

А.С. Спирин

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

Структура рибосомы и биосинтез белка

Допущено
Министерством высшего и среднего
специального образования СССР
в качестве учебника для студентов
биологических специальностей
высших учебных заведений



Москва

«Высшая школа» 1986

ББК 28.070

С 72

УДК 576.8

Рецензенты:

- кафедра биохимии Киевского государственного университета
им. Т. Г. Шевченко (зав. кафедрой проф. Н. Е. Кучеренко);
и филиал кафедры биохимии при Институте молекулярной биологии
и генетики АН УССР (зав. филиалом кафедры биохимии,
акад. АН УССР, проф. Г. Х. Мацука);
акад. Д. Г. Кнорре (зав. кафедрой молекулярной биологии
Новосибирского государственного университета
им. Ленинского комсомола)

Спирин А. С.

С72 Молекулярная биология: Структура рибосомы и биосинтез
белка: Учеб. для студентов биол. спец. вузов. — М.: Высш. шк.,
1986. — 303 с.: ил.

В учебнике освещается современное состояние проблемы биосинтеза белка. Изложены сведения о структуре рибосомы, рибонуклеиновых кислотах, обеспечивающих ее функционирование, рибосомных белках, рассмотрены механизмы трансляции и ее регуляции.

С $\frac{2001040000-462}{001(01)-86}$ 19—86

ББК 28.070

57А

Предисловие

Молекулярная биология занимает особое место в развитии науки второй половины XX в. Именно ее рождение и последующий бурный рост выдвинули биологию в целом в ряды самых передовых и популярных наук, а XX в. стали иногда называть «веком биологии». Возникнув как отрасль биохимии, молекулярная биология получила мощное развитие благодаря внедрению в нее идей и методов генетики и физики. Открытый и сформулированный в 1953 г. принцип комплементарности в нуклеиновых кислотах, объяснив особенности структуры этих макромолекулярных соединений и обладая предсказательной силой в отношении их функций, лег в основу нового направления науки. Огромное научное и методологическое значение молекулярной биологии состояло в том, что наиболее фундаментальное и таинственное свойство живой материи — воспроизведение себе подобного — оказалось возможным объяснить на молекулярном уровне. Молекулярная **структура** вещества, в котором записана (закодирована) генетическая информация, механизмы **воспроизведения** генетической информации в поколениях клеток и организмов и механизмы **реализации** генетической информации через биосинтез белков — вот три направления, по которым развивалась эта наука и где были сделаны решающие успехи. Кроме того, структура и механизмы функционирования белков стали также предметом молекулярной биологии.

Становление и развитие молекулярной биологии имело большие последствия. Прежде всего, ее грандиозные достижения и стремительность роста привлекли внимание всего человечества к биологии и биологическим проблемам. Далее, по своему существу, все достижения молекулярной биологии явились полным торжеством материалистического мировоззрения. Молекулярная

биология, сама будучи чисто фундаментальной наукой, привела к возникновению многообещающей прикладной отрасли — геной инженерии.

В Советском Союзе молекулярная биология имела свою предысторию с серьезными научными заделами и традициями. Первые конкретные идеи о матричном механизме воспроизведения макромолекулярных хромосомных структур как носителей наследственности были высказаны еще в 1928 г. Н. К. Кольцовым. В 1934 г. в Московском государственном университете им. М. В. Ломоносова на кафедре биохимии растений под руководством А. Р. Кизеля были начаты исследования нуклеиновых кислот. Эти работы затем возглавил его ученик А. Н. Белозерский, трудами которого была доказана универсальность распространения ДНК в живом мире и связь количественного содержания нуклеиновых кислот в клетках с интенсивностью роста и размножения. К моменту «официального» рождения молекулярной биологии в 1953 г., когда Дж. Уотсоном и Ф. Криком был сформулирован принцип структуры и воспроизведения ДНК, у нас в стране существовала собственная школа специалистов по нуклеиновым кислотам, готовая воспринять тенденции развития этой новой науки. Поэтому уже в ранний период становления молекулярной биологии, несмотря на определенные трудности и недостаток кадров, советскими учеными был сделан ряд принципиальных научных вкладов, среди которых обнаружение специальной фракции РНК, в последующем названной информационной РНК (мРНК), открытие временной регуляции синтеза информационных РНК на ДНК, пионерские исследования информационных РНК эукариотических клеток, расшифровка полной первичной структуры одной из тРНК, демонстрация возможности самосборки рибосом и т. д.

Опираясь на быстро растущий объем знаний в области молекулярной биологии, отечественные традиции в исследовании нуклеиновых кислот и собственный опыт работы, автор данного учебника подготовил в 1964 г. и начал чтение курса лекций по молекулярной биологии в Московском государственном университете. Конечно, с течением времени курс эволюционировал и расширялся, и теперь он состоит из трех частей («Строение и биосинтез нуклеиновых кислот», «Структура рибосом и биосинтез белков» и «Структура и функции белков»). В основу предлагаемой книги положена та часть курса лекций, которая посвящена структуре рибосом и биосинтезу белка.

Первоочередное издание именно этой части курса молекулярной биологии диктуется рядом обстоятельств. Главное — это отсутствие хорошего учебника или монографии не только в отечественной, но и в мировой литературе, где вопросы строения белоксинтезирующего аппарата и механизмы биосинтеза белка были бы освещены достаточно подробно и на современном уровне. В отношении строения и биосинтеза нуклеиновых кислот, механизмов редупликации и транскрипции такие учебники имеются, и среди них прекрасная книга Дж. Уотсона «Молекулярная биология гена» (М., Мир, 1978) и учебник Б. Левина «Гень», изданный в США (B. Lewin. Genes. John Wiley and Sons, N.-Y., 1983). Правда, учебник по структуре и функции белков тоже отсутствует, но недавно вышла книга (Г. Е. Шульц, Р. Х. Ширмер. Принципы структурной организации белков. М., Мир, 1982), которая по крайней мере частично восполняет этот пробел.

Предлагаемый учебник написан в строгом соответствии с программой курса по молекулярной биологии, читаемого в Московском государственном университете им. М. В. Ломоносова, но охватывает всего часть (приблизительно, одну треть) общего курса. Книга может рассматриваться также как пособие для подготовки кандидатского минимума по молекулярной биологии и соответствует программе, утвержденной ВАК. Однако, кроме изложения наиболее фундаментальных знаний, которые накоплены в рассматриваемой области, в книгу включен также и ряд еще не устоявшихся, а иногда и спорных интерпретаций и положений, как примеры возможных, с точки зрения сегодняшнего дня, представлений. В ряде случаев автор предпочел давать предположительную трактовку спорным и противоречивым данным, чем оставлять белые пятна в этих местах, надеясь, что это поможет читателям думать, обсуждать и строить свои гипотезы.

Каждая глава книги снабжена списком рекомендованной литературы, которая включает два типа источников. Чтобы дать возможность читателю восстановить логику открытий, приведены пионерские работы в данной области. Для расширения представлений и углубления знаний по отдельным вопросам в списке литературы даются обзоры и ряд фундаментальных статей последних лет.

Хотелось бы указать на одну трудность формального характера, с которой пришлось столкнуться при написании книги. Дело в том, что в отечественной биохимической литературе

все еще нет устоявшейся системы буквенных сокращений целого ряда соединений, и, в частности, некоторых специальных белков, нуклеиновых кислот и нуклеотидов; для некоторых оставлена латинская (англо-американская) символика — EF-G, IF-2 и т. д., для других давно используется русская — мРНК, тРНК, ДНК, а для третьих обе — АТР или АТФ, poly(U) или полиУ и т. п. Трудности возникают при написании уравнений, комплексов и смесей, где фигурируют и те, для которых принята русская символика, и те, которые пишутся только латинскими буквами. Пришлось всюду в написании уравнений, комплексов и смесей придерживаться единой — латинской — символики, и лишь по тексту сохранить возможно больше русских обозначений.

Иллюстрирование учебного курса представляет собой, пожалуй, наиболее сложную и ответственную задачу. В данной книге автор постарался не воспроизводить стандартные схемы и рисунки из других учебников, обзоров и монографий, а сделать свои. В окончательном изготовлении схематических рисунков, которые были приготовлены в виде эскизов, оказал огромную помощь Отдел научной информации (зав. А. Г. Райхер) Института белка АН СССР; автор особенно признателен П. В. Завозиной и В. И. Невской за выполнение чертежных работ. Иллюстрирование книги рисунками стереохимических моделей и оригинальными электронными микрофотографиями было бы невозможно без непосредственного участия сотрудников Института белка АН СССР В. И. Лима и В. Д. Васильева. Более того, они были постоянными консультантами при написании соответствующих разделов. Молодые сотрудники института Андрей Каява, Дмитрий Ляхов, Ольга Селиванова и Сергей Рязанцев также внесли свой труд в рисование и фотографирование.

Автор очень признателен целому ряду коллег, особенно В. И. Аголу, А. А. Богданову, Л. А. Воронину, А. С. Гиршовичу, А. Т. Гудкову, А. В. Ефимову, Л. Л. Киселеву, Н. А. Киселеву, Д. Г. Кнорре, А. А. Краевскому, М. К. Кухановой, О. Б. Птицыну, Е. И. Шахновичу и В. С. Шварцу, сделавшим ценные замечания по отдельным разделам рукописи. Хотелось бы поблагодарить также Л. А. Козлову, Т. Б. Кувшинкину, Р. Ф. Макарову, Л. Н. Рожанскую и М. С. Шелестову за большой организационный и технический вклад в подготовку рукописи к изданию. Автор заранее благодарен всем, кто пришлет свои замечания и пожелания для улучшения книги.

Академик А. С. Спирин

Часть

А

Вводная

Глава I

ОБЩАЯ СХЕМА БИОСИНТЕЗА БЕЛКА

Во всех живых клетках белки синтезируются *рибосомами*. Рибосома представляет собой крупную макромолекулу со сложной асимметричной четвертичной структурой, построенной из рибонуклеиновых кислот (*рибосомных РНК*) и белков. Для того чтобы синтезировать белок, рибосома должна быть снабжена а) программой, задающей порядок чередования аминокислотных остатков в полипептидной цепи белка; б) аминокислотным материалом, из которого надлежит строить белок; в) энергией. Сама рибосома обладает каталитической (энзиматической) функцией, ответственной за образование пептидных связей и, соответственно, полимеризацию аминокислотных остатков в полипептидную цепь белка.

Программа, задающая порядок чередования аминокислотных остатков в полипептидной цепи белка, исходит от дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), т. е. из генома клетки. Отдельные участки двутяжевой ДНК, называемые *генами*, являются матрицами для синтеза на них одנותяжевых цепей РНК. Синтезированные цепи РНК комплементарны одной из цепей ДНК и, таким образом, точно воспроизводят дезоксирибонуклеотидную последовательность другой цепи ДНК в своей рибонуклеотидной последовательности. Процесс такого копирования гена, осуществляемый ферментом РНК-полимеразой, получил название *транскрипции*. РНК в течение синтеза и после него, особенно в эукариотических клетках, может подвергаться ряду дополнительных изменений, называемых *процессингом*, в ходе которых из нее могут быть вырезаны определенные куски нуклеотидной последовательности. Получающаяся РНК поступает далее в рибосомы в качестве программы, определяющей аминокислотную последовательность в синтезируемом белке. Она называется *информационной* или «*мессенджер*» РНК (мРНК). Таким образом, именно транскрипция генов и образование мРНК обеспечивают поток информации от ДНК к рибосомам.

Исходным материалом, из которого строится белок, являются аминокислоты. Однако свободные аминокислоты не используются рибосомой. Для того чтобы служить субстратом для рибосомы, аминокислота должна быть *активирована* с участием сопряженного расщепления АТФ и *акцептирована* (ковалентно присоединена) спе-

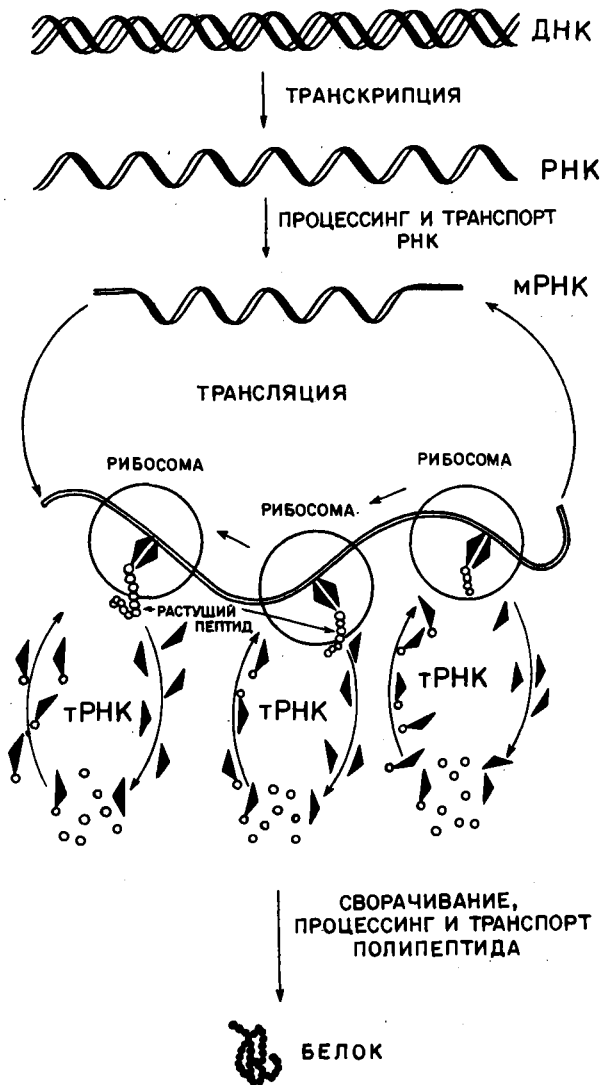


Рис. 1. Общая схема биосинтеза белка («ДНК → РНК → белок»)

циальной молекулой РНК, называемой *трансферной* или *транспортной РНК* (тРНК), с помощью фермента *аминоацил-тРНК-синтетазы*. Получающиеся *аминоацил-тРНК* поступают в рибосому в качестве субстрата для синтеза белка. Кроме того, энергия химической связи между аминокислотным остатком и тРНК используется для реакции образования пептидной связи в рибосоме. Таким образом, активация аминокислот и образование *аминоацил-тРНК* обеспечивают поток как материала, так и энергии для рибосомного синтеза белка.

Эти три потока (информации, материала и энергии) встречаются в рибосоме. Воспринимая их, рибосома осуществляет перевод, или *трансляцию*, генетической информации с языка нуклеотидной последовательности мРНК на язык аминокислотной последовательности синтезируемой полипептидной цепи белка. Если представить это в молекулярных терминах, то рибосома последовательно сканирует цепь мРНК (движется вдоль нее) и тоже последовательно выбирает из среды аминоацил-тРНК, в результате чего специфичность аминокислотного остатка выбираемой рибосомой аминоацил-тРНК каждый раз детерминируется специфичностью комбинации нуклеотидов считываемого в данный момент рибосомой отрезка мРНК. Таким образом, возникает проблема *генетического кода*: какие комбинации нуклеотидов детерминируют, т. е. кодируют, каждую из 20 аминокислот, из которых строятся молекулы белков?

Движение рибосомы вдоль цепи мРНК (или, другими словами, пропускание цепи мРНК сквозь рибосому) задает строгий временной порядок вхождения в рибосому разных аминокислот-тРНК в соответствии с порядком расположения кодирующих нуклеотидных комбинаций вдоль мРНК. Аминоацильный остаток выбранной аминокислот-тРНК каждый раз ковалентно присоединяется рибосомой к растущей полипептидной цепи. Деацилированная тРНК освобождается из рибосомы в раствор. Так последовательно, шаг за шагом, строится полипептидная цепь белка.

Общая схема биосинтеза белка, изложенная выше, представлена на рис. 1.

Рекомендуемая литература

- Живая клетка*: Пер. с англ./Под ред. Г. М. Франка. М.: Мир, 1966. С. 51—66.
Уотсон Дж. Д. Молекулярная биология гена: Пер. с англ. М.: Мир, 1978.
Шульц Г., Ширмер Р. Принципы структурной организации белков: Пер. с англ./Под ред. Е. М. Попова. М.: Мир, 1982.
Lewin B. Genes. John Wiley & Sons, N. Y., 1983.

Глава II.

ИНФОРМАЦИОННАЯ РНК И ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОД

1. ОТКРЫТИЕ мРНК

Вскоре после открытия и окончательного признания генетической роли ДНК (1944—1953) стало ясно, что ДНК не является непосредственной матрицей для синтеза полипептидных цепей белков. С другой стороны, целый ряд ранних наблюдений приводил к мысли о непосредственной связи РНК с синтезом белков в клетке. По-видимому, отсюда родилось представление о том, что РНК должна быть посредником, осуществляющим перенос генетической информации от ДНК к белкам, и, следовательно, что именно РНК может быть

матрицей для полимеризации аминокислотных остатков (ДНК → РНК → белок).

Приблизительно в то же самое время были открыты белок-синтезирующие рибонуклеопротеидные частицы клетки, названные позднее рибосомами (см. гл. А. IV), и установлено, что их РНК составляет подавляющую часть тотальной клеточной РНК. Поэтому казалось естественным, что гены транскрибируются в рибосомные РНК, и именно рибосомные РНК являются матрицами для синтеза белков (гипотеза: «один ген — одна рибосома — один белок»). Чтобы проверить эту гипотезу, А. Н. Белозерским и А. С. Спириным в 1956—1957 гг. был проведен сравнительный анализ нуклеотидного состава ДНК и РНК у широкого круга микроорганизмов. Состав ДНК очень различается у разных групп микроорганизмов и, в соответствии с идеей «ДНК → РНК → белок», ожидалось, что состав тотальной РНК будет варьировать так же, отражая состав ДНК. Однако результат был полностью неожиданным: несмотря на громадные различия в составе ДНК от вида к виду, состав тотальной РНК был похож у всех изученных бактерий и не повторял состава ДНК. Это наводило на мысль, что основная масса клеточной РНК, т. е. рибосомная РНК, не является прямым посредником между ДНК и синтезом белков.

В то же время проведенные анализы состава РНК показали, что он не идентичен у разных видов и что при больших различиях в составе ДНК можно заметить небольшой сдвиг в составе РНК в ту же сторону. Другими словами, была открыта положительная корреляция составов ДНК и РНК у микроорганизмов. Отсюда было сделано заключение о существовании в клетках особой **небольшой фракции РНК**, состав которой повторяет состав ДНК и которая могла бы служить посредником между генами и белоксинтезирующими частицами.

Независимо Э. Волкин и Ф. Астрахан (1956) изучали синтез РНК в бактериях, зараженных ДНК-содержащим бактериофагом Т2. После заражения бактерии перестают синтезировать свои белки, и весь белковый синтез клетки переключается на продукцию белков фага. Оказалось, что основная часть РНК клетки-хозяина при этом не изменяется, но в клетке начинается продукция небольшой фракции метаболически нестабильной (короткоживущей) РНК, нуклеотидный состав которой подобен составу ДНК фага.

Через несколько лет, в 1961 г., эта небольшая фракция РНК (ДНК-подобная РНК) была вычленена из общей массы РНК, а ее функция как посредника, переносящего информацию от ДНК к рибосомам, была продемонстрирована в прямых экспериментах С. Бреннера, Ф. Жакоба и М. Меселсона, с одной стороны, и Ф. Гро и Дж. Уотсона с сотр. с другой, а также в опытах С. Спигелмана с сотр. Было показано, что ДНК-подобная РНК, образующаяся после инфекции бактерии фагом Т4, связывается со старыми хозяйскими рибосомами клетки (новых рибосом после заражения не образуется). Рибосомы, несущие эту РНК, синтезируют фаговые белки. Эта РНК может быть легко отделена от рибосом в условиях *in vitro*, без разрушения рибосом. Она действительно оказалась комплементарной одной из цепей фаговой ДНК.

В том же году идею о том, что не стабильная (структурная) рибосомная РНК, а специальная короткоживущая информационная РНК переносит информацию от генов к рибосомам и является непосредственной матрицей для последовательной расстановки аминокислот в процессе биосинтеза белка, высказали Ф. Жакоб и Ж. Моно на основании данных по генетической регуляции у бактерий. Название *РНК-посредник* или *информационная РНК* (messenger RNA) было принято во всех последующих исследованиях.

2. РАСШИФРОВКА КОДА

После открытия мРНК (1956—1961) предстояло выяснить тот код, которым аминокислотная последовательность белков записана в виде рибонуклеотидной последовательности мРНК и, следовательно, в исходной дезоксирибонуклеотидной последовательности одной из двух цепей ДНК.

Априорные соображения уже давно заставляли предполагать, что каждая аминокислота должна кодироваться, по крайней мере, триплетом нуклеотидов. Действительно, имеется 20 природных аминокислот, из которых строятся белки (рис. 2). В то же время нуклеиновые кислоты построены всего из 4 сортов нуклеотидных остатков (см. рис. 4), их азотистыми основаниями являются аденин (А), гуанин (G), цитозин (С) и либо урацил (U) в РНК, либо тимин (Т) в ДНК. Ясно, что один нуклеотид не может кодировать одну аминокислоту (4 против 20). Возможных динуклеотидных комбинаций (дуплетов) может быть 16, что опять-таки недостаточно для кодирования 20 аминокислот. Следовательно, минимальное количество остатков в нуклеотидной комбинации, кодирующей одну аминокислоту, может быть три, т. е. аминокислоты должны кодироваться, скорее всего, *нуклеотидными триплетами*. Общее количество возможных триплетов составляет 64, что с избытком хватает для кодирования 20 аминокислот.

Ситуация с избыточными триплетами могла бы быть двоякой: либо только 20 триплетов являются значащими, т. е. кодируют ту или иную аминокислоту, а остальные 44 бессмысленны, либо аминокислота может кодироваться более чем одним триплетом, и тогда код является *вырожденным*.

Далее, триплетный код мог бы быть либо перекрывающимся, когда один и тот же нуклеотид участвует в трех (сильно перекрывающихся) и двух (менее перекрывающихся) кодирующих триплетах, либо неперекрывающимся, когда в цепи нуклеиновой кислоты независимые кодирующие триплеты примыкают друг к другу или даже разделены некодирующими нуклеотидами. Однако тот факт, что точечная мутация (изменение одного нуклеотида в цепи нуклеиновой кислоты) приводит, как правило, к замене только одной аминокислоты в белке, говорил против идеи перекрывающегося кода. Кроме того, перекрывающийся код неизбежно влек бы за собой ограничения в возможных аминокислотных соседях вдоль полипептидной цепи, чего не

Кодоны: Аминокислотные остатки:

Аминокислотные Кодоны: остатки:

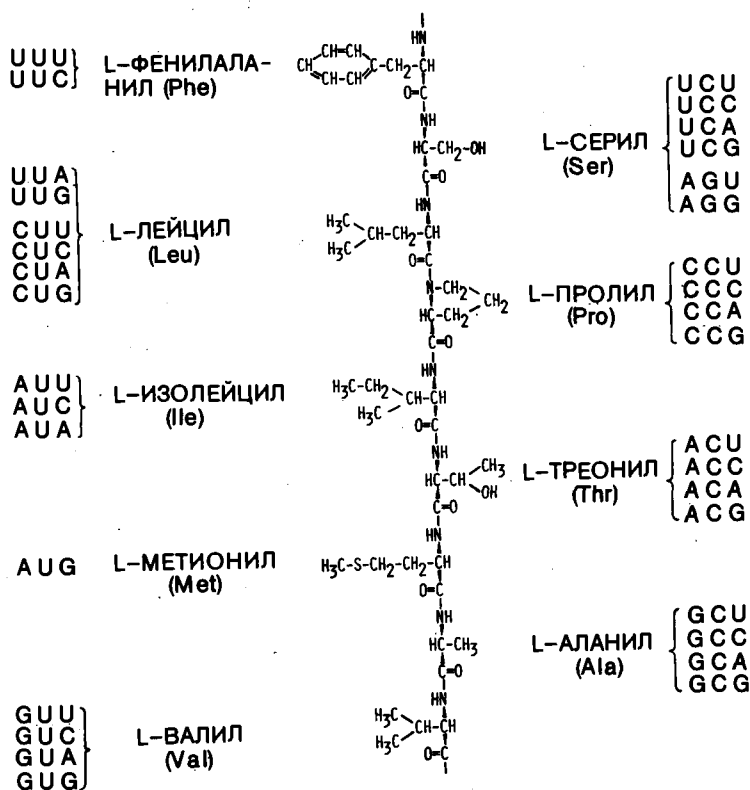
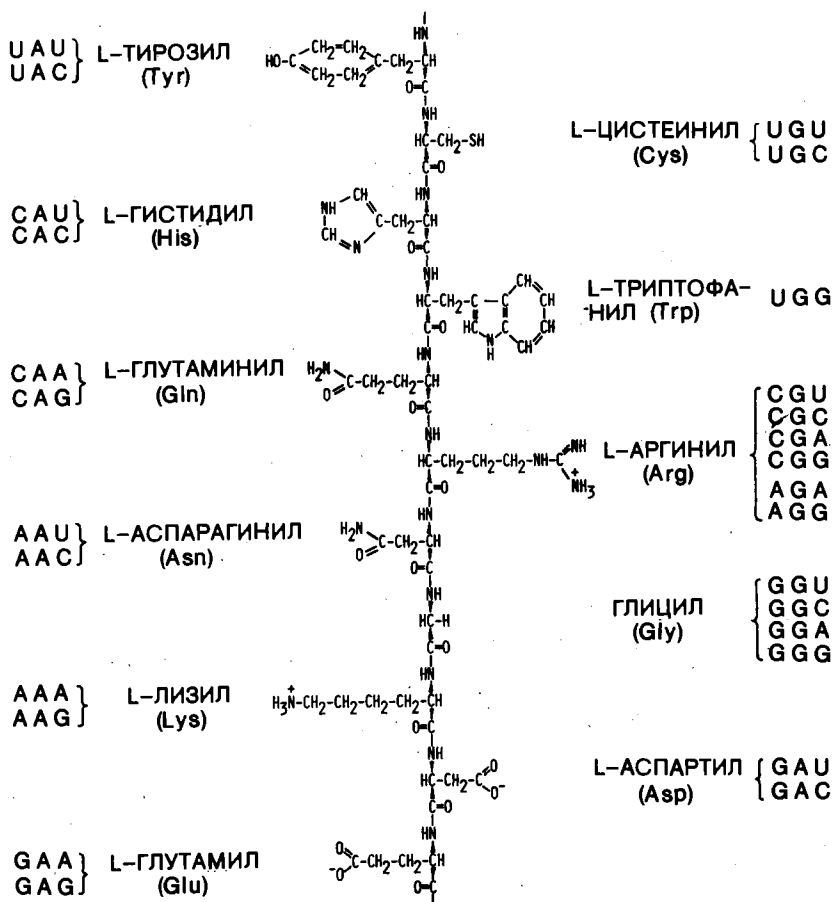


Рис. 2. Аминокислотные остатки белков и их кодоны

наблюдалось из анализа первичных структур белков. Следовательно, *неперекрывающийся* код казался более вероятным.

Наконец, необходимо было знать, разделены ли значащие триплеты незначащими остатками («запятые») или триплеты читаются вдоль цепи подряд, т. е. имеет место *код без запятых*. В последнем случае возникает проблема фазы или рамки считывания матричной цепи нуклеиновой кислоты: только начало считывания с точно определенной точки полинуклеотидной цепи и дальнейшее сканирование цепи строго подряд по триплетам могло дать однозначную последовательность аминокислот.

Классические эксперименты Ф. Крика и С. Бреннера с сотр. (1961) доказали, что код является триплетным, вырожденным, *неперекрыва-*



вающимся, без запятых. Схема экспериментов состояла в следующем. С помощью химических агентов, вызывающих либо вставку, либо делецию нуклеотидного остатка при репликация ДНК (профлавин и другие акридиновые красители), были получены многочисленные мутанты по определенному гену (ген в области гIII) бактериофага Т4. Вставка или делеция нуклеотида в начальном участке гена приводила к полной утрате его экспрессии. Путем рекомбинации ДНК различных мутантных фагов в клетках *Escherichia coli* можно было получить фенотипические ревертанты, где ген снова экспрессировался. Анализ рекомбинантов показал, что экспрессия гена восстанавливалась, если недалеко от участка со вставкой вводился участок с делецией, или наоборот. Экспрессия гена восстанавливалась также,

если недалеко от участка со вставкой (или делецией) вводились еще две вставки (или, соответственно, делеции). Таким образом, а) вставка (или делеция) одного нуклеотида в начале кодирующего участка цепи ДНК приводила, по-видимому, к утрате всего последующего кодирующего смысла данного гена (а не к точечной мутации) вследствие сдвига рамки считывания; б) делеция (или вставка) вблизи вышеуказанной вставки (или, соответственно, делеции) восстанавливала кодирующий смысл последующей последовательности в гене за счет восстановления рамки считывания после нее, и в) три, но не менее, близко расположенные вставки (или делеции) также обеспечивали исходный кодирующий смысл следующей за ними нуклеотидной последовательности. Отсюда следует, что код является триплетным, и триплеты считываются последовательно, без «запятых», со строго фиксированной точки, в одной и той же фазе. Эти же опыты указывали, что код вырожден: если бы большая часть из 64 возможных триплетов была бессмысленной, то существовала бы высокая вероятность появления хоть одного бессмысленного триплета в участке между вставкой и делецией или между тремя вставками, где чтение происходит со сдвигом рамки (в другой фазе), что прерывало бы непрерывность полипептидной цепи белка-продукта.

Расшифровка смысла нуклеотидных триплетов началась также в 1961 г., когда М. Ниренберг и Г. Маттей открыли кодирующие свойства синтетических полирибонуклеотидов при их использовании вместо природных мРНК в бесклеточных системах трансляции. Возможность получения синтетических полирибонуклеотидов различного состава с помощью специального фермента, полинуклеотидфосфорилазы, была впервые продемонстрирована М. Грюнбергом-Маного в лаборатории С. Очоа за несколько лет до этого. Состав синтезированного полинуклеотида в описанной ими реакции зависел только от набора рибонуклеозиддифосфатов в качестве субстратов; простейшими синтезированными полирибонуклеотидами были гомополинуклеотиды, такие как полиуридиловая кислота, полиадениловая кислота и полицитидиловая кислота, получаемые из УДФ, АДФ или ЦДФ, соответственно. Используя поли (U) в качестве матричного полинуклеотида для рибосомы *E. coli*, М. Ниренберг и Г. Маттей показали, что синтезирующимся полипептидным продуктом является полифенилаланин. Отсюда вытекало, что триплет UUU кодирует фенилаланин. Таким же образом в опытах с полиадениловой и с полицитидиловой кислотами было показано, что AAA кодирует лизин, а CCC — пролин.

Дальнейшая расшифровка кода была основана на использовании синтетических статистических гетерополинуклеотидов определенного состава, задаваемого набором и соотношением субстратных нуклеозиддифосфатов в полинуклеотидфосфорилзной реакции. Так, было показано, что статистический сополимер поли(U, C) кодирует включение в полипептидную цепь четырех аминокислот: фенилаланина, лейцина, серина и пролина. Если соотношение U : C в полинуклеотиде было 1 : 1, то все четыре аминокислоты включались в полипептид

с равной вероятностью. Если соотношение U : C было 5 : 1, то вероятности включения аминокислот располагались в последовательности Phe > Leu = Ser > Pro. Следовательно, фенилаланин должен кодироваться триплетами, состоящими из трех U и из двух U и одного C; лейцин и серин — триплетами, состоящими из двух U и одного C и из двух C и одного U; пролин — триплетами из трех C и из двух C и одного U. К сожалению, этот метод мог дать только состав кодирующих триплетов, но не их нуклеотидную последовательность, так как нуклеотидная последовательность используемых матричных полинуклеотидов была статистической.

Тем не менее, нуклеотидные последовательности кодирующих триплетов были вскоре расшифрованы благодаря изобретению М. Ниренбергом и Ф. Ледером новой техники их тестирования. Оказалось, что кодирующими свойствами обладает индивидуальный тринуклеотид: будучи ассоциирован с рибосомой, он приводит к избирательному связыванию рибосомой определенной аминокислоты из среды. Так, например, триплеты UUU и UUC давали в результате связывания с рибосомой фенилаланил-тРНК, триплеты UCU и UCC индуцировали связывание серил-тРНК, триплеты CUU и CUC — лейцил-тРНК и триплеты CCU и CCC — пролил-тРНК. К 1964 г. методы ферментативного и химического синтеза тринуклеотидов заданной последовательности уже существовали, и тестирование широкого набора тринуклеотидов в течение последующих двух лет привело к расшифровке практически всего кода (см. рис. 3).

Финалом этой истории было использование синтетических полинуклеотидов с регулярной нуклеотидной последовательностью в качестве матриц в бесклеточных системах синтеза полипептидов на рибосомах. Методы синтеза регулярных полинуклеотидов были разработаны Г. Хорана, и им же генетический код был прямо проверен путем использования их как матриц. В полном соответствии с кодом, использование поли(UC)_n в качестве матрицы дало полипептид, построенный из чередующихся серина и лейцина, а поли(UG)_n приводил к синтезу регулярного полипептидного сополимера с чередующимися валином и цистеином. Поли(AAG)_n кодировал синтез трех гомополимеров: полилизина, полиаргинина и полиглутаминовой кислоты.

3. НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ КОДОВОГО СЛОВАРЯ

На рис. 3 дан полный кодовый словарь. Из 64 триплетов, получивших название *кодонов*, 61 являются «значащими» (смысловыми) в том смысле, что кодируют аминокислоты. Только 3 кодона — UAG («янтарь»), UAA («охра») и UGA («опал») — не кодируют никакой аминокислоты и потому иногда называются «бессмысленными». Роль «бессмысленных» триплетов в трансляции очень важна, так как в мРНК они служат сигналом терминации синтеза полипептидной цепи белка; в настоящее время их обычно называют *терминаторными* кодонами.

Вырожденность кода распространяется не на все аминокислоты.

Вторая буква

| | | U | | C | | A | | G | | | |
|--------------|-----|-----|-----|-----|-------|-----|------|-----|-----|---|--------------|
| Первая буква | U | UUU | Phe | UCU | Ser | UAU | Tyr | UGU | Cys | U | Третья буква |
| | | UUC | | UCC | | UAC | | UGC | | C | |
| | | UUA | Leu | UCA | Ochre | UGA | Opal | U | | | |
| | | UUG | | UCG | | UAG | | UGG | A | | |
| C | CUU | Leu | CCU | Pro | CAU | His | CGU | Arg | U | | |
| | CUC | | CCC | | CAC | | CGC | | C | | |
| | CUA | Met | CCA | Gln | CAA | Asn | CGA | Arg | A | | |
| | CUG | | CCG | | CAG | | CGG | | G | | |
| A | AUU | Ile | ACU | Thr | AAU | Asn | AGU | Ser | U | | |
| | AUC | | ACC | | AAC | | AGC | | C | | |
| | AUA | Met | ACA | Lys | AAA | Lys | AGA | Arg | A | | |
| | AUG | | ACG | | AAG | | AGG | | G | | |
| G | GUU | Val | GCU | Ala | GAU | Asp | GGU | Gly | U | | |
| | GUC | | GCC | | GAC | | GGC | | C | | |
| | GUA | Val | GCA | Glu | GAA | Glu | GGA | Gly | A | | |
| | GUG | | GCG | | GAG | | GGG | | G | | |

Рис. 3. Кодовый словарь

Так, две аминокислоты — метионин и триптофан — кодируются всего одним кодоном каждая (AUG и UGG, соответственно). С другой стороны, три аминокислоты — лейцин, серин и аргинин — имеют шесть кодонов каждая. Остальные аминокислоты, за исключением изолейцина, кодируются либо двумя, либо четырьмя кодонами; только изолейцину соответствуют три кодона.

Следует обратить особое внимание на то, что триплеты, кодирующие одну и ту же аминокислоту, в большинстве случаев различаются только по третьему нуклеотидному остатку. Лишь в тех случаях, когда аминокислота имеет более четырех кодонов, различия в кодонах затрагивают также первое и второе положения в триплете. Если вся группа четырех кодонов, различающихся только по третьему нуклеотиду, кодирует одну и ту же аминокислоту, то можно говорить о *семье кодонов*. Как видно из рис. 3, имеется восемь таких семей кодонов — для лейцина, валина, серина, пролина, треонина, аланина, аргинина и глицина.

Код, данный на рис. 3, является универсальным для белоксинтезирующих систем бактерий и цитоплазмы всех эукариот, включая животных, грибы и высшие растения. Однако в живой природе имеются также и исключения. По крайней мере белоксинтезирующие системы митохондрий животных (млекопитающих) и грибов обнаруживают ряд отклонений от этого универсального кода. Так, в митохондриях изученных эукариотических организмов триптофан кодируется как UGG, так и UGA; соответственно, UGA не является терминирующим кодоном. В митохондриях млекопитающих (человека) кодоны AGA и AGG — терминирующие и не кодируют аргинин. В митохондриях дрожжей вся кодоновая семья CUU, CUC, CUA и CUG кодирует треонин, а не лейцин (хотя в митохондриях другого гриба, *Neurospora*, они кодируют лейцин, в соответствии с универсальным кодом).

4. СТРУКТУРА мРНК

Первичная структура

В отличие от ДНК, мРНК (как и другие виды клеточной РНК) представляет собой **однотяжевой** полинуклеотид. Он состоит из линейно расположенных четырех сортов рибонуклеозидных остатков — аденозина (А), гуанозина (G), цитидина (C) и уридина (U), последовательно соединенных фосфодиэфирными связями между 3'-гидроксильной группой рибозы одного нуклеозида и 5'-гидроксильной группой соседнего нуклеозида (рис. 4). Концевой нуклеозид, где 5'-гидроксил не участвует в образовании межнуклеотидной связи, обозначается как 5'-конец РНК, а другой концевой нуклеозид со свободным 3'-гидроксильным концом называют 3'-конец РНК. Принято писать и читать последовательность нуклеотидных остатков в РНК **от 5'-конца к 3'-концу**, т. е. в направлении межнуклеотидной фосфодиэфирной связи от 3'-гидроксильной группы к 5'-гидроксильной группе соседа (направление связи 3'-P-5'). Следует отметить, что именно в этом направлении мРНК читается рибосомой.

В природных мРНК 5'-концевой гидроксил всегда замещен. У прокариотических организмов он просто фосфорилирован либо моно-, либо трифосфатом (рис. 4). Эукариотические мРНК в большинстве случаев несут на концевом 5'-гидроксильном конце дополнительную группу — так называемый «кэп», представляющий собой модифицированный (N⁷-метилированный) остаток гуанозин-5'-трифосфата, соединенный с концевым нуклеотидом необычным 5'—5'-способом (рис. 5). В эукариотах существует специальная ферментная система, включающая гуанилилтрансферазу и метилтрансферазы, которые осуществляют это «кэппирование» мРНК; «кэппирование» сопровождается также метилированием 2'-гидроксильной группы рибозы и, часто, основания 5'-концевого (примыкающего к «кэпу») нуклеозида (рис. 5). Следует отметить, что 5'-концевыми нуклеотидами в мРНК чаще всего являются пуриновые нуклеотиды (G или A).

3'-концевой гидроксил природных мРНК свободен. Таким образом, на 3'-конце имеется два гидроксильных терминальных (цис-гликольная группировка) (рис. 4).

Функциональные участки

Физическая длина цепи мРНК, по-видимому, никогда не равна длине ее кодирующей последовательности. Кодирующая последовательность составляет лишь **часть** общей длины полинуклеотидной цепи мРНК. Во-первых, первому кодону всегда предшествует более или менее протяженная некодирующая 5'-концевая последовательность. Во-вторых, терминирующий кодон никогда не заканчивает цепь мРНК, а за ним всегда следует некодирующая 3'-концевая последовательность. В дополнение к этому, эукариотические мРНК часто (но не всегда) продолжаются в длинную некодирующую 3'-концевую полиадениловую последовательность, которая добавляется к мРНК специальным ферментом (полиаденилатполимеразой) после завершения транскрипции.

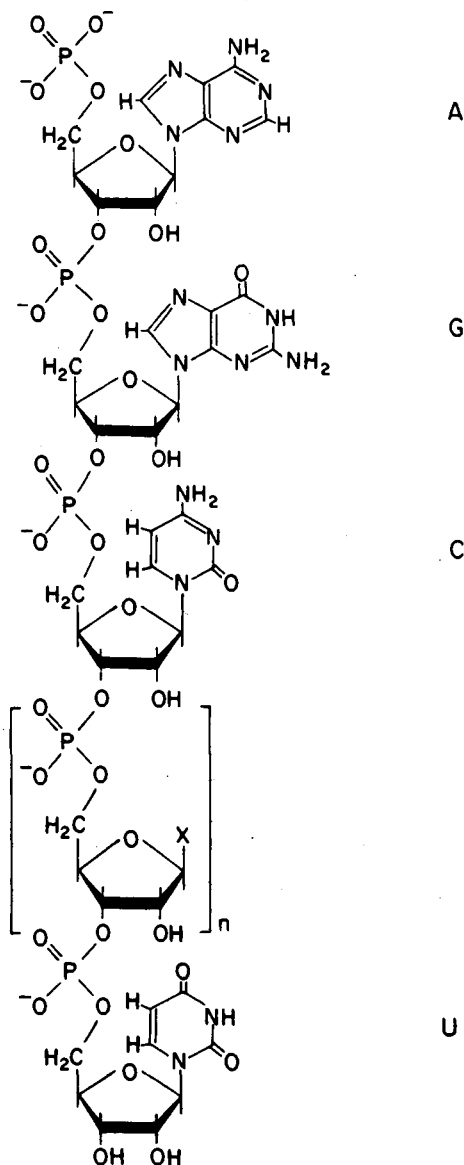


Рис. 4. Нуклеотидные остатки РНК

цепи мРНК, начиная с ее 5'-конца, триплеты AUG и GUG могут неоднократно попадаться как в фазе с последующей кодирующей последовательностью, так и не в фазе, и тем не менее они не иницируют трансляцию. Наконец, многочисленные триплеты AUG и GUG в пределах кодирующей последовательности, но находящиеся

Очень важным является вопрос, что определяет начало кодирующей части нуклеотидной последовательности в пределах цепи мРНК. Известно, что любая полипептидная цепь начинает синтезироваться с N-концевого метионинового остатка и, следовательно, первый кодон на мРНК должен кодировать метионин. Оказалось, что в большинстве случаев такими инициаторными кодонами являются AUG, и гораздо реже GUG или UUG. Кодон AUG кодирует метионин в любых случаях — и когда он является первым кодоном кодирующей последовательности мРНК, и когда он является внутренним кодоном. Однако кодон GUG внутри кодирующей последовательности кодирует валлин, и только будучи первым в кодирующей последовательности кодирует инициаторный метионин. Инициаторными кодонами, кодирующими инициаторный метионин, могут быть также UUG, AUA, AUU и, возможно, CUG.

Однако идентификация ряда кодонов как инициаторных не решает проблему начала кодирующей части, а ставит ее. Действительно, отнюдь не любой триплет AUG и GUG может стать инициаторным. Внутренние кодоны AUG и GUG, как правило, не могут иницировать трансляцию. При сканировании

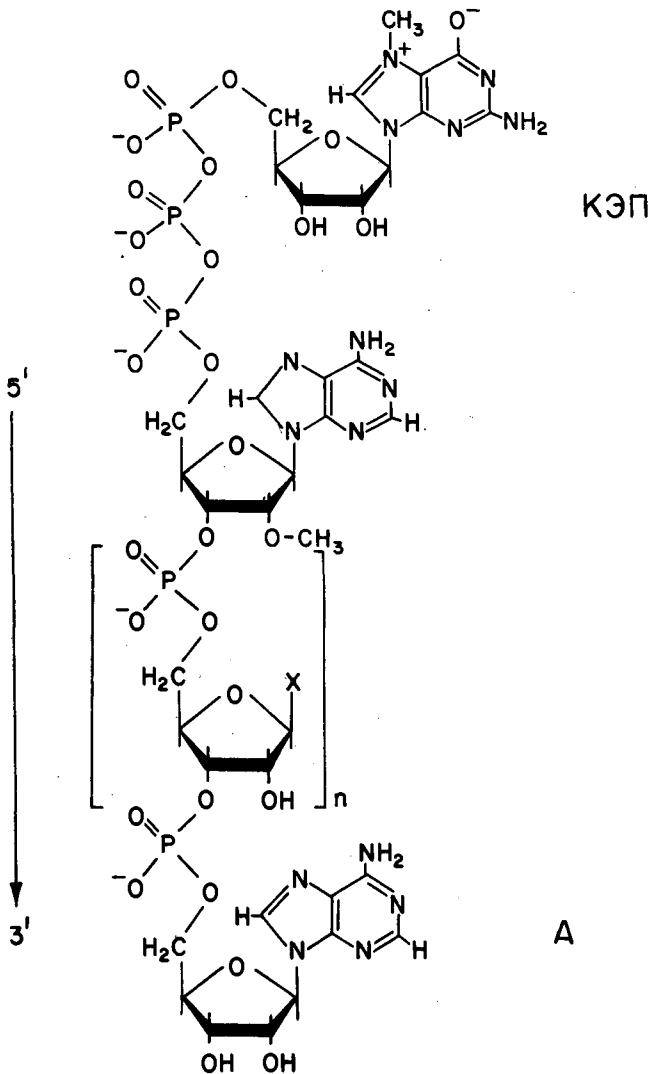


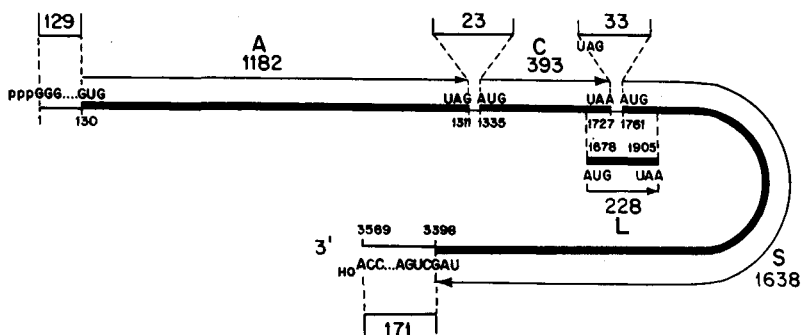
Рис. 5. «Кэп» на 5'-конце эукариотической мРНК

не в фазе, тоже не инициируют синтеза бессмысленных полипептидов. Следовательно, инициаторный кодон, в отличие от всех других кодонов, как кодирующих аминокислоты, так и терминаторных (см. рис. 3), определяется не только его собственной структурой (его составом и последовательностью), но также и его положением в структуре мРНК. Пока окончательно не ясно, какие элементы структуры делают триплет AUG или GUG инициаторным кодоном. Ряд данных указывает на существенную роль нуклеотидной после-

довательности, предшествующей инициаторному кодону (см. гл. BVI). Возможно, что определенная вторичная и третичная структура данного района мРНК необходима, чтобы особым образом экспонировать соответствующий триплет как инициаторный кодон (см. ниже).

Одна полинуклеотидная цепь мРНК не обязательно содержит только одну кодирующую последовательность. Для прокариотических мРНК очень обычно, что одна полинуклеотидная цепь включает кодирующие последовательности для нескольких белков. Такие мРНК получили название *полицистронных мРНК* (происходит от термина «цистрон», введенного С. Бензером как эквивалент гена). Различные кодирующие последовательности (*цистроны*) в пределах одной цепи мРНК обычно разделены некодирующими последовательностями. Такая внутренняя некодирующая последовательность начинается после терминаторного кодона предшествующего цистрона; иногда в ее начале имеется еще один терминаторный кодон, по-видимому, дублирующий терминаторный кодон цистрона на случай почему-либо не состоявшейся терминации. Следующий цистрон снова начинается с инициаторного кодона AUG или GUG.

Хорошим примером полицистронной мРНК является РНК малого РНК-содержащего бактериального вируса (фага) MS2. Фаг MS2 — сферический; он имеет диаметр 2,5 нм и молекулярную массу $3,6 \cdot 10^6$ дальтон. Фаг построен из 180 субъединиц белка оболочки с молекулярной массой 14700 дальтон каждая, одной молекулы так называемого А-белка с молекулярной массой 38000 дальтон и одной молекулы РНК с молекулярной массой 10^6 дальтон. После попадания фага в клетку *E. coli* (а также в бесклеточной системе трансляции) эта РНК служит матрицей для белка оболочки, А-белка и субъединицы РНК-репликазы с молекулярной массой 62000 дальтон, которая в состав фага не входит. Схема расположения соответствующих цистронов вдоль цепи этой мРНК дана на рис. 6. Цепь начинается с G, имеющего трифосфат на своем 5'-гидроксиле. Далее следует длинная некодирующая нуклеотидная последовательность. Общая длина 5'-концевой некодирующей последовательности 129 остатков; в ней встречаются триплеты AUG и GUG, которые, однако, не являются инициаторными. Первый инициаторный кодон, GUG, начинает кодирующую последовательность А-белка (А-цистрон). А-цистрон имеет длину 1179 остатков и заканчивается терминаторным кодоном UAG. Затем идет некодирующая вставка длиной 26 остатков. Следующая кодирующая последовательность начинается с AUG и имеет длину 390 остатков; это — цистрон белка оболочки (С-цистрон). Он оканчивается терминаторным кодоном UAA, и за ним непосредственно следует второй терминаторный кодон UAG. Последовательность длиной 36 остатков отделяет С-цистрон от S-цистрона, кодирующего субъединицу РНК-синтазы. S-цистрон начинается с AUG, имеет длину 1635 остатков и заканчивается UAG. За ним через один остаток (т. е. не в фазе) имеется еще один терминаторный триплет UGA. 3'-концевая некодирующая последовательность имеет общую длину 174 остатка и заканчивается аденозином со свободной *цис*-гликольной группиров-



MS2 РНК

Рис. 6. Схема расположения кодирующих и некодирующих нуклеотидных последовательностей вдоль цепи РНК фага MS2:

А, С, L и S — цистроны, кодирующие белки «созревания», оболочки, лизиса и репликазы («синтетазы»), соответственно. Крупные цифры указывают количество нуклеотидных остатков в данном отрезке, мелкие — положения нуклеотидных остатков.

кой. Полная первичная структура РНК фага MS2 была определена В. Фирсом с сотр. в 1971—1976 гг.

В связи с рассмотрением РНК фага MS2, следует указать также на другой способ размещения разных кодирующих последовательностей в одной мРНК. Дело в том, что MS2 РНК кодирует еще и четвертый белок, названный белком лизиса, или L-белком (он, по-видимому, участвует в лизисе хозяйской клетки на завершающей фазе инфекции). Этот белок закодирован участком РНК, начинающимся в конце С-цистрона, захватывающим всю 36-нуклеотидную вставку между С-цистроном и S-цистроном и заканчивающимся в пределах S-цистрона; рамка считывания этого перекрывающегося L-цистрона сдвинута вправо на один остаток (+1 сдвиг), так что никакие его участки не транслируются при синтезе С-белка и S-белка. L-цистрон имеет свой инициаторный кодон AUG, не в фазе с кодонами С-цистрона, и, соответственно, свой терминаторный кодон UAA, не в фазе с кодонами S-цистрона. Эта ситуация изображена на рис. 7. Использование перекрывающихся кодирующих последовательностей в пределах одной мРНК встречается, однако, не часто и свойственно, по-видимому, в основном вирусным системам, где экономия места для размещения цистронов играет особенно важную роль.

В отличие от прокариотических мРНК, мРНК эукариот, как правило, *моноцистроны*, т.е. кодируют всего одну полипептидную цепь. Кодирующая последовательность мРНК также фланкирована, как с 5'-конца, так и с 3'-конца, некодирующими последовательностями. Уже отмечалось, что 5'-конец обычно модифицирован «кэпом» (см. рис. 5), имеющим, по-видимому, значение для первичной (преинициаторной) ассоциации мРНК с рибосомой. Здесь следует указать на возможную разницу в механизме поиска иницирующего

MET GLU THR ARG PHE PRO GLN GLN SER GLN GLN THR PRO ALA SER
 CAAGGUCUCCUAAAA GAUGGAAACCCGAUUC CUCAGCAAUCG C'AGCAAACU.CCGGCAUC
 GLN GLY LEU LEU LYS ¹ASP GLY ASN PRO ILE PRO SER ALA ILE ALA ALA ASN SER GLY ILE
 1678

THR ASN ARG ARG ARG PRO PHE LYS HIS GLU ASP TYR PRO CYS ARG ARG GLN GLN ARG SER
 UACUAAUAGACGCCGGCCAUUCAAAACAUGAGGAUUACCCAUGUCGAAGACAACAAGAAG
 TYR MET SER LYS THR THR LYS LYS

SER THR LEU TYR VAL LEU ILE PHE LEU ALA ILE PHE LEU SER LYS PHE THR ASN GLN LEU
 UUCAACUCUUUAUGUAUUGAUCUUC CUCGCGAUCUUUCUCUCGAAAUUUACCAAUCAAUU
 PHE ASN SER LEU CYS ILE ASP LEU PRO ARG ASP LEU SER LEU GLU ILE TYR GLN SER ILE

LEU LEU SER LEU LEU GLU ALA VAL ILE ARG THR VAL THR THR LEU GLN GLN LEU LEU THR
 GCUUCUGUCGCUACUGGAAGCGGUGAUC CCGCACAGUGACGACUUUACAGCAAUUGCUUACUUA
 ALA SER VAL ALA THR GLY SER GLY ASP PRO HIS SER ASP ASP PHE THR ALA ILE ALA TYR LEU
 1902

Рис. 7. Нуклеотидная последовательность, кодирующая L-белок фага MS2, начиная с нуклеотидного остатка 1678:
 Аминокислотная последовательность L-белка указана над, а последовательности конца С-белка и начала S-белка под нуклеотидной
 последовательностью (по M. N. Beremand, T. Blumenthal, Cell, 1979, v. 18, p. 257-266)

кодона в прокариотической и эукариотической системах трансляции: прокариотические рибосомы ассоциируют с мРНК и узнают иницирующую кодон независимо от 5'-конца, и поэтому широко используют «внутреннюю» инициацию в полицистронных мРНК; в противоположность этому, эукариотические рибосомы обычно нуждаются в 5'-конце мРНК для ассоциации с ней, и «кэп», вероятно, способствует такой ассоциации (см. гл. В.VII). Считается, что в большинстве случаев в эукариотических системах первый AUG кодон от 5'-конца является инициаторным. 3'-конец эукариотических мРНК часто неопределен: длина 3'-концевой некодирующей последовательности может варьировать у разных молекул одной и той же мРНК. Кроме того, как уже отмечалось, подавляющая часть эукариотических мРНК несет на 3'-конце полиадениловые последовательности варьированной длины.

Пространственная структура

Что касается пространственной (трехмерной) структуры мРНК, то, к сожалению, в настоящее время она не установлена ни в одном случае. Из измерений различных физических параметров некоторых мРНК ясно, что они представляют собой сильно свернутые структуры, с большим количеством внутрицепных взаимодействий между азотистыми основаниями типа Уотсон-Криковского комплементарного спаривания. Хотя мРНК не являются двойными спиралями типа ДНК, они обнаруживают развитую вторичную структуру за счет комплементарного спаривания отдельных участков одной и той же цепи друг с другом, с образованием большого набора относительно коротких двуспиральных участков. Около 70% всех нуклеотидных остатков в цепи участвует в комплементарном спаривании и, соответственно, в формировании внутримолекулярных спиралей. Большая часть двуспиральных участков образуется, по-видимому, за счет комплементарного спаривания смежных отрезков полинуклеотидной цепи; схема формирования таких коротких двойных спиралей дана на рис. 8. Комплементарное спаривание далеко отстоящих отрезков цепи должно приводить к дополнительному сильному складыванию структуры и формированию компактных доменов в мРНК, как показано на рис. 9. В основе этих взаимодействий, формирующих вторичную структуру мРНК, лежат спаривания А с U и G с C (Уотсон-Криковские пары), а также, по-видимому, G с U (см. рис. 19). О взаимодействиях, формирующих третичную структуру, и о самом характере третичной структуры мРНК ничего не известно.

В то же время имеется целый ряд указаний на роль вторичной и третичной структуры мРНК в трансляции. Уже отмечалось, что пространственная структура инициаторного участка мРНК может быть важной или даже решающей, чтобы триплет AUG (или GUG) мог играть роль инициаторного кодона. По-видимому, необходимо, чтобы собственным инициаторным триплетом либо вовсе не был вовлечен в Уотсон-Криковское спаривание с другими нуклеотидами мРНК, либо участвовал в слабом (нестабильном) комплементарном спаривании. Другими словами, инициаторный кодон должен быть либо уже открыт, либо легко открываться для взаимодействия с инициаторной тРНК на рибосоме. Из предсказания вторичной

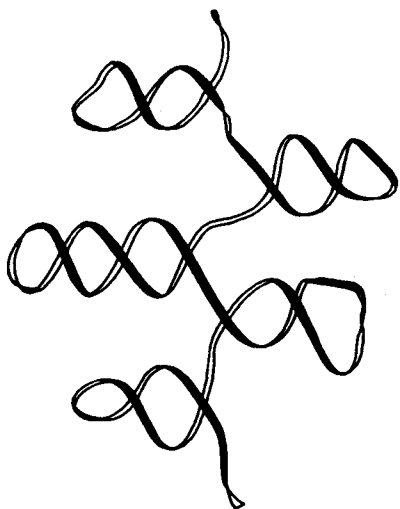


Рис. 8. Схема формирования вторичной структуры (двуспиральных шпильки) путем спаривания смежных отрезков полинуклеотидной цепи РНК

структуры на основании взаимной комплементарности смежных участков цепи следует, что неспаренный AUG триплет действительно имеется в начале цистрона белка оболочки фага MS2 РНК (рис. 10); этот триплет расположен как раз на верхушке двуспиральной шпильки, образуя петлю. Именно он, как известно, является преимущественным местом инициации синтеза белка на MS2 РНК. Интересно, что инициация на инициаторных кодонах других цистронов MS2 РНК идет значительно менее эффективно. Это согласуется с тем, что например, инициаторный триплет AUG цистрона субъединицы РНК-синтетазы входит в состав двуспирального участка, который, по-видимому, не очень стабилен, так как короток и дефектен, но тем не менее тормозит его проявление в инициации. Существование вторичной структуры в районе, захва-

тывающем терминаторный кодон цистрона белка оболочки и инициаторный кодон цистрона синтетазы, было прямо показано в экспериментах Дж. Стейтс и Д. Кротерса с соответствующим фрагментом РНК родственного бактериофага R17 (рис. 11).

По-видимому, стабилизация двуспирального участка с участием инициаторного триплета либо за счет третичной структуры РНК, либо в результате специфического присоединения РНК-связывающего белка, может полностью блокировать инициацию в данном участке. Так, очень похоже, что в MS2 РНК, а также в РНК родственных фагов R17, f2 и др. третичной структурой заблокированы инициаторные триплеты как А-цистрона, так и S-цистрона. Инициация на А-цистроне происходит, вероятно, лишь в процессе синтеза РНК, когда полная пространственная структура еще не сформирована. Инициация на S-цистроне имеет место в процессе трансляции предшествующего С-цистрона: рибосомы, считывая С-цистрон, расплетают РНК, освобождая участок с инициаторным триплетом S-цистрона из какого-то более стабильно свернутого состояния. Когда появятся готовые молекулы белка оболочки фага, снова происходит выключение инициации S-цистрона: белок оболочки фага имеет специфическое сродство к неустойчивой спирали, содержащей инициаторный AUG триплет (рис. 11), и, связываясь с ним, стабилизирует спираль.

После того как инициация трансляции состоялась, рибосомы могут читать мРНК более или менее независимо от ее вторичной и третичной структуры, очевидно, последовательно расплетая ее по мере прохождения вдоль цепи (разумеется, после прохождения рибосомы участка цепи вновь свертываются). В то же время пока ничего не известно о роли вторичной и третичной структуры мРНК в скорости считывания цепи (скорости элон-

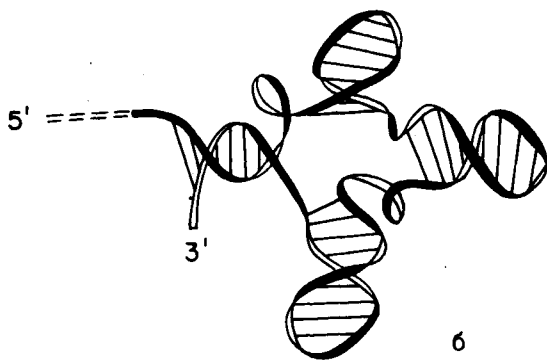
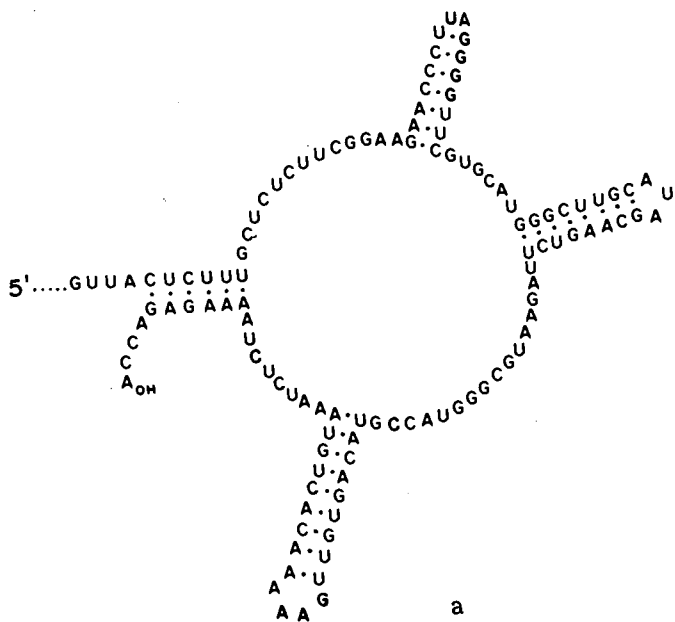


Рис. 9. Схема вероятной вторичной структуры 3'-концевого домена РНК вируса мозаики костра:

a — нуклеотидная последовательность и комплементарность спаренных участков цепи (по R. Dasgupta, P. Kaesberg. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977, v. 74, p. 4900–4904; M. R. Gunn et al. FEBS Lett., 1980, v. 155, p. 77–82);
b — та же структура в виде двуспиральных участков, соединенных одностежковыми отрезками

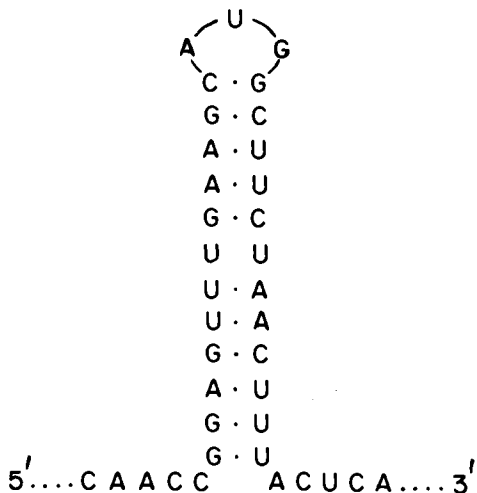


Рис. 10. Схема вероятной вторичной структуры (двуспиральной шпильки) участка РНК фага MS2, содержащего инициаторный кодон AUG цистрона белка оболочки фага (по J. A. Steitz, Nature, 1969, v. 224, p. 957–964)

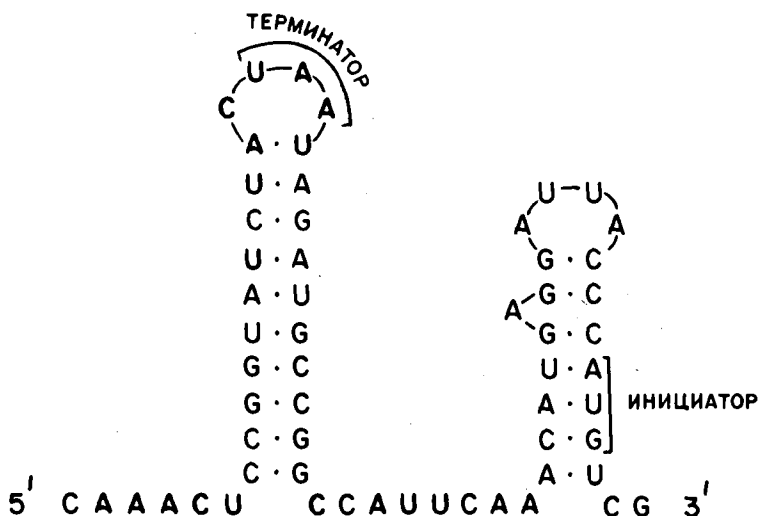


Рис. 11. Схема вторичной структуры фрагмента РНК фага R17, охватывающего конец цистрона белка оболочки и начало цистрона синтетазы (по J. Gralla et al. Nature, 1974, v. 248, p. 204–208).

гации полипептида). Известно, что эта скорость неравномерна, и не исключено, что она зависит от стабильности вторичной и третичной структуры участков мРНК (см. гл. В.V).

Следует обратить особое внимание на некодирующие последовательности в мРНК. Их значение, в частности, может состоять в детерминации специальных пространственных (вторичных и третичных) структур, регулирующих инициацию трансляции, элонгацию и переход рибосом от одного цистрона к другому, а также присоединение к мРНК специальных узнающих белков, воздействующих на трансляцию.

Рекомендуемая литература

Биологическое воспроизведение макромолекул: Пер. с англ./Под ред. В. Л. Рызкова. М.: ИЛ, 1960. С. 209–246.

Биосинтез белка и его регуляция: Пер. с англ./Под ред. Я. М. Варшавского. М.: Мир, 1967. С. 105–125; 237–258.

Живая клетка: Пер. с англ./Под ред. Г. М. Франка. М.: ИЛ, 1962. С. 203–221.

Молекулы и клетки: Пер. с англ./Под ред. Г. М. Франка. М.: Мир, 1968. С. 48–60.

Нуклеиновые кислоты: Пер. с англ./Под ред. А. Н. Белозерского. М.: Мир, 1965. С. 153–244.

Регуляторные механизмы клетки: Пер. с англ./Под ред. И. Б. Збарского. М.: Мир, 1964. С. 111–133; 150–163; 164–195; 278–306; 477–497.

Структура и функция клетки: Пер. с англ./Под ред. Г. М. Франка. М.: Мир, 1964. С. 9–55.

Ичас М. Биологический код: Пер. с англ. яз. М.: Мир, 1971.

Спирин А. С., Белозерский А. Н., Шугаева Н. В., Ванюшин В. Ф. Изучение видовой специфичности нуклеиновых кислот у бактерий. — Биохимия, 1957. Т. 22, № 4. С. 744–754.

The Genetic Code. — Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1966, v. 31.

The Mechanism of Protein Synthesis. — Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1969, v. 34.

Bosch L., ed. *The Mechanism of Protein Synthesis and Its Regulation.* Amsterdam, London: North-Holland, 1972, p. 395–464; 487–514.

Cohn W. E., Volkin E., eds. *mRNA: The Relation of Structure to Function.* Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology. N. Y.: Acad. Press, 1976, v. 19.

Davidson J. N., Cohn W. E., eds. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology.* N. Y.: Acad. Press, 1967, v. 7, p. 107–172.

Sionimski P., Borst P., Attardi G., eds. *Mitochondrial Genes.* N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.

Weissbach H., Pestka S., eds. *Molecular Mechanisms of Protein Biosynthesis.* N. Y.: Acad. Press, 1977, p. 555–601.

Woese C. R. *The Genetic Code: the Molecular Basis for Genetic Expression.* N. Y.: Harper & Row, 1967.

Avery O. T., MacLeod C. M., McCarty M. Studies in the Chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. — J. Exptl. Med., 1944, v. 78, p. 137–158.

Belozersky A. N., Spirin A. S. A correlation between the compositions of deoxyribonucleic and ribonucleic acids. — Nature, 1958, v. 182, p. 111–112.

Brenner S., Jacob F., Meselson M. An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. — Nature, 1961, v. 190, p. 576–581.

Crick F. H. C. The present position of the coding problem. — Brookhaven Symp. Biol., 1959, v. 12, p. 35–38.

Crick F. H. C. The origin of the genetic code. — J. Mol. Biol., 1968, v. 38, p. 367–379.

Crick F. H. C., Barnett L., Brenner S., Watts-Tobin R. J. General nature of the genetic code for proteins. — Nature, 1961, v. 192, p. 1227–1232.

Doty P., Boedtker H., Fresco J. R. et al. Secondary structure in ribonucleic acids. — Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1959, v. 45, p. 482–499.

Fiers W., Contreras R., Duerinck F. et al. Complete nucleotide sequence of bacteriophage MS2 RNA: Primary and secondary structure of the replicase gene. — Nature, 1976, v. 260, p. 500–507.

Gamov G., Rich A., Ycas M. The problem of information transfer from the nucleic acids to proteins. — Advan. Biol. Med. Phys., 1956, v. 4, p. 23–68.

Gros F., Hiatt H., Gilbert W. et al. Unstable ribonucleic acid revealed by pulse labeling of *Escherichia coli*. — Nature, 1961, v. 190, p. 581–585.

Grunberg-Manago M., Ochoa S. Enzymatic synthesis and breakdown of polynucleotides: Polynucleotide phosphorylase. — J. Amer. Chem. Soc., 1955, v. 77, p. 3165–3166.

Hershey A. D., Chase M. Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. — J. Gen. Physiol., 1952, v. 36, p. 39–56.

Jacob F., Monod J. Genetic regulatory mechanism in the synthesis of protein. — J. Mol. Biol., 1961, v. 3, p. 318–356.

Nirenberg M. W., Matthaei J. H. The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. — Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1961, v. 47, p. 1588–1602.

Orgel L. E. Evolution of the genetic apparatus. — J. Mol. Biol., 1968, v. 38, p. 381–393.

Shatkin A. J. Capping of eucaryotic mRNAs. — Cell, 1976, v. 9, p. 645–653.

Volkin E., Astrachan L. Phosphorus incorporation in *Escherichia coli* ribonucleic acid after infection with bacteriophage T2. — Virology, 1956, v. 2, p. 149–161.

Watson J. D., Crick F.H.C. Molecular structure of nucleic acids. — Nature, 1953, v. 171, p. 738–740.

Watson J. D., Crick F.H.C. Genetical implications of the structure of deoxyribose nucleic acid. — Nature, 1953, v. 171, p. 964–967.

Глава III

ТРАНСПОРТНЫЕ РНК И АМИНОАЦИЛ-tРНК-СИНТЕТАЗЫ

1. ОТКРЫТИЕ

Итак, информация для аминокислотной последовательности белков закодирована в виде нуклеотидной последовательности соответствующих днк матричных РНК. Триплетный кодон матрицы должен однозначно детерминировать определенную аминокислоту. Между тем, явного стерического соответствия структур аминокислот и соответствующих им кодонов не наблюдается, т. е. кодоны вроде бы никак не могут служить прямыми матричными поверхностями для аминокислот. Отсюда в 1955 г. Ф. Крик предложил свою «адапторную гипотезу», где он постулировал существование специальных малых адапторных РНК и специальных ферментов, ковалентно присоединяющих аминокислотные остатки к этим РНК. Согласно гипотезе, каждой аминокислоте соответствует свой вид адапторной РНК и свой фермент, присоединяющий только данную аминокислоту к данному адаптору. С другой стороны, адапторная РНК имеет нуклеотидный триплет (впоследствии названный антикодоном), комплементарный соответствующему кодону матричной РНК. Таким образом, узнавание кодона аминокислотой не является непосредственным, а осуществляется через систему адапторная РНК — фермент: специфический фермент узнает одновременно аминокислоту и определенную адапторную молекулу, так что они оказываются соединенными; в свою очередь, адаптор (с навешенной аминокислотой) узнает определенный кодон матричной РНК, так что присоединенная аминокислота становится приписанной именно данному кодону. В дополнение к решению проблемы узнавания, предложенный механизм предполагал также энергетическое обеспечение полимеризации аминокислот за счет химических связей, образованных между аминокислотными остатками и адапторными молекулами.

Поразительно, что все это вскоре было подтверждено экспериментально. В 1957 г. М. Хогланд, П. Замечник и М. Стефенсон в США и К. Огата и Х. Нохара в Японии сообщили об открытии относительно низкомолекулярной РНК («растворимой РНК») и специальной ферментной фракции («рН 5 фермент»), присоединяющей аминокислоты к этой РНК. Было показано, что образующаяся аминоацил-тРНК действительно является промежуточным соединением в переносе аминокислоты в полипептидную цепь белка. Впоследствии эта РНК была названа трансферной, а в русском переводе «транспортной» РНК, или тРНК, а соответствующие ферменты — аминоацил-тРНК-синтетазами.

В клетке для каждой из 20 аминокислот, которые участвуют в построении белка, существует своя аминоацил-тРНК-синтетаза. Таким образом, в прокариотических клетках существует 20 различных аминоацил-тРНК-синтетаз. Однако в эукариотических клетках ситуация сложнее, и в первую очередь из-за существования специальных аминоацил-тРНК-синтетаз в хлоропластах и митохондриях (в дополнение к основным цитоплазматическим синтетазам).

Что касается различных видов тРНК, то их всегда больше, чем число аминокислот и аминоацил-тРНК-синтетаз. Так, в бактериях (*E. coli*) имеется не менее 40 видов тРНК, кодируемых различными генами. Это значит, что несколько различных тРНК могут узнаваться одной и той же аминоацил-тРНК-синтетазой и, соответственно, соединяться с одной и той же аминокислотой; такие тРНК называются *изоакцепторными*. Разные изоакцепторные тРНК могут узнавать разные кодоны для данной аминокислоты. Например, в *E. coli* имеется пять различных лейциновых тРНК, с антикодонами CAG, GAG, NAG (N — неидентифицированное производное одного из оснований), САА и А*АА, узнающих шесть лейциновых кодонов; из них тРНК^{Leu}₁ узнает лейциновый кодон CUG (антикодон CAG), а тРНК^{Leu}₅ узнает лейциновые кодоны UUA и UUG (антикодон А*АА, где А* — неидентифицированное производное А). В некоторых случаях изоакцепторные тРНК, различающиеся по первичной структуре, могут узнавать одни и те же кодоны, имея похожие антикодоны. В цитоплазме эукариотических клеток ситуация аналогична.

Эукариотические митохондрии имеют собственный набор тРНК, который значительно проще такового цитоплазмы: здесь существует всего 23—24 вида тРНК, обладающих различными антикодонами, и они оказываются достаточными для узнавания всех 61—62 смысловых кодонов митохондриальных мРНК.

2. СТРУКТУРА тРНК

Первичная структура

В 1965 г. Р. Холли с сотр. сообщили о нуклеотидной последовательности первой молекулы тРНК. Это была аланиновая тРНК дрожжей (рис. 12). С тех пор были расшифрованы многие десятки последовательностей различных тРНК из разнообразных источников. Все они имеют ряд общих черт.

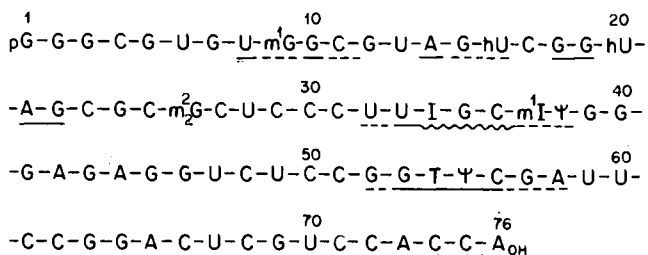


Рис. 12. Нуклеотидная последовательность аланиновой тРНК дрожжей (тРНК^{Ala}) (по R. W. Holley et al. Science, 1965, v. 147, p. 1462-1465; J. R. Penswick et al. FEBS Lett., 1975, v. 50, p. 28-31):

волнистой линией выделен антикодонный триплет; сплошной — подчеркнуты консервативные (инвариантные) нуклеотидные остатки и последовательности; пунктирной — остатки, в которых консервированы либо пуриновые, либо пиримидиновые основания в других тРНК

Длина цепей тРНК варьирует от 74 до 95 нуклеотидных остатков. Все тРНК кончаются на 3'-конце универсальной тринуклеотидной последовательностью ССА_{ОН}; именно концевой инвариантный аденозин акцептирует аминокислотный остаток при образовании аминоацил-тРНК.

Антикодонный триплет находится приблизительно в середине цепи тРНК (IGC в положении 34—36 на рис. 12). С 5'-стороны от него всегда находятся два пиримидиновых остатка, а с 3'-стороны — часто два пуриновых остатка, хотя второй остаток может быть и пиримидиновым, как в случае тРНК^{Ala} (рис. 12). Эти семь нуклеотидных остатков вместе образуют так называемую «антикодонную петлю» (АС-петлю), взаимодействующую с мРНК и обладающую характерной пространственной структурой (см. ниже).

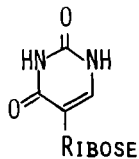
Приблизительно на расстоянии 1/3 общей длины цепи тРНК от ее 3'-конца располагается общий для большинства тРНК участок с последовательностью GTΨС или, гораздо реже, GUΨС (Gm¹ΨΨС у архебактерий), фланкируемый с обеих сторон пуриновыми остатками. В инициаторных тРНК_F^{Met} эукариотов он заменен на GAΨС или GAUC. Это — наиболее четко выраженная протяженная универсальная последовательность тРНК. (В митохондриальных тРНК, однако, она сильно варьирует.)

Необходимо отметить также довольно консервативные части последовательности в пределах от 8-го до 25-го нуклеотидных остатков цепей тРНК. Здесь имеются также инварианты, такие как U или его тиопроизводное (s⁴U) в положении 8, G или его метильное производное (m²G) в положении 10, AG или AA в положении 14—15, GG в положениях 17—21, AG в положениях 21—24 различных тРНК.

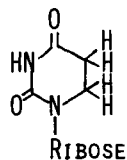
Уже из рассмотрения последовательности одной тРНК (рис. 12) видно, что, в дополнение к четырем главным типам нуклеотидных остатков (A, G, C, U), полинуклеотидная цепь тРНК характеризуется наличием разнообразных модифицированных нуклеозидов, часто называемых «минорными». Они образуются в результате посттранскрипционной

энзиматической модификации обычных нуклеозидных остатков в специфических местах полинуклеотидной цепи тРНК. К настоящему времени идентифицировано несколько десятков различных модифицированных нуклеозидов в тРНК. Риботимидин (5-метилуридин, обозначаемый как Т или m^5U) и псевдоуридин (5-рибофуранозилурацил, Ψ) присутствуют почти во всех тРНК и особенно характерны для универсальной последовательности GT Ψ C (рис. 13). 5,6-дигидроуридин (hU или D) тоже является почти универсальным «минорным» остатком, особенно в районе 15-го — 24-го нуклеотидов цепи. У бактерий в положении 8 типичен 4-тиоуридин (s^4U). Наиболее распространенные «минорные» остатки — различные метилированные производные обычных нуклеозидов, такие как 1-метилгуанозин (m^1G), N²-метилгуанозин (m^2G), N², N²-диметилгуанозин (m^2_2G), 7-метилгуанозин (m^7G), 2'-О-метилгуанозин (G^m), 1-метиладенозин (m^1A), 2-метиладенозин (m^2A), N⁶-метиладенозин (m^6A), 2'-О-метиладенозин (A^m), 3-метилцитидин (m^3C), 5-метилцитидин (m^5C), 2'-О-метилцитидин (C^m) и т. д. (рис. 14).

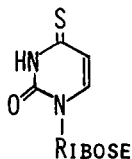
В первом положении антикодона могут быть немодифицированные G и C, но практически не бывает A и U. A в первом положении антикодона обычно дезаминирован, таким образом представляя собой I (рис. 15); I здесь особенно типичен для тРНК эукариот (тРНК^{Ile}, тРНК^{Val}, тРНК^{Ser}, тРНК^{Pro}, тРНК^{Thr}, тРНК^{Ala}, тРНК^{Arg}). Что касается U, то он в первом положении антикодона представлен 5-метоксиуридином (m^5U) или 5-карбоксиметоксиуридином (уридин-5-оксиуксусная кислота; cm^5U или V) в тРНК^{Ala}, тРНК^{Ser} и тРНК^{Val} бактерий, 5-метиламинометил-2-тиоуридином (mnm^5s^2U) в тРНК^{Glu} и тРНК^{Lys} бактерий, 5-(метоксикарбонилметил)-2-тиоуридином (mcm^5s^2U) в тРНК^{Glu} и тРНК^{Lys} грибов или 5-(метоксикарбонилметил)уридином (mcm^5U) в тРНК^{Arg} грибов. Немодифицированный U обнаружен лишь у одной из тРНК^{Gly} некоторых бактерий и у одной из дрожжевых тРНК^{Leu}, но весьма типичен для митохондриальных тРНК как грибов, так и млекопитающих. Для первого положения антикодона таких тРНК, как тРНК^{Asp}, тРНК^{Asn}, тРНК^{His}, тРНК^{Tyr} бактерий и животных оказался характерным гипермодифицированный G — так называемый «кьюозин» (Q), который является 7-[[*(уис-4,5-диокси-2-циклопентен-1-ил) амино*]метил]-7-деазагуанозином. Особым типом модификации («гипермодификацией») часто характеризуется пуриновый нуклеозид антикодоновой петли, примыкающий к антикодону с 3'-стороны. Например, остаток, фланкирующий антикодон с 3'-стороны, представлен N⁶-изопентениладенозином (i^6A) в эукариотических тРНК^{Cys}, тРНК^{Ser} и тРНК^{Tyr} или N⁶-изопентенил-2-метилтиоаденозином (ms^2i^6A) в аналогичных тРНК бактерий, или N⁶-(треонинакарбонил)аденозином, обозначаемым также как N-[N-(9-β-D-рибофуранозил)пуридин-6-ил] карбамоилтреонин (t^6A), в тРНК^{Ile}, тРНК^{Thr}, тРНК^{Lys}, тРНК^{Met} как эукариот, так и бактерий (рис. 16). Еще более



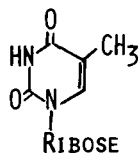
Псевдоуридин (Ψ)



Дигидроуридин (D или hU)

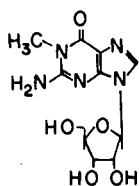


4-Тиоуридин (s^4U)

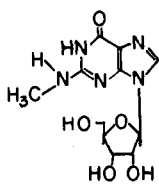


Риботимидин (T)

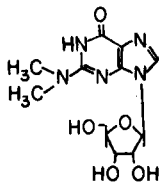
Рис. 13. Модифицированные производные уридина, широко встречающиеся в ТРНК



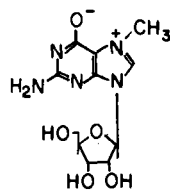
1-Метилгуанозин (m^1G)



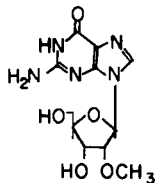
N^2 -Метилгуанозин (m^2G)



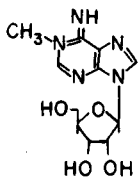
N^2, N^2 -Диметилгуанозин (m^2_2G)



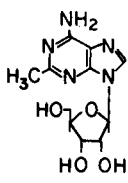
7-Метилгуанозин (m^7G)



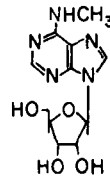
2'-O-Метилгуанозин (Gm)



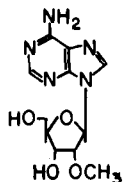
1-Метиладенозин (m^1A)



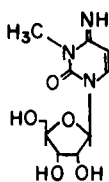
2-Метиладенозин (m^2A)



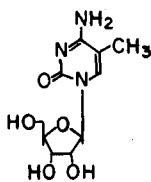
N^6 -Метиладенозин (m^6A)



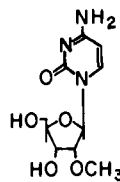
2'-O-Метиладенозин (Am)



3-Метилцитидин (m^3C)

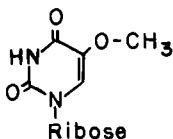


5-Метилцитидин (m^5C)

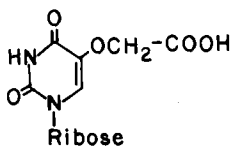


2'-O-Метилцитидин (Cm)

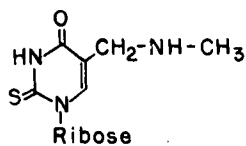
Рис. 14. Метилированные производные гуанозина, аденозина и цитидина, встречающиеся в ТРНК



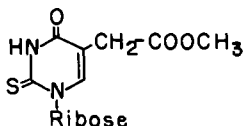
МЕТОКСИУРИДИН (мо⁵U)



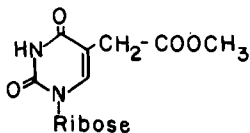
5-КАРБОКСИМЕТОКСИУРИДИН
(смo⁵U ИЛИ V)



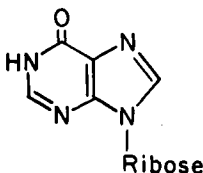
5-МЕТИЛАМИНОМЕТИЛ-
-2-ТИОУРИДИН (mnm⁵s²U)



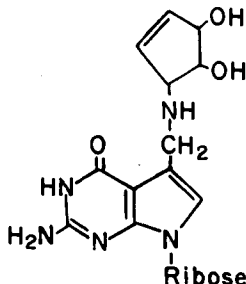
5-(МЕТОКСИКАРБОНИЛМЕТИЛ)-
-2-ТИОУРИДИН (mcm⁵s²U)



5-(МЕТОКСИКАРБОНИЛМЕТИЛ)УРИДИН
(mcm⁵U)



ИНОЗИН (I)



КЬЮОЗИН (Q_{uo} ИЛИ Q)

Рис. 15. Модифицированные нуклеозиды, встречающиеся в первом положении антикодона тРНК

«гипермодифицировано» это положение в цепи тРНК^{Phe} всех эукариот: оно представлено так называемым уайбутозином (yW или Y) или его оксипроизводным (oyW).

Вторичная структура

Рассмотрение уже первой расшифрованной первичной структуры тРНК (тРНК^{Ala} дрожжей) открывает ряд интересных черт, касающихся возможного складывания цепи во вторичную структуру. Так, видно (см. рис. 12), что имеется значительная комплементарность 5'-концевого участка (положения 1—7) участку, близкому к 3'-концу цепи (положения 66—72), при их антипараллельном расположении. Кроме того, три внутренние секции цепи тРНК оказываются взаимокomплементарными при складывании их на себя, будучи, таким образом, способными

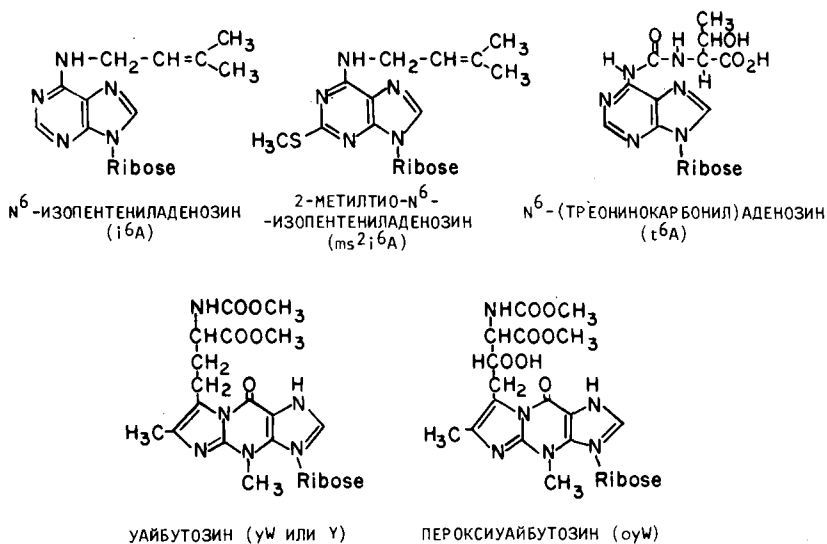


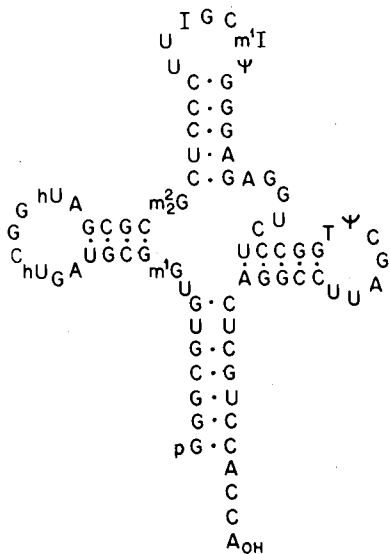
Рис. 16. «Гипер-модифицированные» нуклеозиды, встречающиеся в положении, непосредственно примыкающем к антикодону с 3'-стороны

образовывать шпилькообразные структуры; это участок с 10-го по 25-й остаток, участок с 27-го по 43-й остаток и участок с 49-го по 65-й остаток, где две терминальные четырех-пяти-нуклеотидные последовательности каждого отрезка комплементарны друг другу. Спаривание указанных комплементарных последовательностей дает структуру, схематически изображенную на рис. 17 и получившую название структуры типа клеверного листа. Наиболее замечательным оказалось то, что нуклеотидные последовательности всех тРНК, изученных с тех пор, характеризовались теми же правилами самокомплементарности и, соответственно, могли быть сложены в полностью аналогичные «клеверные листья». Части «клеверного листа» были обозначены как *акцепторный*, или *AA черешок* с универсальной 3'-концевой последовательностью CCA, акцептирующей аминокислотный остаток; *дигидроуридиловая*, или *D шпилька* с соответствующей петлей, несколько варьирующей по длине и содержащей, как правило (но не обязательно), от одного до пяти дигидроуридиловых остатков, *антикодonoвая*, или *AC шпилька* с антикодonoвой петлей постоянной длины в семь нуклеотидных остатков и *тимидилпсевдоуридиловая*, или *T шпилька*, несущая петлю с универсальной последовательностью GTΨC_A^GA. В дополнение, в «клеверном листе» выделяют также *варибельную* или *V петлю*, располагающуюся между антикодonoвой и T-шпильками; в тРНК^{Ala} она мала (5 нуклеотидных остатков), но у других тРНК она может достигать длины 15–20 остатков (тРНК^{Leu}, тРНК^{Ser}, бактериальная тРНК^{Tyr}).

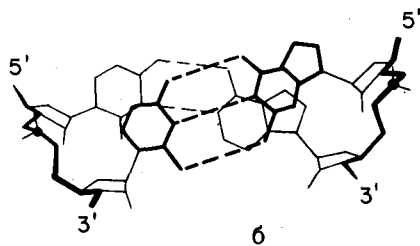
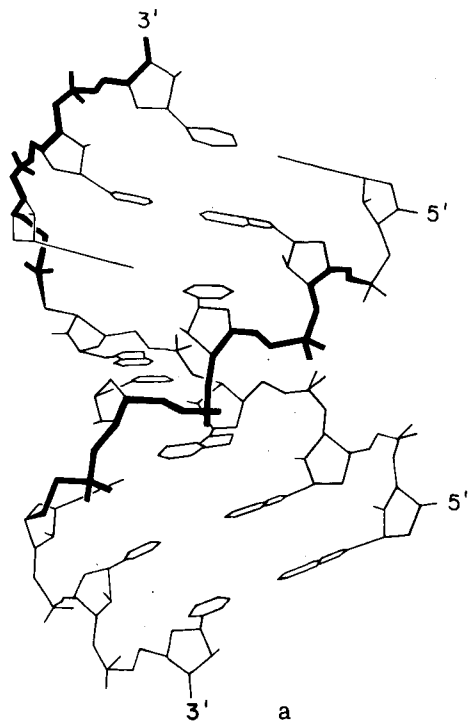
Рис. 17. Схема вторичной структуры аланиновой тРНК дрожжей («клеверный лист») (по R. W. Holley et al. Science 1965, v. 147, p. 1462–1465)

Рис. 18. Фрагмент скелетной модели двойной спирали РНК (А-форма), показывающей только ковалентные связи:

вверху — вид сбоку (приведены семь пар нуклеотидных остатков; участки полинуклеотидного остова, обращенные к зрителю, изображены утолщенными линиями); **внизу** — вид с торца спирали, демонстрирующий стэкинг оснований (для ясности приведены лишь две нуклеотидные пары; пара, обращенная к зрителю, изображена утолщенными линиями; пунктирными линиями показаны водородные связи)



Дрожжевая тРНК^{Ala}



В структурном отношении спаренная (двухцепочечная) часть каждой спильки и черешка представляет собой двойную спираль. Двойная спираль РНК характеризуется 11 парами нуклеотидных остатков на виток. Параметры этой спирали близки к таковым А-формы ДНК. Это и есть основной элемент вторичной структуры тРНК (рис. 18). Кроме канонических (Уотсон—Криковских) пар оснований G · C и A · U, в двуспиральных участках тРНК нередко реализуется пара G · U, наиболее близкая по пространственным параметрам к каноническим парам (рис. 19; см. цветную вкладку).

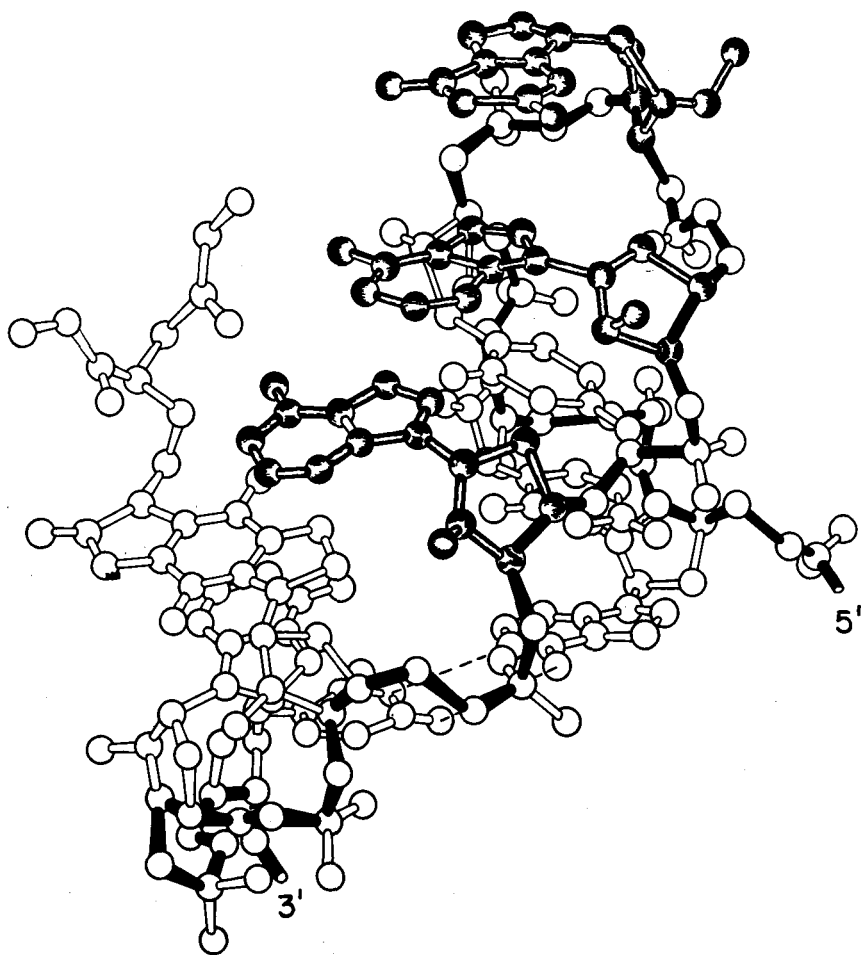


Рис. 20. Антикодоновая петля фенилаланиновой тРНК дрожжей: шаростержневая модель (водороды не показаны) ход полинуклеотидного остъва показан черным цветом; три нуклеотидных остатка антикодона заштрихованы

Другой характер носит вторичная структура неспаренных участков, таких как петли и акцепторный $\overset{A}{G}$ ССА-конец. Здесь часто имеется односпиральное расположение нескольких остатков, поддерживаемое межплоскостными взаимодействиями («стэкинг») оснований. Структура антикодоновой петли представляет особый интерес (рис. 20): три основания антикодона и два последующих основания, примыкающие к нему с 3'-стороны, находятся в едином «стэкинге» друг с другом и образуют одностержневую правозакрученную спираль со своеобразными параметрами, так что первое основание антикодона помещается на самой

верхушке шпильки, а группы, образующие водородные связи, у всех трех оснований антикодона оказываются экспонированными наружу. Последнее, очевидно, принципиально важно для взаимодействия с кодоном мРНК. Черты первичной структуры антикодоновой петли способствуют поддержанию ее пространственной структуры описанного типа: гипермодифицированное пуриновое основание, непосредственно примыкающее к антикодону с 3'-стороны, а также следующее основание, часто являющееся пурином, должны обеспечивать стабильные межплоскостные взаимодействия в однотяжевой спирали, а два «маленьких» (пиримидиновых) основания с 5'-стороны антикодона, и особенно примыкающий к нему инвариантный U, создают резкий перегиб цепи (между антикодоном и U) и поддерживают конформацию петли, в частности за счет водородной связи между азотом инвариантного U и фосфатной группой 3-го остатка кодона.

Интересно, что похожую односпиральную конформацию с аналогичным «уридиновым поворотом» имеет T-петля (там роль инвариантного U играет Ψ).

Третичная структура

Впервые трехмерная структура тРНК была расшифрована для дрожжевой тРНК^{Phe} с помощью рентгеноструктурного анализа ее кристаллов одновременно в США группой Александра Рича и в Великобритании группой Аарона Клуга в 1974 г. Многочисленные косвенные данные, а затем и прямая расшифровка трехмерных структур еще нескольких тРНК показали, что основной рисунок складывания цепи тРНК в третичную структуру является универсальным. Схематически это складывание можно представить следующим образом. Акцепторный черешок и T-шпилька располагаются вдоль одной оси, формируя как бы непрерывную двойную спираль из 12 пар нуклеотидов; антикодоновая шпилька и дигидроуридиловая шпилька тоже располагаются вдоль одной оси и формируют другую двойную спираль, включающую 9 пар нуклеотидов; эти две спирали ориентируются друг по отношению к другу приблизительно под прямым углом так, что дигидроуридиловая петля оказывается сближенной с T-петлей и скрепленной взаимодействием GG-инварианта с Ψ C-инвариантом (рис. 21). Получается что-то вроде буквы L, где вершины двух ее ветвей представляют собой антикодон и акцепторный 3'-конец. На дигидроуридиловую спираль у внутреннего угла L-образной молекулы накладывается еще короткая однотяжевая перемычка между акцепторным черешком и дигидроуридиловой спиралью (остатки 8—9), часть дигидроуридиловой петли и дополнительная варибельная петля, в результате чего образуется так называемое «ядро» молекулы с большим количеством третичных взаимодействий. Это ядро можно видеть как сгущение и переплетение отрезков цепи в районе угла, особенно с его внутренней стороны, на схематическом рисунке модели дрожжевой тРНК^{Phe} (рис. 22).

Длина каждой ветви L-образной молекулы тРНК около 7 нм, а толщина молекулы около 2 нм. Расстояние между антикодоном и акцептор-

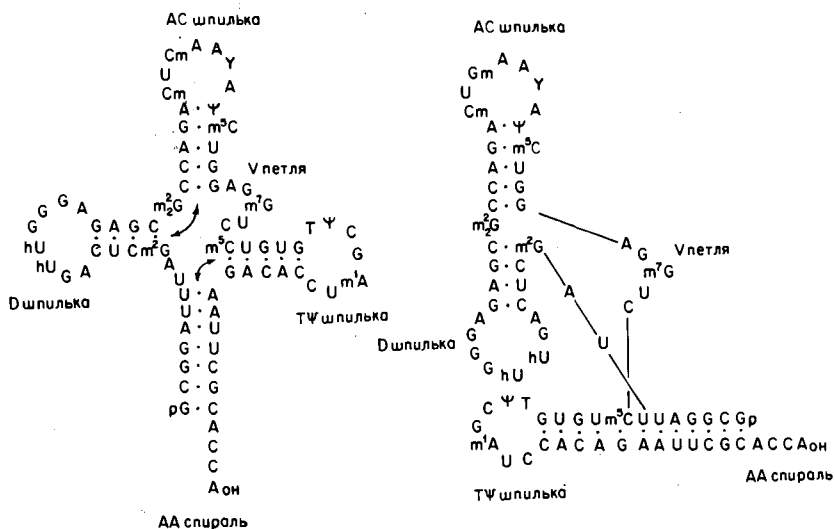


Рис. 21. Схема складывания спиральных участков тРНК (дрожжевая тРНК^{Phe}) в третичную структуру (по S. H. Kim et al. Science, 1974, v. 185, p. 435–440)

ным концом составляет 7,6–7,8 нм. Все три основания антикодона на вершине одной из ветвей обращены на внутреннюю сторону угла L-образной молекулы.

В создании и поддержании третичной структуры тРНК реализуется много неканонических (не Уотсон — Криковских) взаимодействий между основаниями цепи. Прежде всего, угол L-образной молекулы тРНК крепится как межплоскостными взаимодействиями, так и взаимодействиями через водородные связи между дигидроурициловой петлей и Т-петлей. Взаимодействие между инвариантами G19 и C56 — Уотсон — Криковского типа (см. рис. 19, б), но взаимодействие между инвариантами G18 и Ψ55 очень своеобразно и включает водородные связи атома О при С4 пиримидинового кольца Ψ как с N1, так и с N при С2 пуринового кольца G (рис. 23, а; см. цветную вклейку). Кроме того, имеется необычное сильное межплоскостное взаимодействие между тремя гуанозиновыми остатками в том же углу: G57 оказывается вставленным (интеркалированным) между G18 и G19. Более того, G57 через N при С2 взаимодействует водородными связями с рибозами G18 и G19, а через N7 — водородной связью с рибозой Ψ55.

Еще более сложные третичные взаимодействия возникают в «ядре». Как уже отмечалось, здесь переплетаются четыре разных участка полинуклеотидной цепи. Характерна неканоническая пурин-пуриновая пара G·A (или A·G, в зависимости от вида тРНК) между остатками 26 и 44 (рис. 23, б). Спаривание G·C (или, в других тРНК, A·U) между остатками 15 и 48 необычно для двойных спиралей с антипараллельным расположением цепей; здесь направление цепей параллельное (рис. 23, в). Еще более необычным является спаривание A с U между остатками 14 и 8, где в образовании водородной связи участвует N7 пуринового

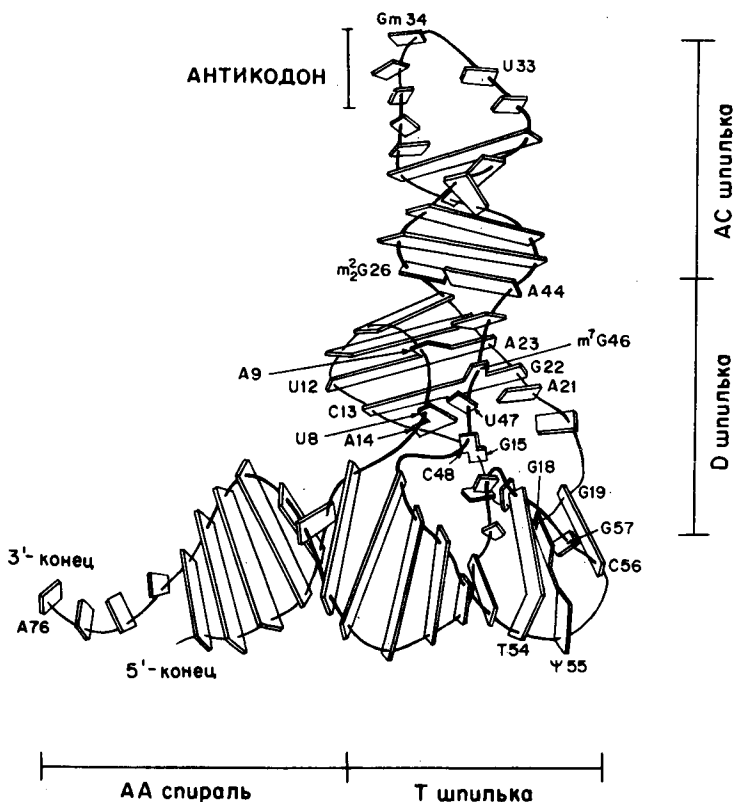


Рис. 22. Схема третичной структуры тРНК (дрожжевая тРНК^{Phe}) (по А. Rich, S. H. Kim, Scientific American, 1978, v. 238, p. 52–62)

кольца (рис. 23, з). Для этой части молекулы характерны также тройные водородные взаимодействия оснований, такие как U · A · A (или, в других тРНК, эквивалентные им G · C · G или U · A · G) между остатками 12, 23 и 9, соответственно (рис. 24, верх; см. цветную вклейку) и C · G · G (или эквивалентный U · A · A) между остатками 13, 22 и 46, соответственно (рис. 24, низ). Стереорепрезентация масштабной атомной модели тРНК дано на рис. 25 (см. цветную вклейку).

3. АМИНОЦИЛ-тРНК-СИНТЕТАЗЫ

Несмотря на универсальность основных черт пространственной структуры тРНК, аминоксил-тРНК-синтетазы оказались довольно различными белками в зависимости от их аминокислотной специфичности. В основном это крупные белки с молекулярной массой приблизительно от 100000 до 400000 дальтон, обладающие четвертичной структурой, хотя среди них имеются и мономерные ферменты. Четвертичные структуры синтетаз построены из двух или четырех белковых субъединиц, которые

могут быть или идентичны, или различны. Например, тирозил-тРНК-синтетаза бактерий построена из двух идентичных субъединиц с молекулярной массой 47000 дальтон каждая, а метиониновая синтетаза бактерий состоит из двух идентичных субъединиц с молекулярной массой около 80000—90000 дальтон каждая (тип α_2). Фенилаланиновая аминоксил-тРНК-синтетаза бактерий, так же как и дрожжей, построена из четырех субъединиц двух видов, с молекулярными массами около 50000 и 60000 дальтон (тип $\alpha_2 \beta_2$). Такие аминоксил-тРНК-синтетазы бактерий, как валиновая, лейциновая и изолейциновая, являются мономерными ферментами (тип α_1), т. е. представляют собой одну полипептидную цепь с молекулярной массой около 110000 дальтон. В последнем случае, однако, полипептидная цепь состоит, по-видимому, из двух гомологичных частей, формирующих два похожих домена с массой около 50000—60000 дальтон каждый. В то же время цистеиновая и глутаминовая аминоксил-тРНК-синтетазы бактерий построены из одной полипептидной цепи (тоже тип α_1) с молекулярной массой 40000—60000 дальтон и, скорее всего, не имеют подразделения на два гомологичных участка. Мономером является и аргинил-тРНК-синтетаза, имеющая молекулярную массу около 70000 дальтон.

Как правило, синтетазы одной и той же аминокислотной специфичности, выделенные из разных источников, имеют похожую четвертичную структуру и близкие размеры полипептидных цепей. Однако синтетазы эукариотических клеток, по сравнению с прокариотическими, характеризуются несколько большим размером субъединиц.

Несмотря на отмеченное разнообразие, для большинства аминоксил-тРНК-синтетаз можно предложить обобщенную схему их субъединичной или доменной структуры. Во всяком случае, если не всегда, то часто синтетазы с молекулярной массой около 100000 состоят либо из двух субъединиц, либо из двух похожих доменов. Синтетазы с большими молекулярными массами (около 200000) являются как бы «удвоенными» ферментами вышеуказанного типа. Таким образом, если основной блок (домен или субъединица) фермента имеет молекулярную массу от 35000 до 60000, то многие аминоксил-тРНК-синтетазы оказываются построенными по схеме: $(35000-60000)_2 \times 1$ или 2. Однако основной блок может быть в некоторых случаях значительно крупнее; например, аланиновая синтетаза бактерий построена из четырех или двух идентичных субъединиц с молекулярной массой 100000 дальтон каждая, причем в ее аминокислотной последовательности не наблюдается повторов. С другой стороны, уже приводился пример цистеиновой аминоксил-тРНК-синтетазы, которая, по-видимому, не является ферментом вышеуказанного двухсубъединичного или двухдоменного типа. Аргинил-тРНК-синтетаза тоже не обнаруживает черт двухдоменной организации.

Как бы то ни было, согласно функциональным тестам, большинство аминоксил-тРНК-синтетаз (но не аргининовая!) обладают двойным набором субстратсвязывающих мест, т. е. они димеры также и в функциональном смысле. Активные центры, однако, не полностью независимы, а оказывают заметное влияние друг на друга в полном димерном (или двухдоменном) ферменте, проявляя известную кооперативность.

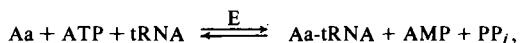
Необходимо отметить ряд особенностей эукариотических, и в пер-

вую очередь животных, аминоксил-тРНК-синтетаз. Как и многие другие белки белоксинтезирующего аппарата эукариотической клетки (см., например, EF-1 в разделе В. II.2), эукариотические синтетазы, и особенно таковые клеток млекопитающих, организованы в крупные многоферментные комплексы, или агрегаты. В клеточных экстрактах они чаще всего обнаруживаются как компоненты с коэффициентами седиментации от 12S до 30S и молекулярными массами от $3 \cdot 10^5$ до 10^6 и более дальтон. Одна и та же синтетаза может содержаться в комплексе различной величины — например, лизил-тРНК-синтетаза печени крысы обнаруживается в компонентах 24S, 18S и 12S. Комплексы могут быть выделены и очищены. Так, из ряда клеток млекопитающих выделяется комплекс с молекулярной массой около 10^6 дальтон, содержащий семь аминоксил-тРНК-синтетаз, специфичных для лизина, аргинина, глутамина, глутаминовой кислоты, лейцина, изолейцина и метионина. Однако существование в виде комплекса не обязательно для их активности: с одной стороны, они могут существовать в клетках и в индивидуальном виде, а с другой, в составе комплекса они работают независимо друг от друга. Помимо синтетаз, в составе комплексов могут быть другие белки, обслуживающие белоксинтезирующий аппарат клетки.

Другая особенность эукариотических аминоксил-тРНК-синтетаз состоит в том, что значительная их доля оказывается ассоциированной непосредственно с белоксинтезирующими частицами клетки (полирибосомами). Ассоциация довольно лабильна и обратима, но, тем не менее, в каждый данный момент большая часть аминоксил-тРНК-синтетаз клетки, по-видимому, сконцентрирована при функционирующих рибосомах. Эта особенность эукариотических систем обусловлена, скорее всего, молекулярными свойствами ферментов. Действительно, было показано, что в отличие от прокариотических аминоксил-тРНК-синтетаз, их эукариотические аналоги имеют довольно сильное неспецифическое сродство к высокомолекулярным РНК, включая мРНК и рибосомные РНК. Именно это сродство (РНК-связывающая способность) эукариотических синтетаз может обеспечивать их частичную компартментализацию на белоксинтезирующих частицах.

4. АМИНОАЦИЛИРОВАНИЕ тРНК

Присоединение аминокислоты к 3'-концу тРНК, катализируемое аминоксил-тРНК-синтетазой, сопряжено с расщеплением АТФ. Суммарная реакция процесса может быть записана как



где Aa — аминокислота; Aa-tRNA — аминоксил-тРНК; PP_i — неорганический пирогосфат. Оказалось, что фермент катализирует две различные реакции, являющиеся двумя последовательными стадиями вышеописанного процесса.

Реакция первой стадии, катализируемая аминоксил-тРНК-синтетазой — это так называемая реакция *активации аминокислоты*, где карбоксильная группа аминокислоты атакует связь между α - и β -фосфатными

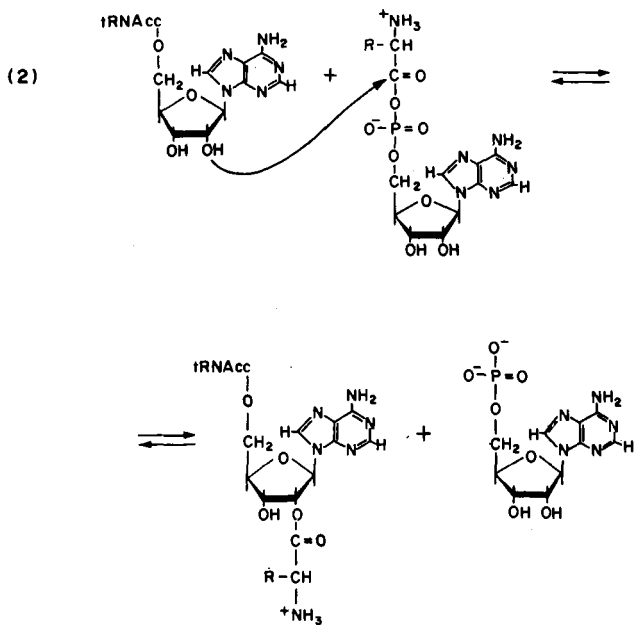
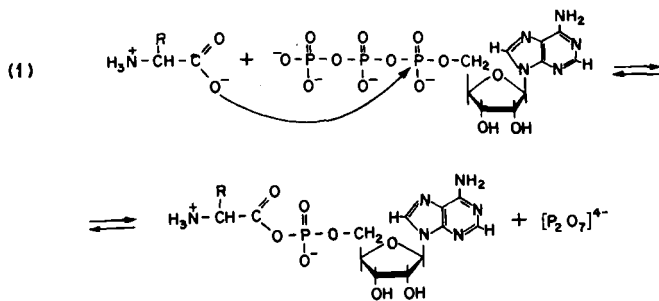
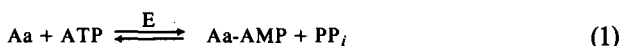


Рис. 26. Реакции активации аминокислоты (1) и акцептирования аминокислотного остатка молекулой тРНК (2), катализируемые аминоацил-тРНК-синтетазой

остатками АТФ, в результате чего образуется смешанный ангидрид аминокциладенилат и неорганический пирофосфат (рис. 26, 1):



Эта реакция обратима и легко прослеживается с помощью теста пирофосфатного обмена: если в реакционную смесь добавить [^{32}P]пирофосфат, то в ней скоро обнаруживается [^{32}P]АТФ. Образовавшийся в реакции (1) аминокциладенилат остается связанным с ферментом и не освобождается в раствор.

Указанная реакция, а следовательно, и суммарная реакция оказывается сильно сдвинутой вправо, в сторону синтеза аминокциладенилата и аминокцил-тРНК, благодаря протеканию реакции гидролиза неорганического пирофосфата, катализируемой пирофосфатазой. Таким образом, тот факт, что в результате реакции активации аминокислоты освобождается пирофосфат, далее гидролизуемый до неорганического ортофосфата, играет важную роль в энергетическом обеспечении направленности всего процесса.

Реакция второй стадии, катализируемая тем же ферментом, — собственно реакция *ацеттирования аминокислоты*, где 2'- или 3'-гидроксил рибозы 3'-концевого аденозина тРНК атакует ангидридную группировку аминокциладенилата с образованием сложноэфирной связи между аминокцильным остатком и рибозой тРНК и с сопутствующим освобождением АМФ (рис. 26,2):



Случай аргинил-тРНК-синтетазы представляет собой, по-видимому, исключение: здесь не удастся обнаружить стадии образования аминокциладенилата как промежуточного продукта.

Интересно, что разные аминокцил-тРНК-синтетазы обладают разной специфичностью в отношении гидроксила рибозы, участвующего в реакции трансацелирования. Например, фенилаланил-, лейцил-, изолейцил-, валил-, метионил-, аргинил-тРНК-синтетазы присоединяют аминокислоту к 2'-гидроксилу, в то время как серил-, глицил-, треонил-, гистидил-, пролил-тРНК-синтетазы — к 3'-гидроксилу. Тирозиновая и цистеиновая аминокцил-тРНК-синтетазы катализируют реакцию как с 2'-, так и с 3'-гидроксилом. Для дальнейшего участия образовавшейся аминокцил-тРНК в трансляции это не имеет принципиального значения, так как в водном растворе наблюдается легкая спонтанная миграция (через образование 2',3'-цикла) аминокцильного остатка между 2'- и 3'-гидроксилами, с установлением равновесия между обеими формами (рис. 27).

Таким образом, из вышеприведенного описания реакций, приводящих к аминокцилированию тРНК, следует, что фермент аминокцил-тРНК-синтетаза использует три субстрата различной химической природы: АТФ, аминокислоту и тРНК. Соответственно, он должен иметь три различных субстратсвязывающих места. АТФ является универсальным субстратом всех аминокцил-тРНК-синтетаз, в то время

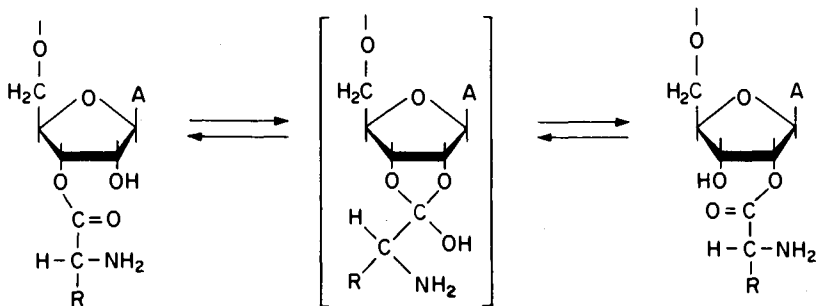


Рис. 27. Спонтанная миграция aminoacyльного остатка между 2'- и 3'- положениями рибозы конечного аденозина тРНК через образование короткоживущего промежуточного соединения.

как по отношению к аминокислоте и к тРНК каждая aminoacyл-тРНК-синтетаза проявляет высокую специфичность.

Уже отмечалось, что во многих случаях aminoacyл-тРНК-синтазы являются димерами или псевдодимерами и, соответственно, несут два набора субстратсвязывающих мест. Субстратсвязывающие места как в пределах каждой субъединицы (или эквивалентного ей домена), так и на разных субъединицах (или доменах) оказываются взаимозависимыми. Прежде всего, часто наблюдается синергизм в связывании различных субстратов: связывание одного субстрата облегчает связывание другого. С другой стороны, в связывании двух молекул тРНК отмечается отрицательная кооперативность, т. е. связывание одной молекулы тРНК делает менее прочным связывание другой молекулы тРНК.

Рассмотрим примерную схему последовательности присоединения субстратов к димерному ферменту, изображенную на рис. 28. Если начать со свободного от субстратов фермента (верхняя часть рисунка), то первыми стадиями часто является связывание малых субстратов — АТФ и аминокислоты, — причем связывание одного стимулирует связывание другого (синергизм). Между связанными субстратами на ферменте происходит реакция образования aminoacyладенилата с освобождением пирогосфата в раствор. Связывание малых субстратов и образование aminoacyладенилата в свою очередь стимулируют связывание тРНК, в результате чего происходит реакция aminoacyлирования тРНК на ферменте и освобождение АМФ в раствор. Aminoacyл-тРНК, пока она одна на фермент, диссоциирует от фермента довольно медленно, и здесь стимулирующую роль в ее диссоциации играет связывание второй молекулы тРНК. Получается цикл, изображенный на нижней части рис. 28, где в работающем ферменте один из центров связывания тРНК перманентно занят и, следовательно, фермент проявляет реактивность лишь половины своих субстратсвязывающих мест.

В естественных условиях, когда фермент циклически работает в избытке субстратов, имеет место, по-видимому, тот цикл, который изображен на нижней части рис. 28. Начнем с состояния 1, когда ак-

тивный центр одной субъединицы (или домена) занят аминокислотой-тРНК, а другой пуст. Следовательно, лишь субстраты, связывающиеся в другом активном центре фермента способны связываться лиганды. Последовательное или независимое связывание малых субстратов — АТФ и аминокислоты (состояния 2 и 3) — приводит к образованию фермент-связанного аминокислотаденилата (состояние 4), что стимулирует посадку тРНК на второй активный центр фермента (состояние 5). Ввиду отмеченной выше отрицательной кооперативности, связывание тРНК со вторым активным центром ослабляет удержание аминокислот-тРНК в первом активном центре, так что последняя диссоциирует в раствор, оставляя фермент опять с одним занятым и другим вакантным активным центром (состояние 6). Таким образом, поочередно работает то один, то другой активный центр димерного (или двухдоменного) фермента. Конечный продукт — аминокислот-тРНК — не освобождается в раствор по завершении реакции ее синтеза, а «ждет», пока вторая субстратная тРНК не поступит во второй активный центр.

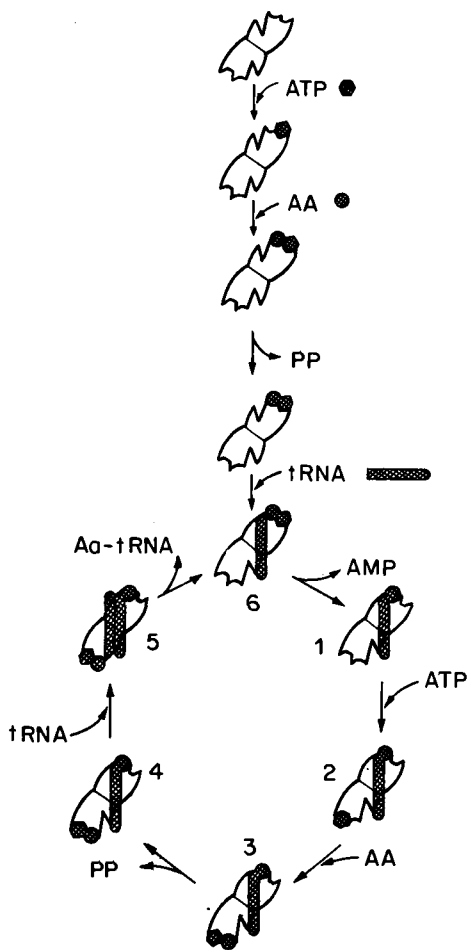


Рис. 28. Примерная схема последовательности событий при функционировании двухдоменной (или димерной) аминокислот-тРНК-синтетазы (по Э. Г. Малыгину и Л. Л. Киселеву. Биоорганическая химия, 1982, т. 8, с. 725—746)

5. СПЕЦИФИЧНОСТЬ АМИНОАЦИЛИРОВАНИЯ тРНК

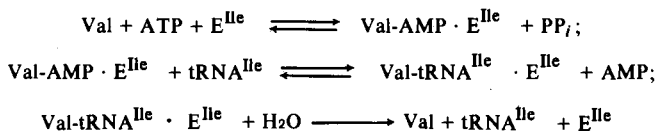
Специфичность по отношению к аминокислоте

Очевидно, что для обеспечения однозначности, с которой мРНК кодирует белки в процессе трансляции, аминокислот-тРНК-синтетазы должны обладать исключительно высокой специфичностью в выборе как аминокислоты, так и тРНК в качестве субстратов. В случае выбора аминокислоты ферменту приходится дискриминировать между субстратами, иногда очень близкими по структуре — например,

между изолейцином и валином. Уровень ошибок, которые допускает фермент в аминокислотном тРНК, действительно, очень низок, и даже в случае близких аминокислот (изолейцин — валин) он, по-видимому, не превышает 1 на 10000.

Однако при изучении стадий связывания аминокислоты и последующего обратимого образования аминокислотаденилата, регистрируемого по АТФ-пирофосфатному обмену, оказалось, что фермент не может обеспечить столь высокой специфичности в дискриминации близких аминокислот на этих стадиях. Так, изолейциновая аминокислотаденилат-синтетазы может довольно эффективно связывать валин и образовывать валиладенилат. Точно так же валиновая аминокислотаденилат-синтетазы может связывать и активировать изолейцин, а также аланин, серин, цистеин и треонин. Фенилаланиновый фермент активирует метионин, лейцин и тирозин. Тем не менее, ни одна из перечисленных ложноактивированных аминокислот не становится акцептированной на тРНК.

Оказалось, что в дополнение к дискриминации аминокислот на стадии связывания фермент может обладать специальным механизмом коррекции ошибок, вступающим в действие после образования аминокислотаденилата. Основной факт состоит в том, что связывание ферментом своей тРНК приводит к гидролитическому освобождению свободной аминокислоты, если она была чужой для фермента. По-видимому, в большинстве случаев ложноактивированная аминокислота, связанная с ферментом в виде аминокислотаденилата, далее нормально переносится на тРНК, но, в отличие от сложноэфирной связи между своей аминокислотой и тРНК, связь между чужой аминокислотой и тРНК гидролизуется ферментом:



Это значит, что здесь фермент получает второй шанс дискриминировать аминокислотные остатки, теперь уже в виде их сложноэфирных производных, и в случае чужого остатка активирует молекулу воды, которая атакует сложноэфирную связь. Показано, что в активации такого гидролиза валил-тРНК^{Ile} изолейцил-тРНК-синтетазой существенную роль играет свободный 3'-гидроксил рибозы тРНК.

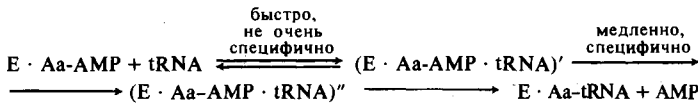
Возможно, что в некоторых случаях не исключен и другой механизм коррекции, где чужой аминокислотаденилат гидролизуется ферментом до переноса аминокислотного остатка на тРНК.

Специфичность по отношению к тРНК

Уже отмечалось, что связывание тРНК с аминокислотаденилат-синтетазой является многоступенчатым процессом. Первоначальное связывание не очень специфично, так что фермент может взаимодействовать с рядом чужих для него тРНК. Так, изолейциновая аминокислотаденилат-синтетазы

тРНК-синтетаза может связывать тРНК^{Val}, причем это связывание всего в 5 раз слабее связывания своей тРНК^{Ile}; связывание тРНК^{Glu} тоже имеет место, хотя оно уже в 10000 раз слабее связывания своей тРНК^{Ile}. В целом, для разных комбинаций аминоксил-тРНК-синтетаз с чужими тРНК обнаруживается самое разное сродство, от почти полного отсутствия до сравнимого со сродством к своей тРНК. Сродство ферментов к тРНК, как правило, возрастает с уменьшением рН и солевой концентрации, а также под действием органических растворителей, что указывает на значительную роль ионных взаимодействий в связывании. Соответственно, уменьшение рН, уменьшение ионной силы и введение органических растворителей в среду способствуют неспецифическому связыванию тРНК аминоксил-тРНК-синтетазами. Однако Mg²⁺ часто оказывает противоположное действие, понижая связывание чужих тРНК с аминоксил-тРНК-синтетазой, т.е. повышая специфичность связывания. Последнее обычно приписывают эффекту Mg²⁺ на конформации как фермента, так и тРНК.

Стадия первоначального связывания тРНК с ферментом быстра, т.е. скорости как прямой, так и обратной реакции (ассоциации и диссоциации) высоки. За этой быстрой стадией первоначальной рекомбинации может следовать медленная стадия какой-то перестройки комплекса. Такая перестройка происходит только в том случае, если связанная тРНК оказывается своей. Это и есть стадия узнавания, на которой происходит основная дискриминация своих и чужих тРНК. Таким образом, на первой стадии связывания происходит только самый грубый, приблизительный отбор тРНК, и в основном ее функцией является быстрый перебор (сканирование) разных тРНК. Если связанная тРНК оказывается чужой, она не активна в индуцировании структурной перестройки ферментного комплекса, а следовательно, не может войти в следующую стадию и потому диссоциирует за счет быстрой обратимости первоначального комплекса. Только если связанная тРНК своя, то инициируется следующая фаза связывания, на которой происходит перестройка комплекса и подгонка тРНК для осуществления последующей реакции аминокислирования:



Возможно, однако, что этот механизм не универсален для всех аминоксил-тРНК-синтетаз. Например, тирозиновая аминоксил-тРНК-синтетаза *E. coli* и сериновый фермент дрожжей, а также аргинил-тРНК-синтетаза проявляют очень высокую специфичность уже на стадии первоначального комплекса, практически не связывая чужих тРНК.

Как бы то ни было, в конечном счете достигается очень высокая специфичность выбора тРНК ферментом для реакции аминокисли-

рования. Фермент так или иначе должен узнать свою тРНК. Очевидно, что какие-то определенные участки молекулы тРНК служат для этого опознавания. Имеющиеся данные указывают, что такие участки могут находиться в нескольких, часто удаленных друг от друга, районах пространственной структуры тРНК. По-видимому, различные аминоксил-тРНК-синтетазы используют разные районы тРНК для узнавания. Так, метиониновая аминоксил-тРНК-синтетаза использует для связывания и узнавания тРНК_F^{Met} как ее антикодон, так и акцепторный черешок, а также дополнительную переменную петлю в районе «ядра» молекулы. Вероятно, что именно одновременное узнавание всех трех участков тРНК необходимо для ее точного опознавания и конечной подгонки к ферменту. В других системах аминоксил-тРНК-синтетаза/тРНК в качестве узнаваемых районов тРНК также часто выявляются акцепторный черешок и антикодонная шпилька и иногда, кроме того, дигидроуридиловая спираль и дополнительная переменная петля. Общим для всех аминоксил-тРНК-синтетаз является то, что узнаваемые ферментами районы тяготеют к внутренней стороне угла L-образной тРНК. Вероятнее всего, именно внутренняя сторона угла L-образной тРНК и примыкающие к ней участки обеих плоских сторон молекулы взаимодействуют с поверхностями фермента.

Рекомендуемая литература

- Молекулы и клетки*: Пер. с англ./Под ред. Г. М. Франка. М.: Мир, 1968. С. 77–91.
- Нуклеиновые кислоты*/Под ред. Э. Чаргаффа и Дж. Дэвидсона: Пер. с англ./Под ред. А. Н. Белозерского. М.: ИЛ, 1962. С. 291–337.
- Венкстерн Т. В.* Первичная структура транспортных рибонуклеиновых кислот. М.: Наука, 1970.
- Киселев Л. Л., Фаворова О. О., Лаврик О. И.* Биосинтез белков от аминокислот до аминоксил-тРНК. М.: Наука, 1984.
- Шапель Ф., Энни А.-Л.* Биосинтез белка: Пер. с франц./Под ред. Л. Л. Киселева. М.: Мир, 1977.
- Altman S., ed.* Transfer RNA. Cambridge (Mass.): MIT Press, 1978.
- Cohn W. E., ed.* Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology. N. Y.: Acad. Press, 1976, v. 17, p. 182–216; 1977, v. 20, p. 1–19; 1979, v. 22, p. 1–69; 1979, v. 23, p. 227–290.
- Davidson J. N., Cohn W. E., eds.* Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology. N. Y.: Acad. Press, 1972, v. 12, p. 49–85; 87–128.
- Schimmel P., Söll D., Abelson J., eds.* Transfer RNA: Structure, Properties, Recognition. N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1979.
- Stoninski P., Borst P., Attardi G., eds.* Mitochondrial Genes. N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
- Söll D., Abelson J., Schimmel P., eds.* Transfer RNA: Biological Aspects. N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1980.
- Weissbach H., Pestka S., eds.* Molecular Mechanisms of Protein Biosynthesis. N. Y.: Acad. Press, 1977, p. 7–79.
- Alzhanova A. T., Fedorov A. N., Ovchinnikov L. P., Spirin A. S.* Eukaryotic aminoacyl-tRNA synthetases are RNA-binding proteins whereas prokaryotic ones are not. FEBS Lett., 1980, v. 120, p. 225–229.
- Dang C. V., Johnson D. L., Yang D. C. H.* High molecular mass amino acyl-tRNA synthetase complexes in eukaryotes. FEBS Lett., 1982, v. 142, p. 1–6.
- Fersht A. R.* Editing mechanisms in protein synthesis. Rejection of valine by the isoleucyl-tRNA synthetase. – Biochemistry, 1977, v. 16, p. 1025–1030.

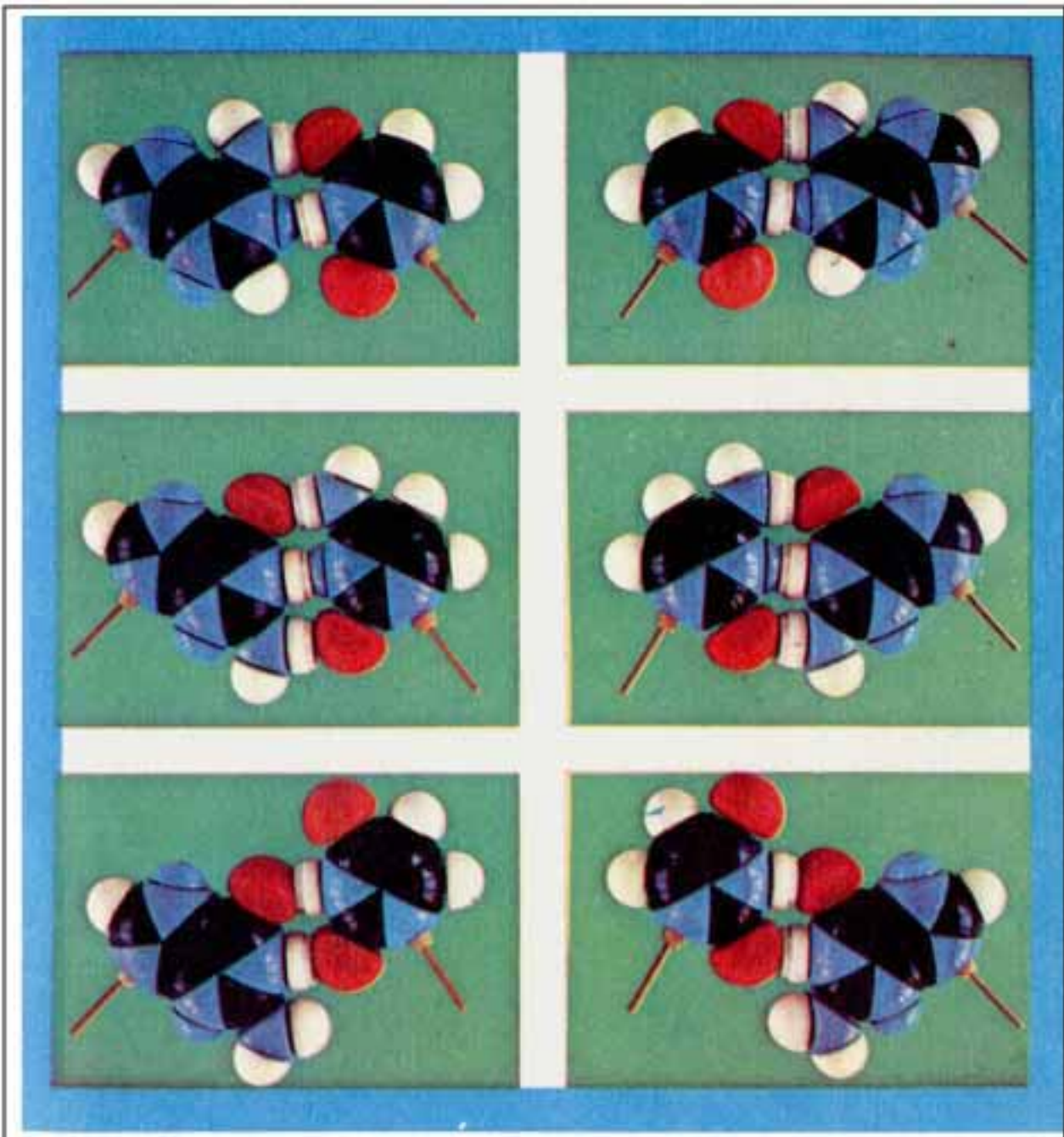


Рис. 19. Масштабные атомные модели пар оснований, реализуемых в двойных спиралях РНК:
 сверху вниз-А•U и U•А, G•С и С•G, G•U и U•G;
 цветовые обозначения: черный — углерод; синий — азот; красный — кислород; белый — водород; N-гликоз рибозой даны в виде прямых отрезков проволоки

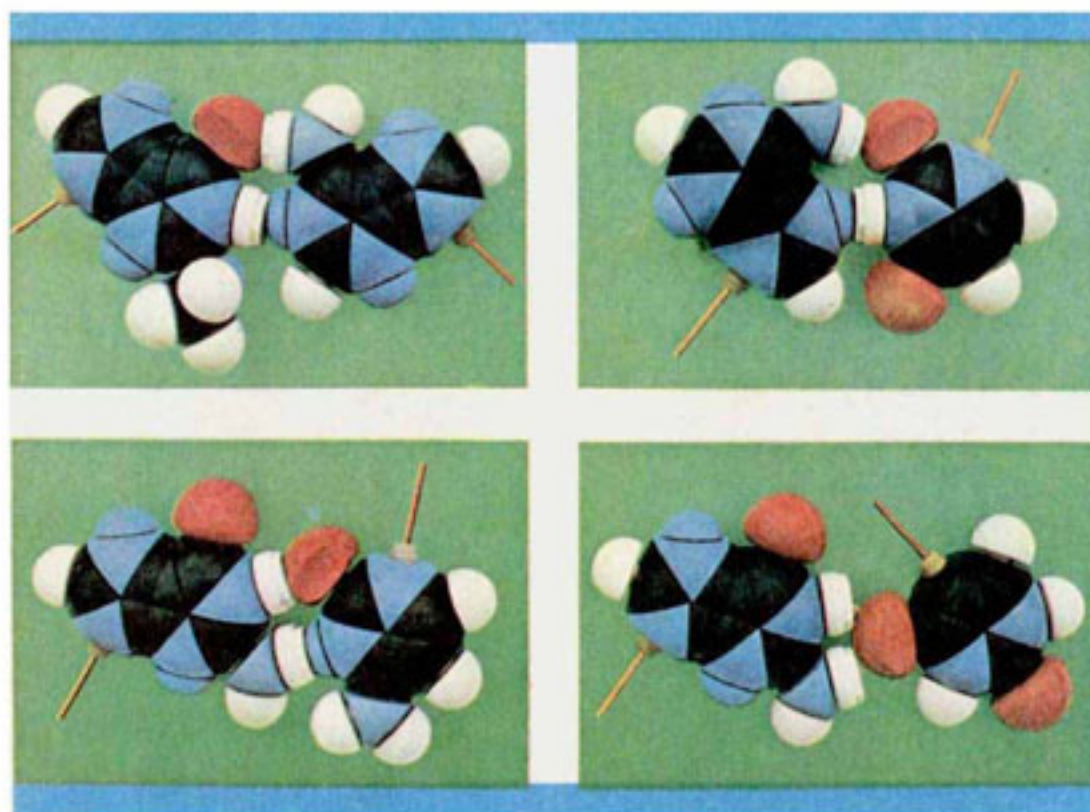


Рис. 23. Масштабные атомные модели необычных пар оснований, реализуемых в третичной структуре тРНК (дрожжевая тРНК^{Phe}):
 наверху слева — $m^2_2G26 \cdot A44$; наверху справа — $A14 \cdot U8$; внизу
 слева — $G15 \cdot C48$; внизу справа — $G18 \cdot \psi55$; цветовые
 обозначения как на рис. 19.

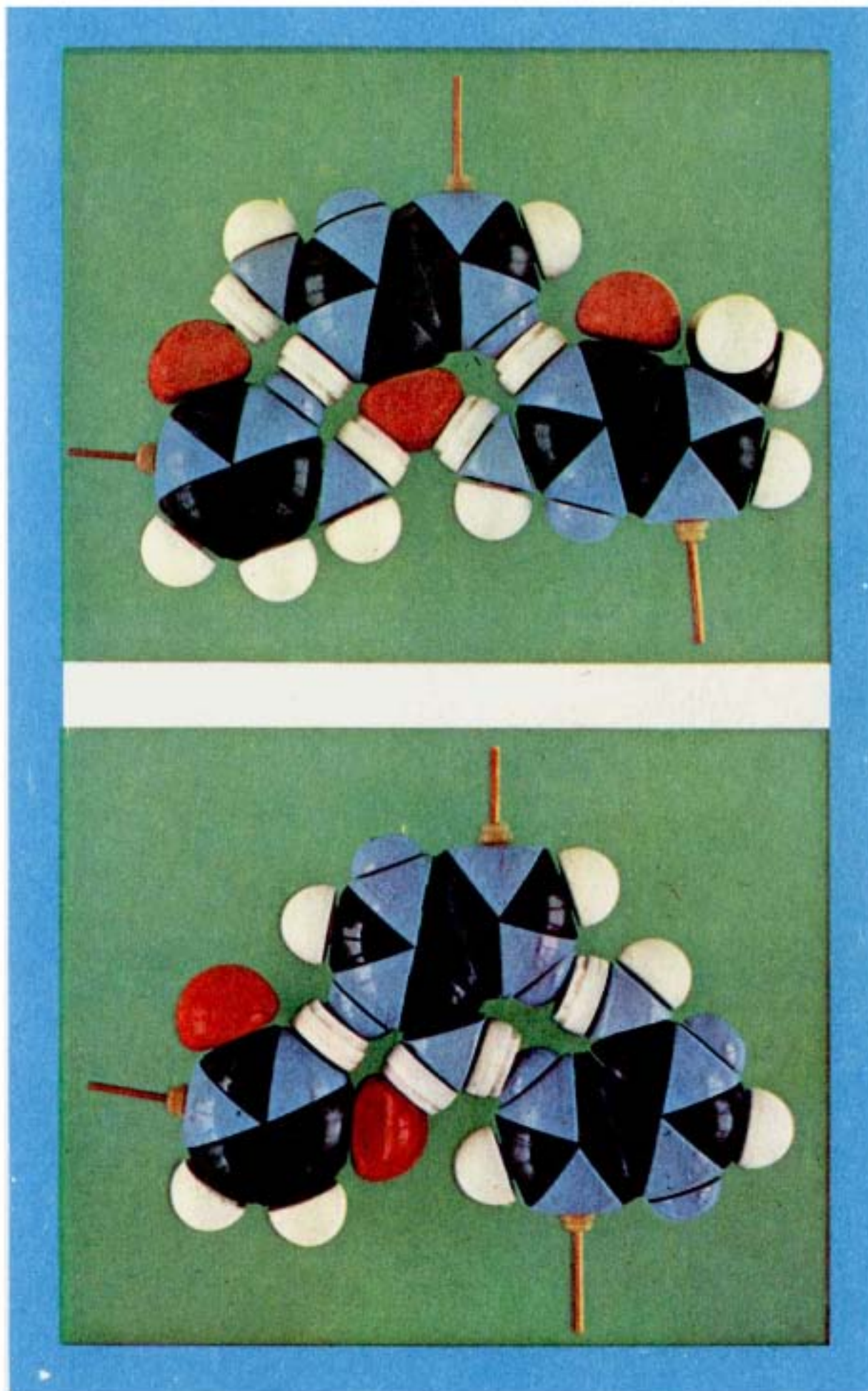


Рис. 24. Масштабные атомные модели троек оснований, связанных водородными связями, типичных для третичной структуры тРНК:
 вверху — С13 · G22 · m⁷G46; внизу — U12 · A23 · A9; цветовые обозначения как на рис. 19.

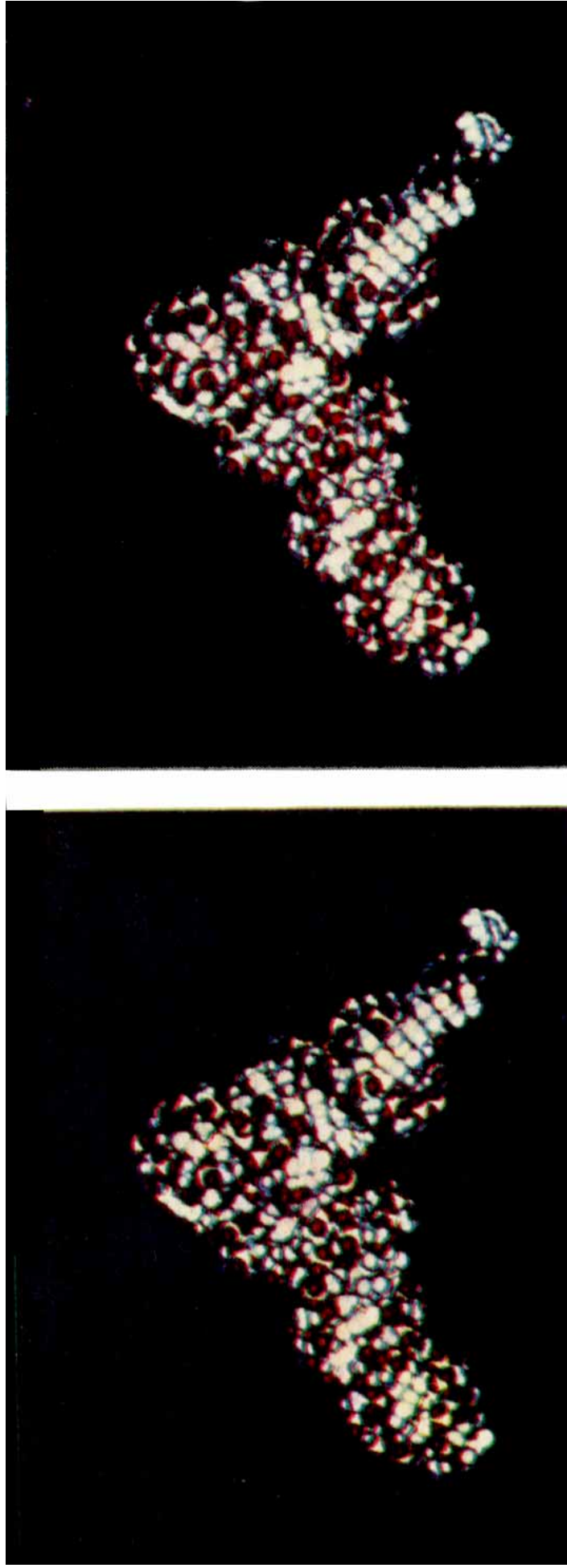


Рис. 25. Стереорепрезентация масштабной атомной модели молекулы дрожжевой фенилаланиновой тРНК (взято из Атласа макромолекулярных структур, составитель — Р. Фелдманн, Национальный Институт здоровья, Бетесда, США): антикодонный участок расположен в левой периферийной части молекулы; ССА-конец — в правой

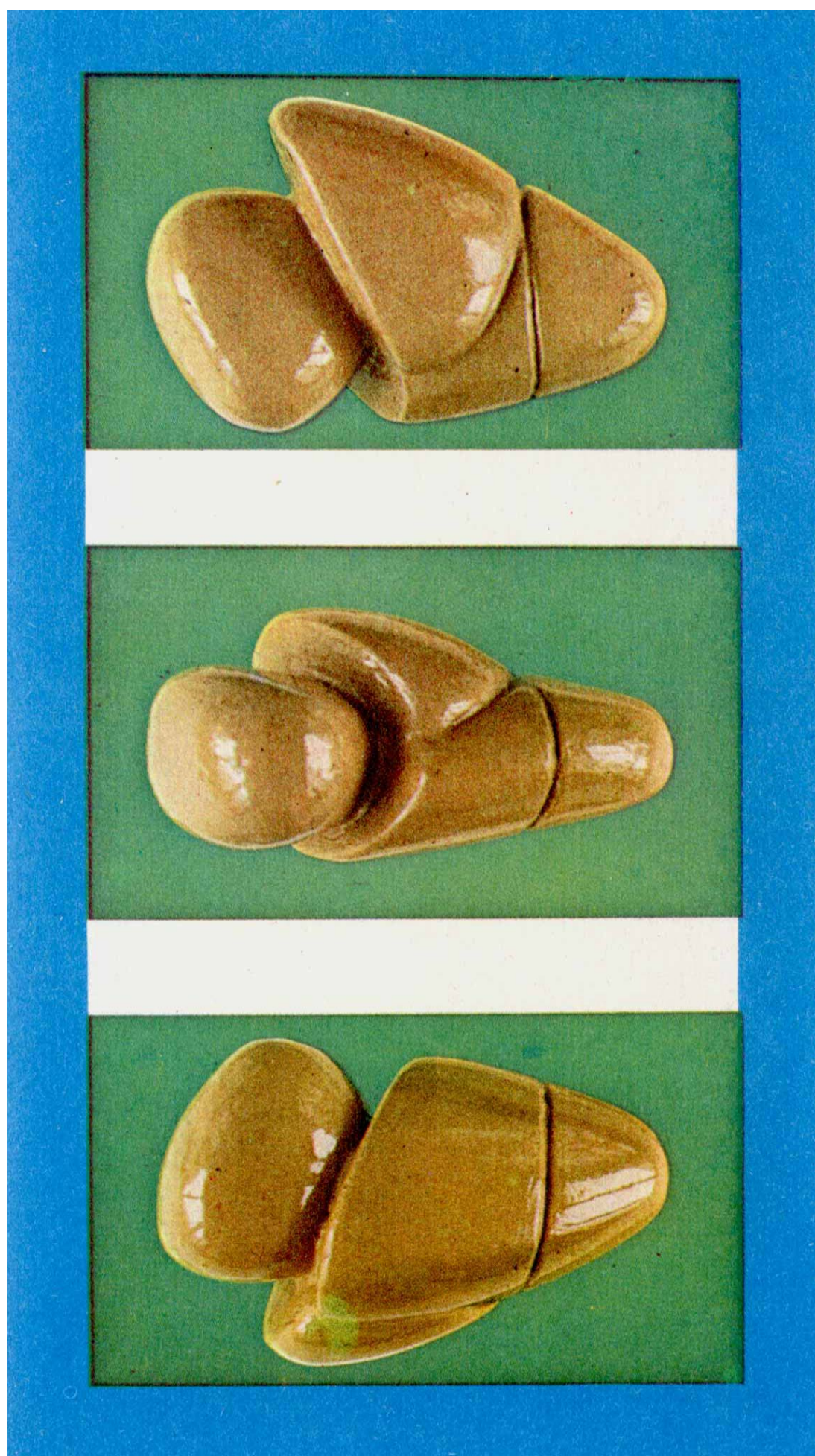


Рис. 35. Фотография модели рибосомной 30S субчастицы: три различные проекции (по В. Д. Васильеву. Докл. АН СССР, 1974, т. 219, с. 994–995; Acta Biol. Med. Germ, 1974, v. 33, p. 779–793)

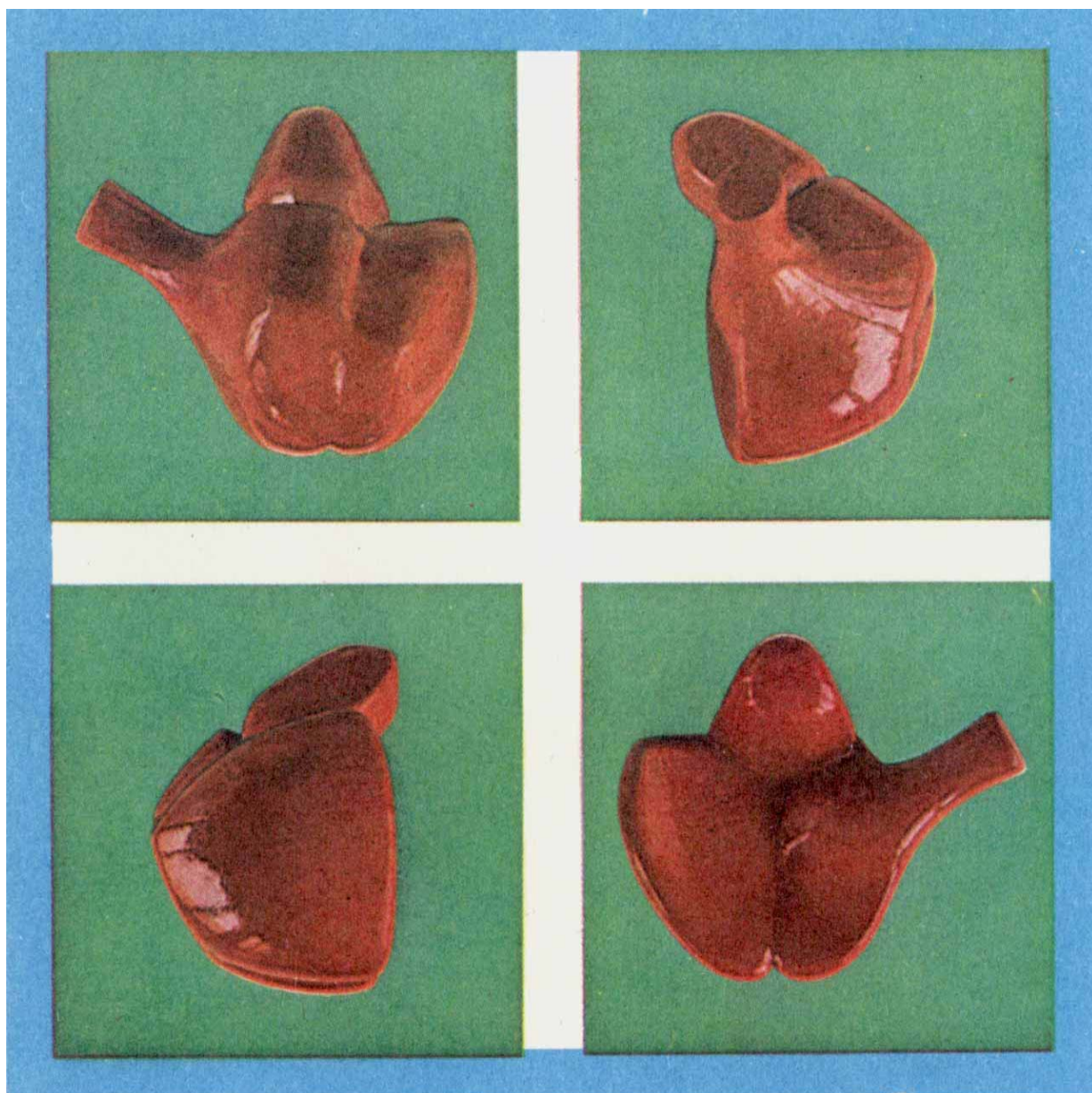


Рис. 38. Фотография модели рибосомной 50S субчастицы: четыре различные проекций (по V. D. Vasiliev et al. J. Mol. Biol. 1983, v. 171, p. 561–569)

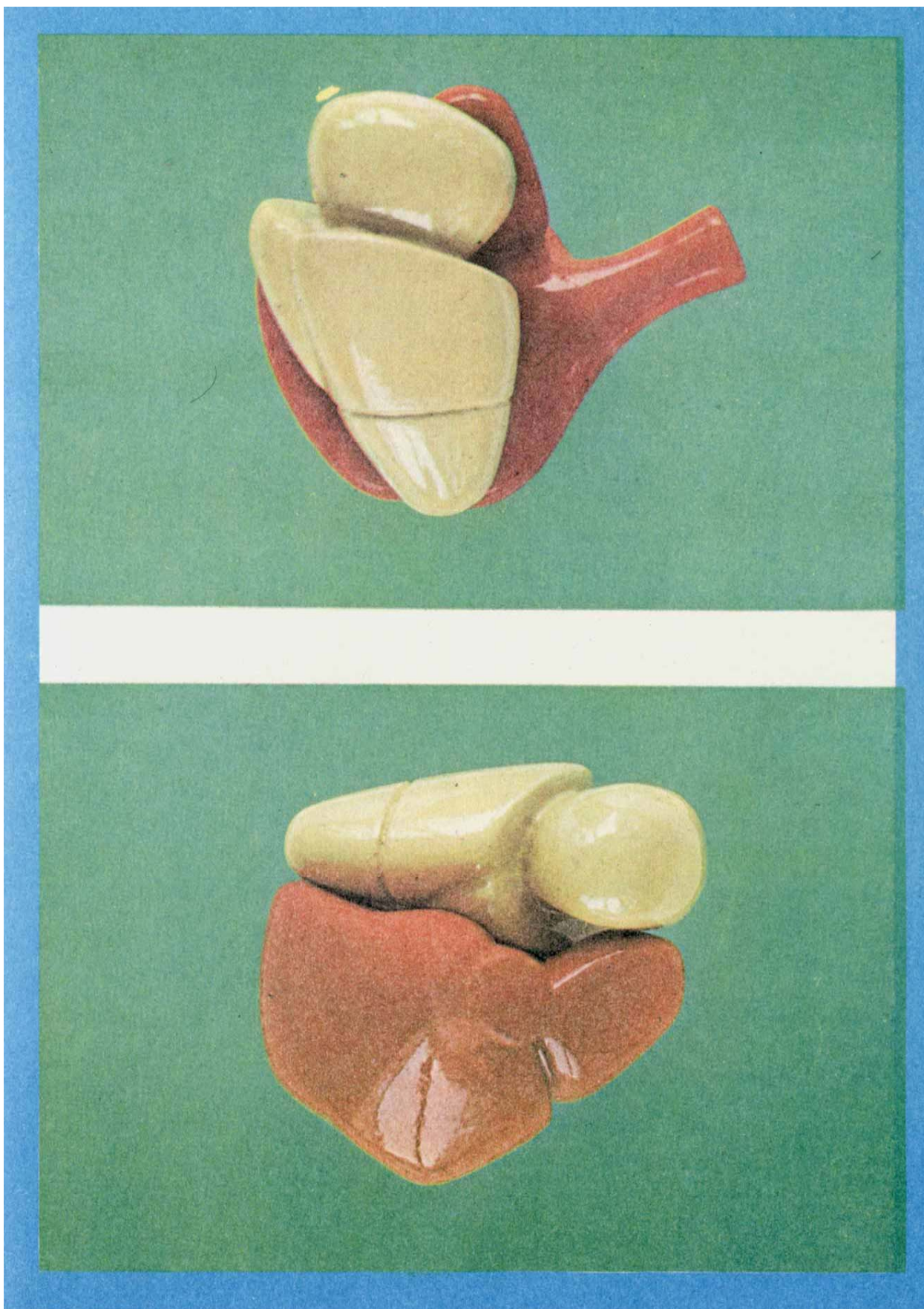


Рис. 40. Фотография модели 70S рибосомы, построенной из 30S субчастицы (желтая) и 50S субчастицы (красная) путем ассоциации «головка к головке» и «боковой выступ к боковому выступу» (по V. D. Vasiliev et al. FEBS Lett., 1983, v. 155, p. 167–172)

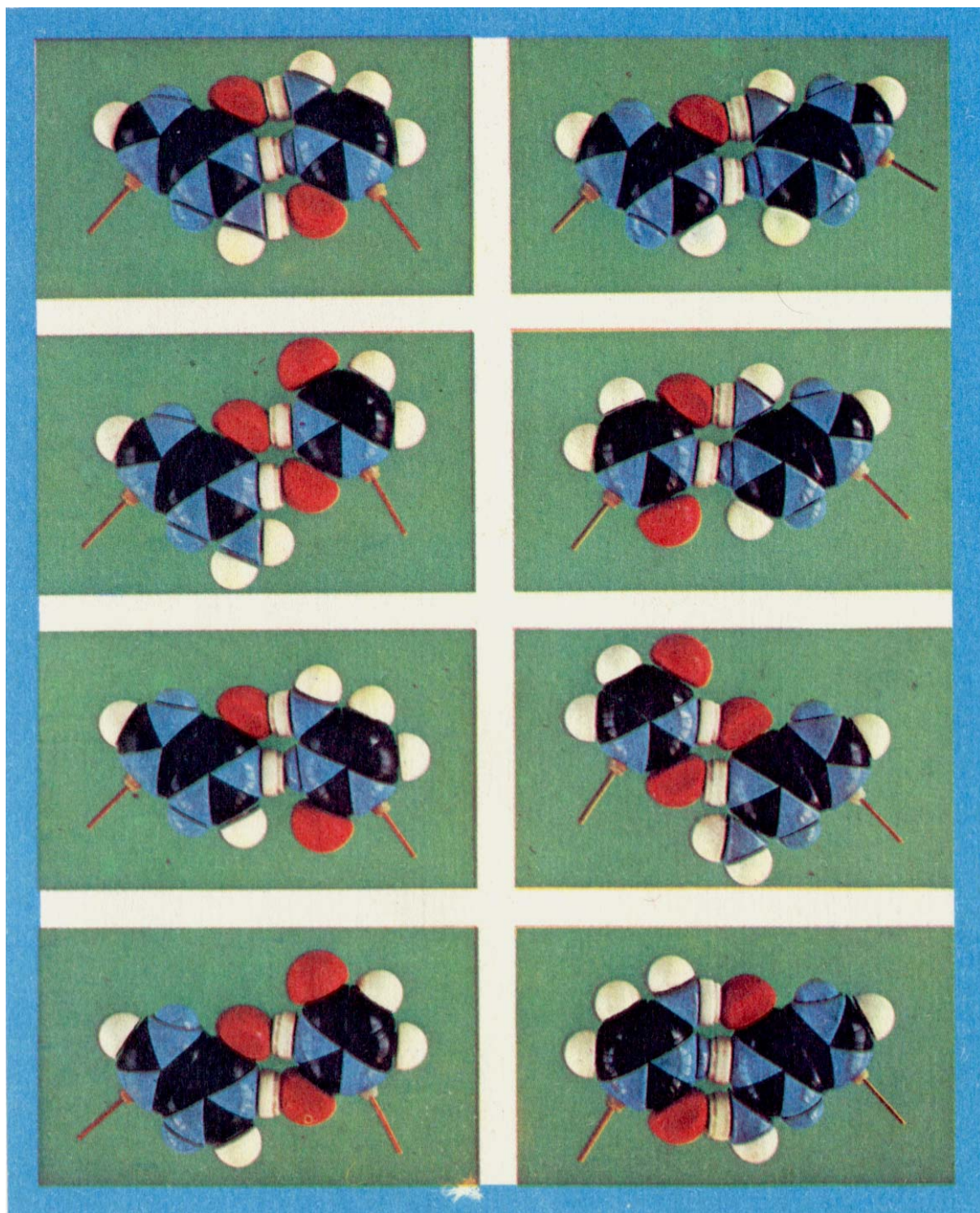


Рис. 92. Масштабные атомные модели пар оснований, реализуемых при взаимодействии первого основания антикодона с третьим основанием кодона:

колонка слева, сверху вниз: $G \cdot C$, $G \cdot U$, $I \cdot C$ и $I \cdot U$; колонка справа, сверху вниз: $I \cdot A$, $U \cdot A$, $U \cdot G$ и $C \cdot G$; обозначения те же, что на рис. 19.

- Gauss D. H., Sprinzl M.* Compilation of tRNA sequences. — *Nucleic Acids Res.*, 1983, 11, p. r1-r53.
- Hoagland M. B., Zamecnik P. C., Stephenson M. L.* Intermediate reactions in protein biosynthesis. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1957, v. 24, p. 215-216.
- Kiselev L. L., Favorova O. O.* Aminoacyl-tRNA synthetases: Some recent results and achievements. — *Adv. Enzym.*, 1974, v. 40, p. 141-238.
- Ogata K., Nohara H.* The possible role of the ribonucleic acid (RNA) of the pH 5 enzyme in amino acid activation. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1957, v. 25, p. 659-660.
- Rich A., RajBhandary U. L.* Transfer RNA: Molecular structure, sequence and properties. — *Ann. Rev. Biochem.*, 1976, v. 45, p. 805-860.
- Rich A., Schimmel P. R.* Structural organization of complexes of transfer RNAs with aminoacyl transfer RNA synthetases. — *Nucleic Acids Res.*, 1977, v. 4, p. 1649-1665.
- Schimmel P., Söll D.* Aminoacyl-tRNA synthetases: General features and recognition transfer RNAs. — *Ann. Rev. Biochem.*, 1979, v. 48, p. 601-648.

Глава IV.

РИБОСОМЫ И ТРАНСЛЯЦИЯ

1. ПЕРВЫЕ НАБЛЮДЕНИЯ

К 1940 г. Альберту Клоду (США) удалось выделить из животных клеток цитоплазматические РНК-содержащие гранулы, более мелкие, чем митохондрии и лизосомы (от 50 до 200 мкм в диаметре); позднее он назвал их микросомами. Химические анализы указывали, что микросомы Клода были «фосфолипидно-рибонуклеопротеидными комплексами». С другой стороны, цитохимические работы Т. Касперсона (Швеция) и Ж. Браше (Бельгия) продемонстрировали преимущественно цитоплазматическую локализацию РНК и корреляцию количества РНК в цитоплазме с интенсивностью белкового синтеза.

После этого ряд исследователей время от времени сообщали о выделении из цитоплазмы животных или растительных клеток, а также из бактерий РНК-содержащих частиц, гораздо более мелких, чем микросомы. Электронная микроскопия и седиментационный анализ в ультрацентрифуге указывали, что частицы компактные, более или менее сферичны и гомогенны по размеру, имея диаметр 10-20 нм и обнаруживая резкие седиментационные границы с коэффициентами седиментации от 30-40S до 70-90S. Пожалуй, первое ясное свидетельство, что такие частицы бактерий являются рибонуклеопротеидами, было получено Г. К. Шахманом, А. Б. Парди и Р. Станиером (США) в 1952 г.

Улучшенная техника микротомии и электронной микроскопии ультратонких срезов животных клеток привела к выявлению однородных плотных гранул с диаметром около 15 нм непосредственно в клетке. Электронно-микроскопические исследования Дж. Паладе (США), проведенные в 1953-1955 гг., показали, что маленькие плотные гранулы в изобилии содержатся в цитоплазме животных клеток. Они видны либо присоединенными к мембране эндоплазматического ретикула, либо свободно рассеяны в цитоплазме.

Микросомы Клода оказались фрагментами эндоплазматического ретикулаума с сидящими на них гранулами (Дж. Паладе и Ф. Сикевич, 1956). Выяснилось, что эти «гранулы Паладе» являются рибонуклеопротеидными частицами и что они представляют основную массу цитоплазматической РНК, обеспечивающей белковый синтез.

В 1956—1958 гг. в ряде лабораторий США были выделены и изучены чистые препараты рибонуклеопротеидных частиц — сначала 80S частиц из дрожжей Ф.-Ц. Чао и Г. К. Шахманом, из растений П. Тсо, Дж. Боннером и Дж. Виноградом и из животных М. Петерманн и М. Гамильтон, а затем 70S частиц из бактерий (*E. coli*) А. Тиссиером и Дж. Уотсоном. В 1958 г. состоялся первый Симпозиум, посвященный этим частицам и их участию в биосинтезе белка (Первый Симпозиум Биофизического Общества США при Массачусеттском Технологическом Институте. Кэмбридж, февраль 5—8, 1958); в ходе Симпозиума Р. Б. Робертсом был предложен термин «рибосома» для обозначения рассматриваемых рибонуклеопротеидных частиц.

Исследования функциональной роли рибосом шли параллельно с их обнаружением и структурным описанием. Первой убедительной демонстрацией того, что именно рибонуклеопротеидные частицы микросом ответственны за включение аминокислот в новосинтезированный белок, были эксперименты П. Замечника с сотрудниками (США), опубликованные в 1955 г. За этим последовали эксперименты из той же лаборатории, показавшие, что свободные рибосомы, не прикрепленные к мембранам эндоплазматического ретикулаума, также включают аминокислоты и синтезируют белок, освобождаясь затем в растворимую фазу (1957). Функции бактериальных рибосом были предметом интенсивных исследований группы Р. Б. Робертса (США); К. Мак Киллен, Р. Б. Робертс и Р. Дж. Бриттен в 1959 г. окончательно установили, что белки синтезируются в рибосомах и затем распределяются по другим частям бактериальной клетки.

2. ЛОКАЛИЗАЦИЯ РИБОСОМ В КЛЕТКЕ

Итак, рибосомы обильно наполняют клетки, ведущие интенсивный белковый синтез. В бактериальной клетке они рассеяны по всей протоплазме, составляя до 30%, а иногда и более, ее сухой массы; на одну бактериальную клетку приходится грубо 10^4 рибосом.

В эукариотических клетках относительное содержание (концентрация) рибосом меньше, и их количество очень сильно варьирует в зависимости от белоксинтезирующей активности соответствующей ткани или отдельной клетки. Основная масса рибосом локализована в цитоплазме (рис. 29). В клетках с интенсивной секрецией белка и развитой сетью эндоплазматического ретикулаума значительная часть цитоплазматических рибосом прикреплена к его мембране на поверхности, обращенной к цитоплазматическому матриксу; в некоторых частях ретикулаума их может быть много, в то время

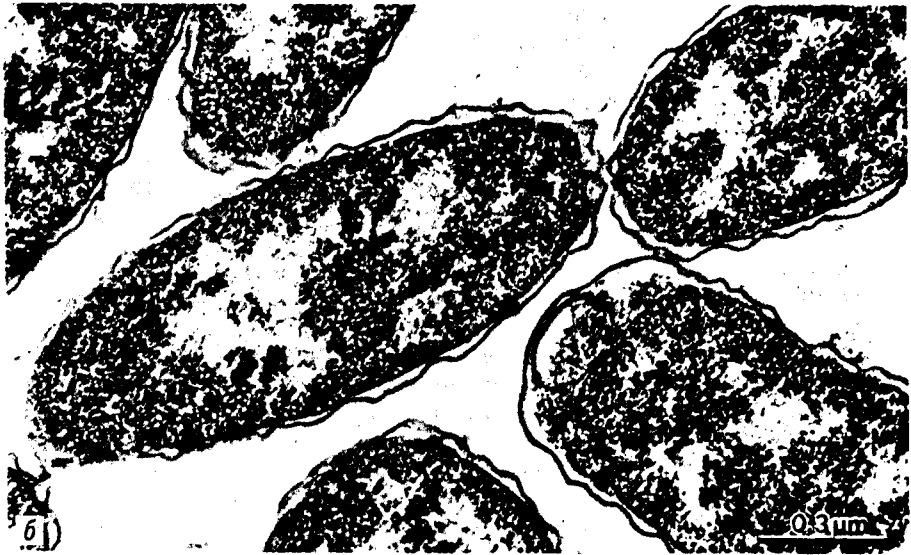
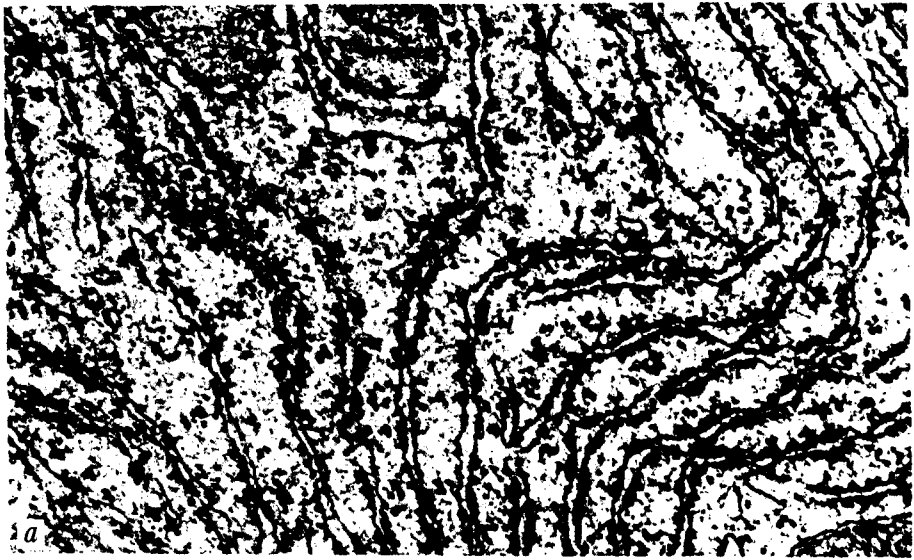


Рис. 29. Электронные микрофотографии рибосом на ультратонких срезах:
а — участок цитоплазмы клетки печени крысы (предоставлена проф. Ю. С. Ченцовым, МГУ им. М. В. Ломоносова). Видны рибосомы на мембранах шероховатого эндоплазматического ретикулума, а также группы свободных рибосом. Фиксация глутаральдегидом; *б* — клетки морской бактерии *Vibrio alginolyticus* (предоставлена Л. Е. Баксевой, МГУ им. М. В. Ломоносова). Видно, что цитоплазма наполнена рибосомами. Фиксация четырехокисью осмия

как другие остаются свободными. Эти рибосомы синтезируют белки, которые непосредственно транспортируются в мембранный просвет для дальнейшей секреции. Синтез белков для внутриклеточных нужд происходит в основном на «свободных» (не связанных с мембраной, а рассеянных в цитоплазматическом матриксе) рибосомах цитоплазмы. Поэтому цитоплазма эмбриональных, недифференцированных, быстро растущих и размножающихся клеток содержит преимущественно свободные рибосомы.

Все рибосомы цитоплазматического матрикса (как мембрано-связанные, так и свободные) образуются в ядрышке эукариотической клетки и соответственно обнаруживаются также в этом компартменте клеточного ядра; считается, что в ядрышке они не активны.

Кроме того, эукариотическая клетка имеет специальные рибосомы в таких внутриклеточных органеллах, как митохондрии и, в случае растений, хлоропласты. Рибосомы этих органелл отличаются от цитоплазматических рибосом слегка меньшими размерами, другим химическим составом и некоторыми функциональными свойствами. Они образуются непосредственно в органеллах.

3. ПРОКАРИОТИЧЕСКИЙ И ЭУКАРИОТИЧЕСКИЙ ТИПЫ РИБОСОМ

Имеется два главных типа рибосом в живой природе (рис. 30).

Всем прокариотическим организмам, включая грамположительные и грамотрицательные эубактерии, актиномицеты и синезеленые водоросли, а также архебактерии (метабактерии), свойственны 70S рибосомы. Они, соответственно, характеризуются седиментационным коэффициентом около 70S. Их молекулярная масса составляет около $2,5 \cdot 10^6$ дальтон, а линейные размеры (средний диаметр) в лиофильно-высушенном состоянии около 20–25 нм. По химическому составу они — чистые рибонуклеопротеиды, т. е. состоят только из РНК и белка.

Соотношение масс РНК: белок в них около 2:1; соответственно, парциальный удельный объем 70S рибосом около $0,60 \text{ см}^3/\text{г}$, а плавучая плотность в CsCl $1,64 \text{ г}/\text{см}^3$. РНК в рибосомах присутствует главным образом в виде ее Mg^{2+} - и, по-видимому, частично Ca^{2+} -соли; Mg составляет до 2% сухой массы рибосом. Кроме того, в варьирующих количествах (до 2,5% сухой массы) могут присутствовать также органические катионы, такие как спермин, спермидин, кадаверин и путресцин. Количество связанной воды в 70S рибосомах относительно невелико и составляет около 1 г/г, т. е. рибосомы в водной среде суть довольно компактные, не разбухшие частицы.

Морфологически все 70S рибосомы прокариотических организмов поразительно универсальны, и лишь у рибосомных частиц архебактерий (метабактерий) можно обнаружить некоторые отличия от эубактериальных частиц (см. следующую часть книги).

Цитоплазма клеток всех эукариотических организмов, включая

| | ПРОКАРИОТИЧЕСКИЙ ТИП | ЭУКАРИОТИЧЕСКИЙ ТИП |
|--|---|--|
| | 70S РИБОСОМЫ ЭУБАКТЕРИЙ, СИНЕЗЕЛЕННЫХ ВОДОРОСЛЕЙ И ХЛОРОПЛАСТОВ | ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИЕ 80S РИБОСОМЫ ЖИВОТНЫХ, ГРИБОВ И РАСТЕНИЙ |
| МОЛ. МАССА, ДАЛЬТОН | $2,5 \cdot 10^6$ | $4 \cdot 10^6$ |
| РАЗМЕР | 20-25 нм | 25-30 нм |
| РНК : БЕЛОК весаовое соотношение | 2 : 1 | 1 : 1 |
| | 70S РИБОСОМЫ АРХЕБАКТЕРИЙ (МЕТАБАКТЕРИЙ) | |
| | МИТОХОНДРИАЛЬНЫЕ 75S РИБОСОМЫ ГРИБОВ | |
| | МИТОХОНДРИАЛЬНЫЕ 55S РИБОСОМЫ ("МИНИРИБОСОМЫ") МЛЕКОПИТАЮЩИХ | |

Рис. 30. Прокариотический и эукариотический типы рибосом.

животных, грибы, растения и простейших, содержит несколько более крупные 80S рибосомы. Их молекулярная масса составляет около $4 \cdot 10^6$ дальтон, а линейные размеры от 25 до 30 нм (в лиофильно-высушенном состоянии). Они также включают только два типа биополимеров — РНК и белок, но содержание белка в них существенно больше, чем в прокариотических рибосомах; соотношение масс РНК: белок около 1:1, парциальный удельный объем около $0,65 \text{ см}^3/\text{г}$ и плавучая плотность в CsCl $1,55\text{--}1,59 \text{ г}/\text{см}^3$. Важно отметить, что абсолютное количество как РНК, так и белка (а не только пропорция белка) в 80S рибосомах существенно больше, чем в 70S рибосомах. Рибосомная РНК 80S рибосом также связана, в основном, с такими двувалентными катионами, как Mg^{2+} и Ca^{2+} , а также с небольшим количеством полиаминов и диаминов (спермин, спермидин, путресцин).

Паразитерная универсальность морфологии всех 80S рибосом,

независимо от их принадлежности тому или другому царству эукариот, должна быть также отмечена.

Однако хлоропласты и митохондрии эукариотических клеток содержат рибосомы, отличные от 80S типа. Рибосомы хлоропластов высших растений принадлежат к истинному 70S типу и практически не отличимы от рибосом эубактерий и синезеленых водорослей по вышеприведенным показателям и по более детальным молекулярным характеристикам. Митохондриальные рибосомы более разнообразны в зависимости от принадлежности организма к тому или иному царству эукариот. Наиболее изучены рибосомы митохондрий грибов и млекопитающих. Митохондриальные рибосомы грибов (*Saccharomyces*, *Neurospora*) похожи на прокариотические 70S рибосомы, но, может быть, лишь слегка крупнее (около 75S) и содержат относительно больше белка; абсолютное содержание рибосомной РНК в них, по видимому, почти такое же, как в типичных 70S рибосомах. Митохондриальные рибосомы млекопитающих, однако, существенно мельче типичных 70S рибосом, имея также и существенно меньшее абсолютное количество рибосомной РНК на частицу; их иногда называют «мини-рибосомами». Действительно, коэффициент седиментации рибосом из митохондрий млекопитающих составляет всего около 55S, а тотальная масса рибосомной РНК на частицу более чем на 1/3 меньше, чем в типичных 70S рибосомах. В то же время, митохондриальные рибосомы млекопитающих содержат довольно много белка, так что общие размеры их как будто бы не сильно отличаются от таковых прокариотических рибосом. В целом, несмотря на ряд необычных черт, по ряду своих признаков, и в том числе по функциональному поведению, митохондриальные рибосомы млекопитающих все же близки к прокариотическим 70S рибосомам.

4. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОЕ СЧИТЫВАНИЕ мРНК РИБСОМАМИ. ПОЛИРИБСОМЫ

В процессе белкового синтеза рибосома каждый раз связана лишь с ограниченным отрезком матричного полинуклеотида (мРНК). Так как отрезки матричного полинуклеотида, непосредственно связанные с рибосомами, оказываются защищенными от действия нуклеаз, они могут быть выделены после нуклеазной обработки комплексов рибосома · матрица. Длина таких отрезков была найдена равной от 20 до 60 нуклеотидных остатков. В то же время, длина кодирующей последовательности мРНК обычно превосходит 300 нуклеотидных остатков. Отсюда давно стало очевидно, что для считывания всей кодирующей последовательности мРНК рибосома должна **последовательно пройти** (или, что то же самое, последовательно проташить через себя) матрицу, от 5'-концевой части кодирующей последовательности до ее 3'-концевой части. Другими словами, рибосома должна работать как лентопротяжный механизм.

Какова же скорость движения рибосомы вдоль информационной РНК? В бактериальной клетке, например, *E. coli*, белок размером около 300 аминокислотных остатков, синтезируется приблизи-

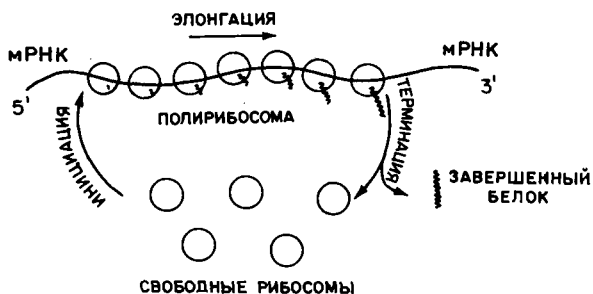


Рис. 31. Схема полирибосомы

тельно за двадцать секунд (при 37°C). Это значит, что рибосома пробегает приблизительно 40–50 нуклеотидных остатков мРНК в секунду. Скорость считывания мРНК у эукариот может достигать близкого значения (30 нуклеотидов в секунду), но регуляторные воздействия могут уменьшить ее до 3–10 нуклеотидов в секунду (см. гл. V. V).

Продвигаясь вдоль матричного полинуклеотида от 5'-конца к 3'-концу, рибосома через какое-то время освободит 5'-концевой участок матрицы. Тогда этот участок может начать считывать другая рибосома. Так же отойдя от 5'-концевой части, она предоставит возможность начать считывание третьей рибосоме. И так далее. Так, идя вдоль матрицы друг за другом, ряд рибосом оказываются читающими одну и ту же информацию и, следовательно, синтезирующими идентичные полипептидные цепи, но находящимися на разных стадиях формирования полипептида. Это схематически представлено на рис. 31, где рибосомы у 3'-конца матрицы уже нарастили длинный, почти законченный полипептид, рибосомы в середине несут полипептид в половину его запрограммированной длины, и рибосомы у 5'-конца содержат лишь короткие пептиды, в самом начале их удлинения. Такая структура, где матричный полинуклеотид ассоциирован со многими транслирующими рибосомами, получила название *полирибосомы*.

То, что рибонуклеопротеидные гранулы (рибосомы) не равномерно диспергированы в цитоплазме животных клеток или в препарате частиц, полученных из микросом, а часто собраны в группы (цепи или кластеры), было отмечено еще в ранних электронно-микроскопических наблюдениях Дж. Паладе и др. Доказательство того, что такие агрегаты рибосом представляют собой частицы, соединенные цепью мРНК и находящиеся в процессе трансляции, были представлены одновременно несколькими группами в 1963 г.

При интенсивном белковом синтезе расстояние между рибосомами вдоль цепи мРНК в полирибосоме может быть предельно коротким, так что рибосомы будут находиться почти вплотную друг к другу. Другими словами, на каждую рибосому может приходиться всего от 20 до 60 нуклеотидных остатков. Это значит, что приблизительно каждую секунду одна рибосома будет завершать синтез белка у

3'-конца кодирующей части мРНК и соскакивать с матрицы, и одна рибосома будет садиться на матрицу у 5'-конца и начинать движение по направлению к 3'-концу.

Открытие полирибосом как формы существования транслирующих рибосом в клетке сделало понятным тот факт, что рибосом в клетке много, а мРНК мало. Действительно, часто приводят цифры, что рибосомная РНК составляет 80% тотальной РНК клетки, а мРНК, как правило, не более 5%. В свете полирибосомной организации транслирующего аппарата это понятно: одну мРНК транслирует много рибосом, так что на одну часть транслируемой мРНК может приходиться до 100—200 частей рибосомной РНК.

5. СТАДИИ ТРАНСЛЯЦИИ: ИНИЦИАЦИЯ, ЭЛОНГАЦИЯ И ТЕРМИНАЦИЯ

Рибосома начинает читать мРНК со строго определенной точки ее последовательности, а именно с той, с которой начинается ее кодирующая часть. Как уже отмечалось, эта точка вовсе не есть самый крайний 5'-концевой нуклеотид мРНК, а как правило, расположена на определенном удалении, иногда значительном, от начала полинуклеотидной цепи. Рибосома должна каким-то образом узнать начальную точку считывания, связаться с ней, и только тогда начать трансляцию. Комплекс событий, обеспечивающих процесс начала трансляции, обозначается как стадия *инициации*. В инициации принимают участие специальный инициаторный кодон, инициаторная тРНК и белки, называемые факторами инициации.

Пройдя стадию инициации, рибосома переходит к последовательному прочтению кодонов мРНК по направлению к 3'-концу. Прочтение мРНК предполагает последовательный синтез полипептидной цепи белка, кодируемого мРНК. Синтез происходит на рибосоме путем последовательного добавления одного аминокислотного остатка за другим к строящейся полипептидной цепи; таким путем осуществляется элонгация пептида. Каждый новый аминокислотный остаток добавляется к карбоксильному концу (С-концу) пептида, т. е. С-конец пептида является растущим. Добавление одного аминокислотного остатка соответствует прочтению одного нуклеотидного триплета. Весь этот процесс собственно трансляции кодирующей части мРНК называют стадией *элонгации*.

Когда рибосома достигнет терминирующего кодона мРНК, синтез полипептида прекращается. В присутствии терминирующего кодона рибосома не связывает какой-либо аминоацил-тРНК, а вместо них в дело вступают специальные белки, называемые факторами терминации. Под их действием синтезированный полипептид освобождается из рибосомы. Эта стадия называется *терминацией* трансляции. После терминации рибосома может либо сойти с мРНК, либо продолжать скользить вдоль нее, не транслируя.

Встреча рибосомы с новым инициаторным кодоном, либо на другой цепи мРНК, либо на этой же по направлению к 3'-концу от терминирующего кодона, приведет к новой инициации. Таким образом,

каждая рибосома проходит полный цикл трансляции, включающий инициацию, элонгацию и терминацию; в результате такого эписикла прочитывается вся кодирующая последовательность мРНК и синтезируется законченная полипептидная цепь белка (рис. 31). После этого рибосома может повторить цикл с другой цепью мРНК или другой кодирующей последовательностью той же цепи.

6. БЕСКЛЕТОЧНЫЕ СИСТЕМЫ ТРАНСЛЯЦИИ

Синтез белка на рибосомах может быть воспроизведен в искусственных условиях вне клетки. Включение аминокислот в белки в гомогенатах и экстрактах клетки, а также препаратами микросом в бесклеточных системах было продемонстрировано уже давно; пожалуй, первыми были бесклеточные системы из животных тканей, и, в частности, из печени крысы, о которых сообщили Ф. Сикевич и П. Замечник (США) в 1951 г. и П. Замечник в 1953 г. Вскоре после этого было показано, что включение аминокислот (синтез белка) в бесклеточной системе происходит на рибонуклеопротеидных частицах (рибосомах). Бесклеточные системы синтеза белка с бактериальными (*E. coli*) рибосомами были созданы почти одновременно Д. Шахтшабелом и В. Циллигом (ФРГ), М. Ламборг и П. Замечником (США) и А. Тиссиером, Д. Шлессингером и Ф. Гро (США) в 1959—1960 гг. Все эти системы были основаны на трансляции своей эндогенной матрицы; фактически рибосомы лишь продолжали синтез полипептидов на мРНК, к которым они уже были присоединены в момент выделения. Г. Маттей и М. Ниренберг в 1961 г. улучшили систему, освободили рибосомы от эндогенных матриц и впервые ввели экзогенную матрицу в бесклеточную рибосомную систему; одним из их главных достижений было использование синтетических полинуклеотидов, получаемых с помощью полинуклеотидфосфорилазы, в том числе простых матриц типа поли(U), поли(A) и др.

В настоящее время бесклеточная система синтеза белков может быть составлена из хорошо охарактеризованных, высокоочищенных компонентов, включая рибосомы, матричный полинуклеотид и набор аминоацил-тРНК или систему ацилирования тРНК (тРНК, аминокислоты, АТФ и аминоацил-тРНК-синтетазы), а также набор специальных белков, называемых факторами трансляции, и ГТФ. Простейшая бесклеточная рибосомная система синтеза полипептида, на которой могут изучаться принципиальные механизмы трансляции, включает всего 6 высокомолекулярных компонентов плюс ГТФ; например, поли(U)-направляемая система может быть составлена из:

70S рибосом *E. coli*
Poly (U)
Phe-tRNA
EF-T_u (белок с мол. массой 47000)
EF-T_s (белок с мол. массой 34000)
EF-G (белок с мол. массой 83000)
GTP

Для трансляции природных матриц и вирусных РНК бесклеточная прокариотическая система должна быть дополнена полным набором аминоксил-тРНК, тремя белками, необходимыми для инициации трансляции (IF-1, IF-2 и IF-3), и тремя белками, нужными для терминирования трансляции (RF-1, RF-2 и RF-3).

В случае использования эукариотических 80S рибосом для трансляции в бесклеточной системе все соответствующие белковые факторы должны быть также эукариотического происхождения. Это два фактора элонгации EF-1 и EF-2 (вместо EF-T_u, EF-T_s и EF-G), многочисленный набор факторов инициации (eIF-1, eIF-2, eIF-3, eIF-4A, eIF-4B, eIF-4C, eIF-4D, eIF-4E, eIF-4F, eIF-5) и один высокомолекулярный фактор терминирования (eRF). Для инициации в эукариотических системах требуется также АТФ.

Важным условием для бесклеточной системы является ионная среда, и в первую очередь надлежащая концентрация ионов магния. Обычный интервал концентраций Mg²⁺, в котором работают рибосомы в бесклеточной системе, от 3 мМ до 20 мМ; optimum лежит где-то между этими значениями и зависит от рибосом и концентрации одновалентного катиона (K⁺ или NH₄⁺), а также от температуры инкубации.

Основные факты, касающиеся трансляции и ее молекулярных механизмов, были получены и получаются в настоящее время на бесклеточных системах.

Рекомендуемая литература

Биосинтез белка и его регуляция: Пер. с англ./Под ред. Я. М. Варшавского. — М.: Мир, 1967. С. 9—32; 50—60; 160—193.

Живая клетка: Пер. с англ./Под ред. Г. М. Франка. — М.: Мир, 1966. С. 219—237.

Структура и функция клетки: Пер. с англ./Под ред. Г. М. Франка. М.: Мир, 1964. С. 197—215.

Путерман М. Физические и химические свойства рибосом: Пер. с англ./Под ред. Е. Ф. Романцева. — М.: Мир, 1967.

Спирин А. С., Гаврилова Л. П. Рибосома. — М.: Наука, 1971.

Bielka H., ed. The Eukaryotic Ribosome. Berlin: Akademie-Verlag, 1982.

Nomura M., Tissières A., Lengyel P., eds. Ribosomes. N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1974, p. 3—12; 13—52.

Roberts R. B., ed. Microsomal Particles and Protein Synthesis. 1st Symp. of the Biophysical Society, the Massachusetts Institute of Technology, Cambridge (Mass.), February 5, 6 and 8, 1958. London, New York, Paris, Los Angeles: Pergamon Press.

Brachet J. La localisation des acides pentosenucléiques dans les tissus animaux et les oeufs d'amphibiens en voie de développement. — Arch. Biol., 1942, v. 53, p. 207—257.

Casperson T. Studien über den Eiweißumsatz der Zelle. — Naturwissenschaften, 1941, v. 29, p. 33—43.

Chao F.-C., Schachman H. K. The isolation and characterization of a macromolecular ribonucleoprotein from yeast. — Arch. Biochem. Biophys., 1959, v. 61, p. 220—230.

Claude A. Particulate components of normal and tumor cells. — Science, 1940, v. 91, p. 77—78.

Gierer A. Function of aggregated reticulocyte ribosomes in protein synthesis. — J. Mol. Biol., 1963, v. 6, p. 148—157.

Lamborg M., Zamecnik P. C. Amino acid incorporation by extracts of *E. coli*. — Biochim. Biophys. Acta, 1960, v. 42, p. 206—211.

Littlefield J. W., Keller E. B. Incorporation of C¹⁴ amino acids into ribonucleoprotein particles from the Ehrlich mouse ascites tumor. — J. Biol. Chem., 1957, v. 224, p. 13—30.

Littlefield J. W., Keller E. B., Gross J., Zamecnik P. C. Studies on cytoplasmic ribonucleoprotein particles from the liver of the rat. — J. Biol. Chem., 1955, v. 217, p. 111—123.

Matthaei H., Nirenberg M. W. The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon RNA prepared from ribosomes. – Biochem. Biophys. Res. Commun., 1961, v. 4, p. 184–189.

McQuillen K., Roberts R. B., Britten R. J. Synthesis of nascent protein by ribosomes in *Escherichia coli*. – Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1959, v. 45, p. 1437–1447.

Nirenberg M. W., Matthaei J. H. The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polynucleotides. – Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1961, v. 47, p. 1588–1602.

Palade G. E. A small particulate component of the cytoplasm. – J. Biophys. Biochem. Cytol., 1955, v. 1, p. 59–68.

Palade G. E., Siekevitz P. Liver microsomes. – J. Biophys. Biochem. Cytol., 1956, v. 2, p. 171–200.

Penman S., Scherrer K., Becker Y., Darnell J. Polyribosomes in normal and poliovirus-infected HeLa cells and their relationship to messenger-RNA. – Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1963, v. 49, p. 654–662.

Petermann M. L., Hamilton M. G. The purification and properties of cytoplasmic ribonucleoprotein from rat liver. – J. Biol. Chem., 1957, v. 224, p. 725–736.

Schachman H. K., Pardee A. B., Stanier R. Y. Studies on the macromolecular organization of microbial cells. – Arch. Biochem. Biophys., 1952, v. 38, p. 245–260.

Schachtschabel D., Zillig W. Untersuchungen zur Biosynthese der Proteine. I. Über den Einbau ¹⁴C-markierter Aminosäuren ins Protein zellfreier Nucleoprotein-Enzym-Systeme aus *Escherichia coli* B. – Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., 1959, v. 314, p. 262–275.

Siekevitz P., Zamecnik P. C. In vitro incorporation of 1-C¹⁴-DL-alanine into proteins of rat-liver granular fractions. – Fed. Proc., 1951, v. 10, p. 246.

Tissières A., Watson J. D. Ribonucleoprotein particles from *Escherichia coli*. – Nature, 1958, v. 182, p. 778–780.

Tissières A., Schlessinger D., Gros F. Amino acid incorporation into proteins by *E. coli* ribosomes. – Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1960, v. 46, p. 1450–1463.

Ts'o P.O.P., Bonner J., Vinograd J. Microsomal nucleoprotein particles from pea seedlings. – J. Biophys. Biochem. Cytol., 1956, v. 2, p. 451–465.

Warner J. R., Knopf P. M., Rich A. A multiple ribosomal structure in protein synthesis. – Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1963, v. 49, p. 122–129.

Watson J. D. The involvement of RNA in the synthesis of proteins. – Science, 1963, v. 140, p. 17–26.

Weustein F. O., Staehelin T., Noll H. Ribosomal aggregate engaged in protein synthesis: characterization of the ergosome. – Nature, 1963, v. 197, p. 430–435.

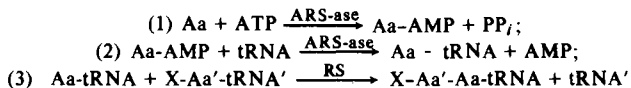
Zamecnik P. C. Incorporation of radioactivity from D, L-leucine-1-¹⁴C into proteins of rat liver homogenates. – Fed. Proc., 1953, v. 12, p. 295.

Zamecnik P. C., Keller E. B. Relation between phosphate energy donors and incorporation of labeled amino acids into proteins. – J. Biol. Chem., 1954, v. 209, p. 337–354.

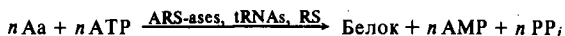
Глава V.

ХИМИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ И ОБЩИЙ ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ БАЛАНС БИОСИНТЕЗА БЕЛКА

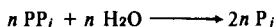
Итак, белок синтезируется из аминокислот путем трех последовательных химических реакций. Первые две реакции катализируются аминоацил-тРНК-синтетазами, а третья, завершающая, – рибосомой:



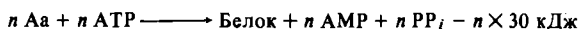
В первой реакции карбоксил аминокислоты реагирует с полифосфатной группой АТФ, так что пирогосфатный остаток замещается на аминоацильный и образует *смешанный ангидрид*, называемый аминоациладенилатом. Во второй реакции тРНК замещает аденилатный остаток, и образуется *сложноэфирная связь* между карбоксильной группой аминокислотного остатка и гидроксилом рибозы концевго нуклеозида тРНК. Третья реакция, катализируемая рибосомой, представляет собой замещение остатка тРНК (tRNA') остатком аминоацил-тРНК, в результате чего вместо сложноэфирной связи образуется *амидная (пептидная) связь* между аминогруппой аминоацильного остатка молекулы аминоацил-тРНК и карбоксильной группой другого аминоацильного остатка (Aa'). Если конечный белок состоит из n аминокислотных остатков, то общий баланс реакций будет следующим:



Кроме того, в естественных условиях пирогосфат гидролизуется пирогосфатазой до ортофосфата:



Свободная энергия гидролиза пирогосфатных связей АТФ в стандартных условиях (ΔG°) составляет около -30 кДж/моль ($-7 - 8$ ккал/моль). Тот же знак и то же значение свободной энергии гидролиза в стандартных условиях характерны для ангидридной связи аминоациладенилата и сложноэфирной связи аминоацил-тРНК. Свободная энергия гидролиза пептидной связи бесконечно длинного полипептида (белка) в стандартных условиях равна всего около -2 кДж/моль ($-0,5$ ккал/моль). Следовательно, весь процесс идет с освобождением большого количества свободной энергии, т. е. является термодинамически спонтанным и энергетически обеспеченным:

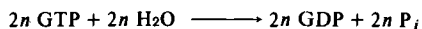


Если добавить сюда еще и гидролиз пирогосфата, то общий энергетический баланс будет $-n \times 60$ кДж на 1 моль белка. Таким образом, при размере белка около 200 аминокислотных остатков выигрыш свободной энергии (в стандартных условиях) составит около 12000 кДж/моль (3000 ккал/моль).

Из рассмотрения энергетического баланса вышеуказанных трех реакций в отдельности видно, что первые две реакции сами по себе не дают выигрыша свободной энергии (в стандартных условиях) и, следовательно, дорибосомные этапы не должны протекать с большим сдвигом в сторону синтеза; однако сдвиг будет генерироваться при условии, если пирогосфат гидролизуется в параллельной реакции. Основной перепад в уровнях свободной энергии между субстратами и продуктами наблюдается именно в третьей реакции, т. е. сдвиг суммарной реакции в сторону синтеза практически в любых условиях обеспечивается рибосомным этапом.

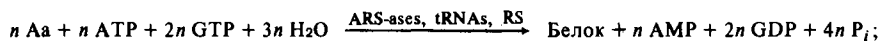
Самое поразительное, однако, состоит в том, что, несмотря на полную энергетическую обеспеченность процесса биосинтеза белка из свободных аминокислот за счет АТФ или из аминоацил-тРНК

за счет их сложноэфирных связей, на рибосомном этапе синтеза гидролизуются еще две молекулы ГТФ на каждый аминокислотный остаток:



Это дает рибосомному этапу (и, следовательно, всему процессу) дополнительный выигрыш свободной энергии около 60 кДж (15 ккал) на 1 моль аминокислоты (в стандартных условиях).

Таким образом, сумму всех химических реакций в биосинтезе белка следует записать так:



общий энергетический баланс этой суммарной реакции ΔG° составит около -120 кДж (-30 ккал) на 1 моль аминокислоты или -25000 кДж (-6000 ккал) на 1 моль белка длиной 200 аминокислотных остатков.

Однако в этом расчете была учтена только химическая сторона процесса. Важно посмотреть, насколько данная оценка может измениться, если учесть энтропийный проигрыш за счет упорядоченного расположения аминокислотных остатков вдоль цепи синтезируемого белка, а также за счет фиксированной пространственной структуры белка. Оказывается, учет детерминированного расположения аминокислотных остатков в полипептидной цепи вносит сравнительно небольшую поправку — около $+10$ кДж ($+2,5$ ккал) на моль аминокислоты. Что касается энтропийного фактора за счет упорядочения пространственной структуры синтезируемого полипептида, то здесь энтропийный проигрыш (понижение энтропии) более существен, но он компенсируется энтальпийным выигрышем в результате нековалентных взаимодействий аминокислотных остатков. Таким образом, в любом случае синтез белка сопровождается диссипацией большого количества свободной энергии.

Смысл затраты такого большого **избытка** энергии представляет собой одну из загадок и интереснейших проблем молекулярной биологии. Избыток энергии, диссипируемый в теплоту и не используемый для совершения какой бы то ни было накапливаемой полезной работы (в виде химических связей или небеспорядочного расположения остатков), должен играть какую-то важную роль в функционировании белоксинтезирующей системы. Довольно очевидно, что, во всяком случае, этот избыток энергии необходим для обеспечения высоких скоростей и высокой надежности синтеза белка.

Рекомендуемая литература

Четверин А. Б., Спирин А. С. Биоэнергетика и синтез белка. — Успехи биол. химии, 1983, т. XXIV, с. 3–39.

Cohn W. E., ed. Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology. N. Y.: Acad. Press, 1978, v. 21, p. 39–62.