

ных пар, что и является одной из важнейших причин возникновения мутаций.

Изучение ассоциации олигонуклеотидов показало, что наиболее благоприятно для биологической функции спаривание триплетов. Дублеты обладают слишком низкими значениями K , квартеты дают, напротив, слишком сильное связывание. Время жизни пары кодон — антикодон не должно превышать нескольких миллисекунд, так как в противном случае оно будет лимитировать скорость работы биосинтетической системы.

Таким образом, сложная игра слабых сил приводит к образованию сильных химических пептидных связей. Образование химических связей и механические процессы — перемещение фермента РНК-полимеразы вдоль цепи ДНК (см. § 8.3), работа рибосомы и ее перемещение вдоль цепи мРНК (см. § 8.5) требуют затраты энергии. Источниками энергии для этих процессов служат макроэргические нуклеозидтрифосфаты АТФ и ГТФ.

Далее стадии биосинтеза белка и их участники рассматриваются более подробно.

§ 8.3. Транскрипция и обратная транскрипция

Транскрипция текста ДНК в текст РНК, т. е. синтез РНК на матрице ДНК, происходит с помощью РНК-полимеразы. Транскрибируется текст лишь одной из двух цепей, образующих двойную спираль ДНК. РНК-полимераза имеет сложную структуру. Этот фермент выполняет ряд функций: узнавание начального локуса синтеза и специфическое связывание ДНК в этом локусе, инициацию синтеза РНК, синтез РНК, терминацию синтезируемой цепи и уход фермента с матрицы.

При малых ионных силах РНК-полимераза — димер с м. м. около 10^6 и константой седиментации 23 S. При ионных силах, больших 0,1 M, фермент обратимо распадается на два мономера 13 S. Мономер 13 S состоит из четырех субъединиц: β (м. м. 15 000), β' (165 000), двух α (по 40 000) и σ -фактора (80 000). Сложное строение полимеразы связано с многообразием функций этого фермента.

РНК-полимераза более активна с двуспиральной, чем с однонитчатой ДНК. Транскрипция *in vivo* происходит с двуспиральной ДНК, хотя, как уже сказано, «считывается» одна цепь. Соответственно в точке роста цепи РНК происходит локальное расплетание двойной спирали. С помощью формальдегидного метода, позволяющего обнаруживать дефекты в двойной спирали ДНК, действительно было обнаружено ее расплетание при взаимодействии с ферментом. Скорости синтеза РНК *in vivo* и в оптимальных условиях *in vitro* близки и составляют 20—30 нуклеотидов в секунду.

Таким образом, при транскрипции происходит конформационное превращение ДНК — расплетание. РНК-полимераза располагается на ДНК очень редко и эти превращения захватывают лишь малую часть длинной двойной спирали. Можно, однако,

изучать конформационные свойства комплексов РНК-полимеразы с малыми отрезками ДНК. Такие комплексы получаются при обработке комплекса ДНК с полимеразой ферментом ДНК-азой.

Флорентьев и Иванов предложили модель действия РНК-полимеразы (1970). При росте цепи РНК происходит связывание 3'-гидроксила рибозы с 5'-фосфатом атакующего нуклеотида

Предполагается, что при расплетании ДНК и возникновении гибридной двойной спирали ДНК — РНК матрица ДНК функционирует не в обычной В-форме, а в А-форме. При каждом шаге транскрипции новое основание «извлекается» из матрицы ДНК и дезоксирибонуклеотид, комплементарный рибонуклеотид которого лишился пирофосфата, поворачивается назад в ДНК с восстановлением водородных связей. Ось гибридной двойной спирали движется вдоль двойной спирали ДНК винтовым способом с одновременным перемещением фермента. На рис. 8.6 показана схема двуспиральной ДНК и растущего конца РНК при действии РНК-полимеразы. Энергетика транскрипции сводится к сопряжению экзергонических и эндергонических стадий. В сущности речь идет об ЭКВ — о взаимодействии химических и конформационных степеней свободы. Модель согласуется с экспериментальными данными.

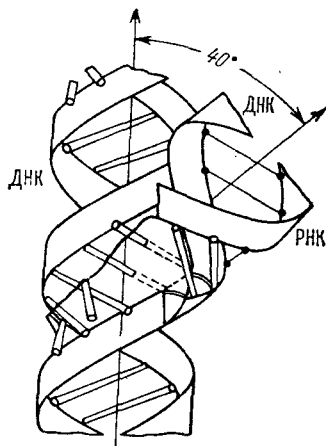


Рис. 8.6. Структура двуспиральной матрицы ДНК и растущего конца РНК при действии РНК-полимеразы

РНК-направляемый синтез ДНК или обратная транскрипция, открытая как один из этапов размножения РНК-содержащих онкодеродных вирусов (см. с. 263), имеет большое значение для молекулярной биологии и молекулярной биофизики. Обратная транскрипция также происходит с неизменным участием фермента, названного Энгельгардтом *ревертазой*. Ревертаза обладает тремя функциями: ДНК-полимеразной, обеспечивающей синтез однонитчатой комплементарной ДНК (кДНК) на матрице РНК, полимеразной функцией, обеспечивающей синтез второй нити ДНК, *анти*ДНК, образующей с кДНК двойную спираль, и рибонуклеозидной активностью, гидролизующей РНК в двойной спирали РНК — ДНК. Ревертаза осуществляет свои функции с любыми РНК.

Структуры ревертаз — белков значительного размера — пока не установлены. Нативная ревертаза онкорнавирусов птиц имеет константу седиментации 7,5 S. Ревертазы обладают четвертичной структурой.

И ДНК-полимеразы, и РНК-полимеразы, и ревертазы обязательно содержат ионы Zn^{++} в качестве кофакторов. Это лишний

раз свидетельствует о важности бионеорганической химии для биологии.

Важная проблема молекулярной биологии и молекулярной биофизики состояла в «чтении текстов» нуклеиновых кислот. Решение этой проблемы сыграло существенную роль в возникновении *генной инженерии* — в практических применениях науки о генах. Задача генной инженерии — искусственное перераспределение генов и построение новых генов с целью создания новых белковых веществ и организмов, с целью получения нужных для медицины и сельского хозяйства белков в удобных для производства системах, таких, например, как культуры *E. coli*.

В начале 50-х годов Ледерберг открыл *плазмиды* — относительно малые циклические молекулы ДНК, содержащиеся в большинстве бактерий. Плазмиды существуют независимо от хромосомы бактериальной клетки и размножаются при делении клеток. Бактерии могут обмениваться плазмидами. Разработана

техника извлечения плазмид из бактерий, интродукции в плазмиды чужеродной ДНК. Если примешать такие гибридные плазмиды к бактериальным клеткам, то они смогут хотя бы частично в этих клетках размножаться и производить в них чужеродные белки.

Получение гибридных плазмид, содержащих любые фрагменты ДНК, основывается на применении *рестриктаз* — ферментов, узнающих короткие последовательности ДНК и разрезающих молекулы ДНК в соответствующих местах. Гибридные плазмиды клонируют — размножают — вместе с бактериями, в которые они введены.

Такими методами были созданы культуры непатогенных бактерий *E. coli*, в которых синтезируются гормоны животных и человека — инсулин и другие, а также интерферон. Возможности генной инженерии чрезвычайно велики. Однако они не могли бы быть реализованы без прочтения текстов ДНК, без установления первичной структуры.

Мы уже упоминали о методе гель-электрофореза (с. 33). Молекулы ДНК, несущие отрицательные заряды на фосфатных группах, перемещаются в электрическом поле на разные расстояния в зависимости от своих размеров. С помощью рестриктаз ДНК делится на ряд фрагментов, которые разделяются посред-

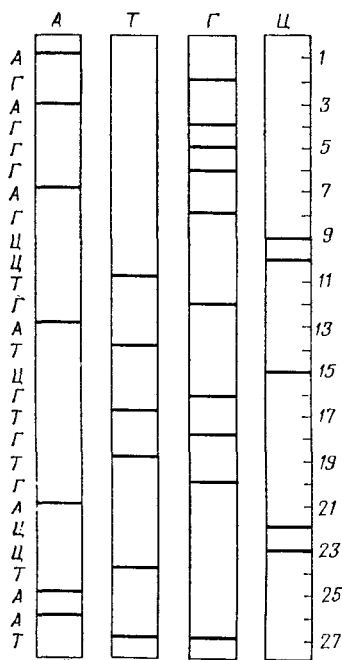


Рис. 8.7. Схема метода Максама — Гилберта

ством гель-электрофореза. Установление последовательности нуклеотидов производится по методу Максама и Гилберта (1977), идея которого была предложена еще в 1972 г. Свердловым.

Допустим, что выделенный образец ДНК содержит тождественные одонитевые фрагменты. «Начала» этих фрагментов метят, пришивая к ним ^{32}P . Другой конец цепи не несет метки. Образец делят на четыре части. К первой из них добавляют вещество, рвущее нить вблизи аденина (А) с тем расчетом, чтобы в среднем в каждом фрагменте происходил один разрыв. Возникают уменьшенные субфрагменты разной длины, в том числе несущие метки ^{32}P . Таким же способом определяют субфрагменты разрывами цепи вблизи Т, Г и Ц. Полученные четыре образца разделяют параллельно методом гель-электрофореза. После этого на гель накладывается фотопластинка, на которой отпечатываются те полоски в геле, которые несут радиоактивную метку. Схематически полученный результат показан на рис. 8.7. Последовательность непосредственно читается по электрофореграмме. В одном опыте удается прочесть текет длиной до 500 нуклеотидов.

§ 8.4. Транспортные РНК

Транспортные РНК (тРНК) составляют около 10% общего количества РНК в клетке. Именно с тРНК началось исследование первичной структуры нуклеиновых кислот (Холли, Баев). Сейчас известны первичные структуры около 100 молекул тРНК различного происхождения. Имеется 20 семейств тРНК в соответствии с 20-ю аминокислотами.

Вторичная структура различных тРНК в принципе однотипна. Очевидно, что это должно быть так для выполнения молекулами тРНК их функции — узнавания кодона мРНК в рибосоме и включения аминокислоты в белковую цепь. Лишь иницирующая метиониновая тРНК имеет несколько иное строение.

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 (с. 230). Тогда все известные тРНК могут быть изображены схемой «клеверного листа» с четырьмя или пятью двуспиральными участками (рис. 8.8).

Четыре участка являются постоянными, пятый, обычно наименьший, меняется. «Клеверный лист» изображает проекцию на плоскость молекулы тРНК и передает лишь ее топологию, т. е. расположение двуспиральных участков.

Задача нахождения вторичной структуры РНК по последовательности нуклеотидов решалась Тумаяном (1966). Алгоритм включает два этапа. Во-первых, строится треугольная матрица всех возможных пар по простому правилу: элемент a_{ij} , находящийся на пересечении i -го столбца и j -й строки, равен 1 или 0, если i -й и j -й нуклеотиды соответственно комплементарны или