

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.

Структуры тРНК подлежат физической классификации. Рибосома испытывает конформационное изменение под действием кодона. Опыт показывает, что состояние рибосомы сильно влияет на точность трансляции. Такое влияние оказывают мутации рибосомальных белков [126]. На определяющую роль конформаций рибосом указывают и исследования *in vitro* трансляции мРНК, содержащей галогенированные основания. При этом совершаются ошибки в чтении первого нуклеотида кодона [7].

Везе полагает, что тРНК также испытывает конформационное превращение при взаимодействии с рибосомой, а затем с мРНК и моделирует это превращение. Трансляция есть аллостерический процесс.

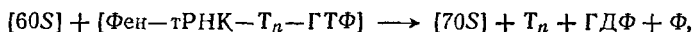
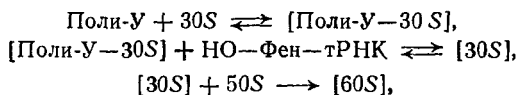
Экспериментально показано, что трансляция действительно зависит от конформации мРНК. В работе [127] РНК фага R 17 инкубировалась в присутствии  $Mg^{++}$ , а затем вводилась в качестве матрицы в бесклеточную систему *E. coli*. Инкорпорация Фен и Гис в белок и количество синтезируемого белка оказывались иными, чем в случае применения РНК, не инкубированной с  $Mg^{++}$ . Эти изменения нельзя объяснить деградацией РНК, так как они исчезают при надлежащей обработке РНК. В описанной ситуации происходит синтез трех белков. Последовательность их синтеза зависит от конформационного состояния РНК.

Спирин разработал наглядную модель работы рибосомы [87, 128]. Гипотеза исходит из того, что аминокислотный тРНК-связывающий участок и пептидил-тРНК-связывающий участок локализованы на двух разных субъединицах. Постулируется, что мРНК-связывающий и тРНК-связывающий участки локализованы на контактирующих внутренних поверхностях двух субъединиц и что 70S-рибосома периодически переходит из сомкнутого в разомкнутое состояние и обратно. При смыкании двух субъединиц сближаются пептидил-тРНК и аминокислотный тРНК и образуется пептидная связь, при размыкании происходит поступление нового комплекса аминокислот-тРНК в рибосому и выход из рибосомы деацилированной тРНК. Периодическое размыкание и смыкание субчастиц рибосомы есть приводной механизм, обеспечивающий все пространственные перемещения тРНК и мРНК в процессе трансляции [87]. Периодическое изменение четвертичной структуры рибосомы преобразуется в поступательное движение цепи мРНК (см. рис. 9.12). Смыкание субчастиц индуцируется поступлением в рибосому аминокислот-тРНК, размыкание тербует энергии расщепления ГТФ.

Гипотеза Спирина конкретизирует представление о конформационном изменении рибосомы и дает наглядное объяснение ряда фактов. Однако количественная физическая теория молекулярного механизма работы рибосом не построена. Для этого

пока нет данных — недостаточны сведения о структуре рибосом и тРНК, недостаточно изучена кинетика биосинтеза.

Эксперимент показывает, что активный рибосомный комплекс действительно испытывает при трансляции периодические конформационные изменения. Согласно работе [129] в синхронизованной системе, содержащей Поли-У, субъединицы рибосом *E. coli* и очищенные трансферные факторы, образование активного комплекса происходит в несколько этапов:



где [ ] — обозначают активную форму,  $T_n$  — трансферный фактор, Ф — фосфат. Превращения исследовались методом седиментации и электрофореза. Установлено, что активный комплекс проходит цикл сжатия и расширения при добавлении каждого комплекса аминоксил — тРНК. Связывание аминоксил — тРНК, катализируемое трансферным фактором  $T_n$ , создает стабильную компактную 70S-конформацию, трансляция при посредстве G-фактора расширяет рибосому, переводя ее в менее устойчивую 60S-форму. Образованию первой пептидной связи предшествует транслокация. Эти факты согласуются с моделью инициирования цепи без иницирующего фактора. Деацилированная Фен — тРНК, связанная рибосомой, вызывает транслокацию с участием G-фактора и ГТФ как только комплекс [60S] переходит в [70S]-форму вследствие связывания Фен — тРНК.

Гаврилова и Спирин показали, что рибосома может «работать» и без участия макроэргического вещества — ГТФ [130]. В той же работе установлено, что парахлормеркурибензоат (ПХМБ) активирует способность рибосом *E. coli* синтезировать полифенилаланин в присутствии Поли-У и Фен — тРНК в отсутствие белковых факторов трансляции и ГТФ. ПХМБ модифицирует 30S-субъединицу. Трансляция, как и в нормальном синтезе, подавляется некоторыми антибиотиками и SH-соединениями. По-видимому, способность к трансляции заложена в самой структурной организации рибосомы (см. также [131]). ПХМБ блокирует какую-то или какие-то SH-группы, вызывая структурные изменения, позволяющие рибосоме работать без каталитических факторов и ГТФ. Блокирование SH-группы раскрывает потенциальную способность рибосомы к «неэнзиматической» транслокации.

Кинетика синтеза белка на полисомах исследовалась в ряде работ. Время, необходимое для синтеза белковой цепи обычного размера (400 остатков), составляет около 30 сек. Рибосомы, синтезирующие белковые цепи, движутся вдоль мРНК от 5'-

к 3'-концу. Время  $\tau$  прохождения рибосомой среднего расстояния  $\delta$  между двумя рибосомами, равного, согласно данным седиментационного анализа и электронной микроскопии, 90 нуклеотидам, составляет примерно 3 сек, что отвечает линейной скорости порядка  $10^{-6}$  см/сек. Кинетика синтеза изучается по скорости включения меченой  $C^{14}$  аминокислоты в белковую цепь (см., например, [132]).

Кинетическая теория трансляционного синтеза на полисоме дана в работе [133]. Были получены кривые зависимости количества включенной аминокислоты от времени для полисом, содержащих разные количества рибосом. Теоретические кривые хорошо согласуются с опытными, полученными в работе [132]. Однако эта теория не учитывает деградации мРНК, происходящей под действием еще неизученной экзонуклеазы. Время жизни мРНК составляет примерно 40 сек.

В работах [134—136] развита теория, учитывающая деградацию мРНК. Следуем работе Сингха [135]. Предполагается, что рибосомы присоединяются к 5'-концу мРНК, экзонуклеаза действует так же, начиная с 5'-конца. Рибосома защищает конечный участок мРНК от деградации. При перемещении рибосомы 5'-конечный участок либо деградирует, либо присоединяет новую рибосому. Деградировавший конец уже не может присоединить рибосому, но ранее присоединенные рибосомы, находящиеся впереди, продолжают двигаться, синтезируя белок.

Для случайного процесса вероятность того, что 5'-конец существует время  $t$ , равна  $\exp(-kt)$ . Число молекул белка, синтезированных полисомами  $P_1, P_2, \dots, P_{n-1}$ , содержащими 1, 2, ...,  $(n-1)$  рибосом, за время  $(n-1)\tau$  составляет

$$(1 - \exp(-k)) + 2\exp(-k)(1 - \exp(-k)) + \dots \\ \dots + (n-1)\exp[-(n-2)k](1 - \exp(-k)). \quad (9.4)$$

В этом выражении время исчисляется в единицах  $\tau$ . Число молекул белка, синтезированных полисомой  $P_n$  за время  $t \rightarrow \infty$ , равно

$$\exp[-(n-1)k] + \exp(-nk) + \dots \rightarrow \infty + \\ + (n-1)(1 - \exp(-k))(\exp[-(n-1)k] + \\ + \exp(-nk) + \dots + \infty). \quad (9.5)$$

Суммируя (9.4) и (9.5), получаем полное число белковых молекул, синтезируемых на одной цепи мРНК за бесконечное время,

$$N = \frac{1}{1 - e^{-k}}. \quad (9.6)$$

Для стабильной мРНК  $k = 0$ ,  $N \rightarrow \infty$ , для весьма нестабильной  $k \rightarrow \infty$ ,  $N \rightarrow 1$ .

Сведения о деградации мРНК основываются на наблюдаемой скорости распада меченых цепей. Можно считать, что распад определяется случайной инактивацией 5'-конца мРНК, за которой следует ее ступенчатая деградация со скоростью, определяемой перемещением рибосомы. Если мечены цепи мРНК длиной  $(n-1)\delta$ , то число единиц длины  $\delta$ , уцелевших к моменту  $(n-1)\tau$ , равно

$$M_0 = (1 - \exp(-k)) [\exp(-k) + 2 \exp(-2k) + 3 \exp(-3k) + \dots + (n-2) \exp[-(n-2)k] + (n-1) \exp[-(n-1)k]] = \frac{\exp(-k)(1 - \exp[-(n-1)k])}{1 - \exp(-k)}. \quad (9,7)$$

Число единиц в любой последующей момент времени  $t$  равно

$$M_t = \frac{\exp[-(t+1)k](1 - \exp[-(n+t-1)k])}{1 - \exp(-k)},$$

и доля единиц длиной  $\delta$ , доживших до  $t$ , составляет

$$f = M_t/M_0 = \frac{\exp(-kt)(1 - \exp[-(n+t-1)k])}{1 - \exp[-(n-1)k]}. \quad (9,8)$$

При  $n \gg 1$  получим  $f = \exp(-kt)$ .

Реальная ситуация зависит от относительных скоростей транскрипции и трансляции. Согласно [137] первая происходит значительно быстрее. Напротив, Стент считает эти две скорости соизмеримыми [138]. Корреляция между длинами меченых мРНК и полисом, а также отсутствие свободных меченых мРНК свидетельствует в пользу второй возможности.

Теория позволяет, таким образом, вычислить распределение размеров мРНК. Седиментационный анализ меченых бактериальных мРНК дает широкую область радиоактивности от 4 до 30S с пиком от 8 до 12S. Теория Сингха предлагает сходное распределение.

В работе [136] детально проанализированы экспериментальные данные. Наблюдаемый седиментационный профиль быстромеченой бактериальной РНК не обязательно выражает распределение размеров интактной мРНК. Пик 8—12S зависит от скорости трансляции, времени жизни мРНК и продолжительности процесса внесения метки. Модель предсказывает, что положение пика сдвигается в сторону больших значений S с увеличением длительности этого процесса, пока не достигает стационарного значения, определяемого скоростью трансляции и временем жизни РНК. Теоретические кривые хорошо согласуются с экспериментальными.

Эта стохастическая теория не исчерпывает проблемы. Необходимо установить молекулярные механизмы работы рибосом, действия макроэргов (ГТФ), работы экзонуклеаз (дальнейшие подробности, относящиеся к механизму трансляции, см. в работе [14]).

### § 9.9. МУТАЦИИ

Изменения наследственной программы — мутации происходят либо спонтанно, либо под влиянием мощных внешних факторов: химических или радиационных воздействий, на хромосомы. Видимые под микроскопом хромосомные мутации, т. е. перестройки хромосом, означают изменение надмолекулярных структур, точечные или генные мутации в ДНК означают изменение молекулярной первичной структуры.

Вопросы мутагенеза уже не раз затрагивались в предыдущем изложении.

Сейчас изучен ряд мутационно измененных белков, в частности мутанты белка ВТМ, щелочной фосфатазы *E. coli*, триптофансинтетазы *E. coli* и т. д. [107]. В ряде случаев удалось установить прямую корреляцию между изменениями нуклеотидов и соответствующими изменениями аминокислотных остатков. Разумно различать три типа точечных мутаций: а) мутации, изменяющие смысл кодона (missense mutations) и вызывающие поэтому замену аминокислотного остатка в белке, б) мутации, превращающие осмысленный кодон в бессмысленный УАА, УАГ, УГА (nonsense mutations) и обрывающие белковую цепь; в) делеции и включения, т. е. мутации сдвига рамки (см. стр. 557).

Спонтанные генные мутации определяются ошибками, возникающими вследствие теплового движения атомов и молекул при редупликации ДНК. Очевидно, что ошибки при транскрипции и трансляции не наследуются.

Редупликация ДНК — стохастический процесс, в котором не могут быть полностью исключены шумы.

Включение некомплементарного матричному нуклеотида или делеция приводит, по-видимому, к образованию петли (см. стр. 499). В последующих поколениях вследствие полуконсервативного синтеза петля исчезает, но первичная структура ДНК остается измененной. Главная трудность при физико-химической трактовке таких ошибок связана с необходимостью выявить относительную роль термодинамических и кинетических факторов.

Из элементарных соображений следует, что замена пары А — Т на Г — Ц термодинамически выгодна. Можно рассчитать термодинамическую вероятность такой замены [139]. Если бы все сводилось к термодинамике, то в ходе эволюции должно было бы увеличиваться относительное содержание Г — Ц в ДНК.