и ряд других спекулятивных соображений (см. [5, 7]). Крик подверг эти гипотезы критике, отметив невозможность их экспериментальной проверки [122]. Сегодня установлены важные особенности кода,

раскрыта осмысленная корреляция кодонов с аминокислотами, но о происхождении кода и его эволюции можно высказывать лишь более или менее обоснованные гипотетические соображения (ср. [57]).

### § 9.8. ТРАНСЛЯЦИЯ

Основные физические проблемы, связанные с синтезом белка на полисоме, состоят в определении механизмов точного узнавания кодоном антикодона, образования пептидной связи и перемещения рибосомы вдоль мРНК.

Узнавание кодоном антикодона весьма точно — ошибки составляют сотые доли процента [123]. Точное спаривание не может обеспечиваться термодинамическими факторами — разностями энергий различных пар. Исходя из квантовомеханических расчетов горизонтальных и вертикальных взаимодействий между триплетами кодона и антикодона, Нинио пришел к выводу о неизбежности большой неоднозначности узнавания [124]. Неоднозначность должна увеличиваться и за счет «виляний». Ошибочные антикодоны часто мало отличаются от правильных по энергии взаимодействия. Энергии взаимодействия ГУГ и ЦАЦ и ЦЦЦ разнятся лишь на 2,1 ккал/моль. Пытаясь преодолеть эту трудность, Нинио предложил гипотезу существования лишних триплетов — антикодоны, приводящие к большой неоднозначности (например, АЦГ, АЦЦ, ИЦЦ), просто не существуют.

Эта гипотеза противоречит общим представлениям молекулярной биофизики. Трансляция — не термодинамически равновесное состояние, но кинетический процесс, идущий с участием фермента, роль которого играет рибосома. В трансляции обеспечено и точное узнавание и оптимальный темп чтения мРНК. Поэтому существенна не только термодинамика, но и кинетика узнавания — разные антикодоны тРНК могут взаимодействовать с кодонами мРНК с различной скоростью, определяемой структурой и свойствами как молекул тРНК в целом, так и рибосом.

Везе предложил гипотетические модели узнавания, учитывающие свойства рибосом [125]. Узнавание не сводится к спариванию кодона с антикодоном. Кодон читается дважды — рибосомой и тРНК. Первое чтение приближительное, рибосома различает не все буквы кодона, но вследствие своих аллостерических свойств допускает взаимодействие лишь определенных тРНК с кодоном. Модель, тем самым, предполагает существование классов тРНК, различаемых рибосомой. Существенна не только структура антикодона, но и структура молекулы тРНК в целом. Предположительно существуют ключевые звенья тРНК, расположенные рядом с антикодоном.