

Смыкание рибосомы индуцируется поступлением в рибосому аминоксил-тРНК, размыкание требует энергии ГТФ. Гаврилова и Спирин показали, однако, что рибосома может работать *in vitro* и без ГТФ. По-видимому, способность к такой *неэнзиматической трансляции* заложена в самой структурной организации рибосомы.

Количественная физическая теория всех этих событий пока не построена. Экспериментально показано, что трансляция зависит от конформации мРНК и что активный рибосомный комплекс действительно испытывает при трансляции периодические конформационные изменения.

Как уже говорилось, одна цепь мРНК сочетается с рядом рибосом, образуя полисому. Размеры полисом зависят от длины цепей мРНК. Одна рибосома приходится примерно на 80—90 нуклеотидов цепи. При синтезе белков, содержащих примерно 150 аминокислотных остатков, в полисоме имеется 4—6 рибосом, при синтезе более длинных белковых цепей — 12—20 и более рибосом. Одна цепь мРНК обеспечивает, таким образом, синтез ряда белковых цепей. Матричная РНК в дальнейшем деградирует под действием фермента *экзонуклеазы*, еще недостаточно изученного. Рибосома, присоединяясь к 5'-концу мРНК, защищает его от деградации. При перемещении рибосомы 5'-конечный участок либо деградирует, либо присоединяет новую рибосому. Деградировавший конец уже не может присоединять рибосому, но ранее присоединенные рибосомы продолжают двигаться, синтезируя белковые цепи. Время, необходимое для синтеза цепи, содержащей 400 остатков, составляет примерно 30 с. Время  $\tau$  прохождения рибосомой среднего расстояния  $\delta$  между двумя рибосомами в полисоме составляет около 3 с, что отвечает линейной скорости порядка  $10^{-6}$  м/с.

Математическая модель, описывающая эти процессы, позволяет вычислить распределение размеров мРНК в согласии с опытом.

В целом биосинтез белка определяется скоростями транскрипции и трансляции. По-видимому, эти скорости соизмеримы, так как при мечении мРНК радиоактивными атомами наблюдается корреляция между длинами меченых мРНК и полисом и свободные меченые мРНК отсутствуют.

## § 8.6. Расшифровка генетического кода и его смысл

Прямой путь к решению проблемы был проложен Ниренбергом и Маттеи (1961). При введении синтетических полирибонуклеотидов в бесклеточную систему аминокислоты включаются в полипептидную цепь. Бесклеточная система содержала рибосомы, набор тРНК, АТФ, все необходимые ферменты, но не содержала ДНК и мРНК. Система приготовлялась из разрушенных клеток *E. coli*. Центрифугированием выделялись рибосомная и надосадочная фракции. Рибосомы отмывались, надосадочная

жидкость, содержащая ферменты и тРНК, диализовалась против специального буфера. К смеси этих двух очищенных фракций добавлялась система, генерирующая АТФ — источник энергии. В бесклеточную систему вводились синтетические полирибонуклеотиды и изучалось включение меченных  $^{14}\text{C}$  аминокислот во фракцию, нерастворимую в трихлоруксусной кислоте, т. е. в полипептиды. Оказалось возможным «обмануть» биологическую систему — вместо природной мРНК рибосомы взаимодействовали

Т а б л и ц а 8.3. Кодирование триплетов, полученные на основании опытов с поли-АУ (1 : 5)

Аминокислотный остаток	Вычисленные доли триплетов				Сумма долей	Включение аминокислоты
	3А	2А1У	1А2У	3У		
Асн	—	4	—	—	4	6,6
Иле	—	4	20	—	24	20
Лей	—	—	20	—	20	15
Лиз	0,8	4	—	—	4,8	3,1
Тир	—	—	20	—	20	25
Фен	—	—	—	100	100	100

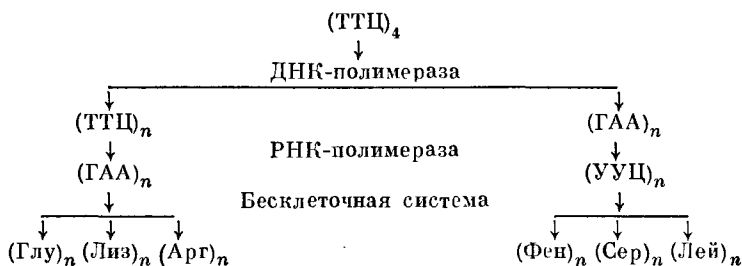
с синтетическим полирибонуклеотидом. Оказалось, что цепь поли-У стимулирует поликонденсацию фенилаланина, а поли-Ц — пролина.

Так были установлены первые кодоны. Если код триплетен, то Фен отвечает кодон УУУ, а Про — кодон ЦЦЦ. Далее изучалось действие сополимеров известного состава, но со случайной последовательностью нуклеотидов. В таком сополимере известна частота появления триплетов определенного состава. Сополимер АУ в пропорции 1 : 5 стимулирует включение в полипептидную цепь Фен, Лей, Иле и в меньших количествах Асн и Лиз. Если 100 — доля триплета 3У, то доля 1А2У — 20 ( $3У/1А2У = 5$ ), доля 2А1У — 4 ( $3У/2А1У = 25$ ) и 3А — 0,8 ( $3У/3А = 125$ ). Сравнивая эти значения со степенями включения (для Фен она принимается равной 100), можно установить состав кодонов для названных аминокислотных остатков (табл. 8.3).

Так были установлены триплеты 3У для Фен, 1А2У для Тир, 2А1У и 1А2У для Иле, 1А2У для Лей, 2А1У для Асн и 3А и 2А1У для Лиз. В дальнейшем последний триплет оказался не кодирующим Лиз, остальные подтвердились.

Однако такие опыты еще не дают полной расшифровки кода. Остается неизвестным, какой из трех кодонов АУУ, УАУ или УУА кодирует Тир и т. п. В последующих опытах Ниренберг применил уже не полинуклеотиды, а тринуклеотиды известного строения. В системах образуются комплексы тринуклеотид — тРНК — аминокислота (аминоацил). Синтез полипептида при этом не идет, но, поскольку тринуклеотид имитирует кодон, образование комплекса позволяет его прочесть. Для этого нужно изучить все тРНК, которые последовательно связываются с ме-

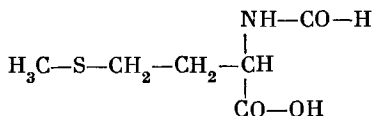
ченными аминокислотами. Так были исследованы все 64 триплета и установлено, с какими аминокислотами они связаны. Окончательную расшифровку, подтвердившую эти результаты, провел Корана (1966). Он синтезировал олигодезоксирибонуклеотиды, представлявшие собой повторяющиеся триплеты известного строения (например,  $(ТТЦ)_4$ ). Далее такой олигомер применялся в качестве матрицы для синтеза *in vitro* ДНК-подобного полимера в системе, содержащей нуклеозидтрифосфаты Т, Ц, Г, А, ДНК-полимеразу и нужные ионы (ср. с. 249). При этом синтезировалась ДНК-подобная двойная спираль. Обе цепи спирали содержали комплементарные, повторяющиеся  $n$  раз триплеты. Затем каждая из цепей служила матрицей для транскрипции — для синтеза полирибонуклеотида с помощью РНК-полимеразы. Таким образом, Корана получил две цепи, имитирующие мРНК с известной последовательностью повторяющихся триплетов. Обе цепи вводились в бесклеточную систему и определялось включение аминокислоты в полипептидную фракцию по методу Ниренберга. Эти красивые опыты позволили проверить шесть кодонов в одном многостадийном синтезе в соответствии со схемой



Полимер  $(ГАА)_n$  содержит кодоны ГАА, ААГ и АГА, а полимер  $(УУЦ)_n$  — кодоны УУЦ, УЦУ и ЦУУ. Так как функциональность гомополимеров  $(ААА)_n$ ,  $(ЦЦЦ)_n$ ,  $(ГГГ)_n$  и  $(УУУ)_n$  уже определена, для проверки остальных 60 кодонов нужно провести 10 таких многостадийных опытов.

Установленный этими методами генетический код показан на рис. 8.14. Каждый кодон РНК обозначен как *xuz*.

Кодоны ГУГ (Вал) и АУГ (Мет) кодируют указанные аминокислотные остатки в середине белковой цепи. Вместе с тем они служат инициаторами синтеза цепи, кодируя на ее N-конце формилметионин



Если искусственная матрица этих кодонов не содержит, то синтезируются цепи, начинающиеся с произвольного звена и имеющие поэтому различные N-концы. Напротив, при наличии

ГУГ или АУГ образуются стандартные Ф-Мет-концы. Однако в природных белках Ф-Мет не содержится. В бесклеточной системе *E. coli* образуются цепи с N-концами Ф-Мет-Ала, Ф-Мет-Сер, но не Ф-Мет-Мет. Естественные белки *E. coli* имеют обычно

x \ y	А	Ц	Г	У	z
А	Лиз Асп Лиз Асп	Тре	Арг Сер Арг Сер	Иле Иле Мет Иле	А Ц Г У
Ц	Гли Гис Гли Гис	Про	Арг	Лей	А Ц Г У
Г	Глу Асп Глу Асп	Ала	Гли	Вал	А Ц Г У
У	— Тир — Тир	Сер	— Цис Тро Цис	Лей Фен Лей Фен	А Ц Г У

Рис. 8.14. Таблица генетического кода

на N-концах Мет, Ала, Сер. Можно думать, что в живых системах действуют два фермента — один из них отщепляет Ф-Мет от цепи, другой — формильную группу от Мет.

Кодовы УАА, УАГ, УГА — терминальные. Они ответственны за обрыв белковой цепи и никаких аминокислотных остатков не кодируют.

Генетический код универсален. Одинаковые кодоны действуют аналогичным образом в различных организмах. Универсальность кода непосредственно доказывается размножением фагов и вирусов в клетках. Вирусная ДНК или РНК использует биосинтетический аппарат клетки и синтезирует свои белки. В то же время установлено, что поли-У стимулирует включение Фен в бесклеточных системах, приготовленных как из клеток млекопитающих, так и водорослей. То же относится и к другим синтетическим полинуклеотидам. Тринуклеотидная техника Ниренберга была применена к бесклеточным системам, полученным из клеток лягушки *Xenopus laevis* и морской свинки, и привела к одинаковым результатам.

Отклонения от универсальности кода, как об этом уже говорилось на с. 262, наблюдаются в митохондриях. У митохондрий человека АУА кодирует не Иле, а Мет, кодон УГА — не обрыв цепи, а Троп, кодоны АГА и АГГ — терминирующие. Кодовая таблица оказывается более симметричной в соответствии с предсказанием Ичаса (1969). У митохондрий дрожжей УГА — Троп; ЦУА, ЦУЦ, ЦУГ, ЦУУ — не Лей, а Тре, АГА, АГТ — терминирующие. Вырождение для Тре достигло восьми кодонов.

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

Установление кода выдвинуло новые проблемы. Имеет ли генетический код физический, молекулярный смысл или корреляция между кодонами и аминокислотами случайна? Что можно сказать в этой связи о происхождении и эволюции кода? Как связаны точечные мутации с особенностями кодовой таблицы? Какие факторы влияют на чтение кода, на процессы транскрипции и трансляции? Ответы — далеко не полные — на эти вопросы содержатся в дальнейшем изложении. Здесь мы остановимся на физическом смысле кода.

Прежде всего следует обратить внимание на характер вырождения кодонов (рис. 8.14). Для 32-х, т. е. для половины всех кодонов, имеется полное вырождение по третьему нуклеотиду  $z$ . Иными словами, аминокислота полностью задана двумя первыми нуклеотидами  $x$  и  $y$  и не зависит от нуклеотида  $z$ . Для двукратно вырожденных кодонов характер аминокислоты различен для  $z = A, G$  (пурин) и для  $z = C, U$  (пиримидин).

Шестнадцать дублетов  $xy$  можно сгруппировать по восемь так, чтобы в первом октете содержались дублеты  $xy$ , кодирующие аминокислотный остаток независимо от  $z$ , а во втором октете — остальные дублеты (Румер). Это показано в табл. 8.4.

Т а б л и ц а 8.4. Система кодонов

Первый октет				Второй октет				
$x$	$y$	$n$	Остаток	$x$	$y$	$n$	Остаток	Остаток
			( $z = A, G, U, C$ )				( $z = A, G$ )	( $z = U, C$ )
Г	Г	6	Гли	Г	А	5	Глу	Асп
Г	Ц	6	Ала	А	Г	5	Арг	Сер
Ц	Г	6	Арг	У	Г	5	Терм ( $z = A$ )	Цис
							Трип ( $z = G$ )	
Ц	Ц	6	Про	Ц	А	5	Гли	Гис
Ц	У	5	Лей	А	А	4	Лиз	Асп
Г	У	5	Вал	А	У	4	Иле ( $z = A$ )	Иле
							Мет ( $z = G$ )	
А	Ц	5	Тре	У	А	4	Терм	Тир
У	Ц	5	Сер	У	У	4	Лей	Фен

В столбцах  $n$  указаны числа водородных связей между нуклеотидами  $xy$  кодона и комплементарными им нуклеотидами  $x'y'$  антикодона. Дублеты  $xy$  первого и второго октетов резко различаются по составу. В первом октете А встречается лишь один раз, во втором — один раз — Ц. В первом октете и для  $x$ , и для  $y$   $(G + C)/(A + U) = 3$ , во втором —  $(G + C)/(A + U) = 1/3$ . Значение  $n$ , которое можно назвать степенью комплементарности,

в первом октете 6 и 5 ( $\bar{n} = 5,5$ ), во втором — 5 и 4 ( $\bar{n} = 4,5$ ). Можно думать, что чем выше  $n$ , тем меньшее значение имеет взаимодействие  $z - z'$ -кодона с антикодоном, так как связь  $xy - x'y'$  достаточно прочна.

Вырождение по  $z$  в первом октете связано с так называемыми «виляниями» (wobbles) взаимодействия  $z - z'$  (Крик). Это взаимодействие, в отличие от  $xy - x'y'$ , неоднозначно, как о том свидетельствует табл. 8.5.

Т а б л и ц а 8.5. Узнавание пар третьим нуклеотидом антикодона

$z'$	А	У	Г	Ц	И
$z$	А	А, Г	Ц, У	Г	А, Ц, У

И — минорный нуклеотид пнозин.

Генетически кодируется первичная структура белка, а биологически функционально — пространственное строение глобулы. Мутационные замещения нуклеотидов матрицы по-разному сказываются на функциональности белка. Мы видели, что гидрофобность аминокислотного остатка имеет важнейшее значение для структуры глобулы (см. § 4.5). Соответственно мутации, сильно изменяющие гидрофобность остатка, должны сильнее сказываться на биологических свойствах белка, чем мутации, мало меняющие гидрофобность. Первый тип мутаций более опасен для существования особи и вида, чем второй. Можно думать, что эволюция, приведшая к современному коду, шла в направлении возрастающей его *надежности* в смысле уменьшения доли более опасных мутаций. Убедимся в надежности кода.

Рассмотрим табл. 4.5 (с. 108), в которой приведены гидрофобности аминокислот. Средняя разность этих значений при произвольном замещении одной аминокислоты на другую равна 5370 Дж/моль. В пределах условно введенных первого и второго классов аминокислот — гидрофобных (первые 10) и гидрофильных (вторые 10 аминокислот) — средние разности равны 3370 и 1640 Дж/моль соответственно.

Класс аминокислоты в первую очередь зависит от второго нуклеотида  $y$  в кодоне  $xyz$ . При  $y = У$  остаток всегда гидрофобен (Иде, Мет, Лей, Вал, Фен). Назовем мутации, не меняющие класса остатка, правильными, меняющие класс — неправильными. Вторые более опасны для структуры белка. При замене одного из нуклеотидов в кодоне  $xyz$  получается следующее распределение правильных и неправильных мутаций:

Замена $x$	120 правильных	74 правильных	156 правильных
	54 неправильных	102 неправильных	20 неправильных.

Всего 350 (66,5%) правильных замен и 176 (33,5%) неправильных. К правильным заменам относятся и «тихие мутации», т. е. те случаи, в которых замена нуклеотида не сопровождается заменой остатка вследствие вырождения кода. Код устроен так, что вероятность правильной мутации вдвое больше неправильной.

Вычислим средние разности гидрофобностей остатков, отвечающие однократным замещениям нуклеотидов. Получаем

при замене  $x$  4200,  $y$  5370,  $z$  1420 Дж/моль

и в среднем по всем трем нуклеотидам 3660 Дж/моль, что заметно меньше значения 5370 Дж/моль при случайном замещении аминокислот. Опыт дает среднюю разность гидрофобностей исходной и замещающей аминокислот для 70 мутантов гемоглобина человека 3500, для 6 цитохромов  $c$  — 3780 Дж/моль и т. д. Анализ 423 замещений при сопоставлении шести гомологичных белков различных видов (цитохром  $c$ , гемоглобины  $\alpha$  и  $\beta$ , инсулины  $A$  и  $B$ ) дает среднюю разность гидрофобностей 3240 Дж/моль.

Таким образом, код обладает высокой, хотя и не абсолютной, надежностью по отношению к правильным мутациям, обеспечивая их большую вероятность. Преимущество правильных мутаций определяется пространственным строением белка в водном окружении и, тем самым, особыми физическими свойствами воды. Корреляция кодонов с аминокислотами оказывается продиктованной физикой воды.

## § 8.7. Мутации

Мутации происходят либо спонтанно, либо под влиянием мощных внешних факторов — химических или радиационных воздействий на хромосомы и гены. Следует различать *хромосомные мутации* — перестройки хромосом, наблюдаемые под микроскопом, и *точечные*, или генные, *мутации*. Первые представляют собой изменения надмолекулярных структур, вторые — изменения последовательности нуклеотидов в ДНК и, соответственно, в мРНК. Здесь мы остановимся на точечных мутациях.

Существуют четыре типа точечных мутаций.

а) Мутации, состоящие в заменах нуклеотидов в кодонах, меняющие смысл кодона, т. е. кодируемый аминокислотный остаток в белке (*missense mutations*).

б) Такие же замены, переводящие кодон в совместно с ним вырожденный, т. е. не меняющие аминокислотный остаток в белке. Эти «тихие мутации» (*silent mutations*) фенотипически не проявляются, но имеют весьма важное значение для эволюции (см. далее, § 17.9).

в) Мутации, превращающие осмысленный кодон в *терминальный* UAA, UAG, UGA (*nonsense mutations*). Эти мутации, приводящие к обрыву белковой цепи, особенно опасны.