

575.1+547.963.3

**НЕКОТОРЫЕ ПРОБЛЕМЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ
И ФИЗИКА***С. Е. Бреслер*

В этой статье будут затронуты некоторые аспекты молекулярной биологии, связанные с процессами синтеза или самовоспроизведения двух важнейших полимеров живой природы — белков и нуклеиновых кислот. Белкам в живой природе принадлежит главная роль. Белки — это, с одной стороны, катализаторы реакций обмена веществ (ферменты), с другой — это механохимические машины, осуществляющие перевод химической энергии в механическую работу.

Как широко известно сейчас, белки — это сополимеры 20 аминокислот. Они состоят из полипептидных цепей, составленных в общей сложности из нескольких сотен звеньев. Самый маленький белок — инсулин — состоит всего из 51 звена. Способ чередования 20 аминокислот вдоль белковой цепи детерминирован с математической точностью, и даже замена одного-единственного звена из нескольких сотен является в природе результатом наследуемой мутации. Такое, как принято выражаться, генетическое повреждение белка затрагивает часто его функцию, например, его способность быть ферментом, т. е. специфическим катализатором, ускоряющим одну определенную реакцию в обмене веществ клетки.

Сейчас около 40 белков исследовано до конца аналитически, т. е. для них составлены структурные формулы, один белок — инсулин — синтезирован методами классической химии и показал такие же свойства и способность выполнять такую же биологическую функцию, как природный инсулин. Поэтому проблемы структуры белка в принципе решены и не содержат каких-либо серьезных тайн. Речь идет сейчас о разработке деталей.

Из основных вопросов, которые стоят сейчас перед молекулярной биологией, следует на первое место поставить биосинтез белка.

Каким образом производится строго детерминированная цепочка белка? Каким путем возникают в ней ошибочные звенья?

В биосинтезе белка, как известно, основная роль принадлежит нуклеиновым кислотам, содержащим информацию о структуре всех клеточных белков, т. е. обо всех деталях чередования разнообразных звеньев вдоль всех белковых цепочек клетки, число которых порядка тысячи. В клеточном ядре находится ДНК, которая содержит всю необходимую информацию о структуре всех белков, но сама она в синтезе белков не участвует. С нее, т. е. с ДНК, копируется матричная РНК (МРНК), которая переходит из ядра в цитоплазму клетки, прикрепляется к особым круглым тельцам рибосомам, о которых речь будет впереди, и там-то происходит образование новых белков. Следовательно, начало синтеза белка — это синтез МРНК по ДНК; так идет перенос информации от ее хранилища ядра к мастерской, т. е. рибосомам. ДНК ядра — это элемент памяти

машины, если угодно — это магнитная лента, так как запись памяти осуществлена так же одномерно, как в магнитной ленте. МРНК — рабочая копия, идущая непосредственно в дело. Если ДНК можно сравнивать с калькой, хранящейся в конструкторском бюро, то МРНК — это снятая с нее синька, идущая прямо в цех и, как всякая подобная рабочая вещь, — недолговечная, быстро изнашивающаяся и выходящая из строя.

Чтобы проследить за всей цепью событий, мы остановимся сначала на синтезе нуклеиновых кислот ДНК по ДНК, МРНК по ДНК и т. д. Этот процесс гораздо проще в принципе, чем синтез белка по МРНК, так как оба

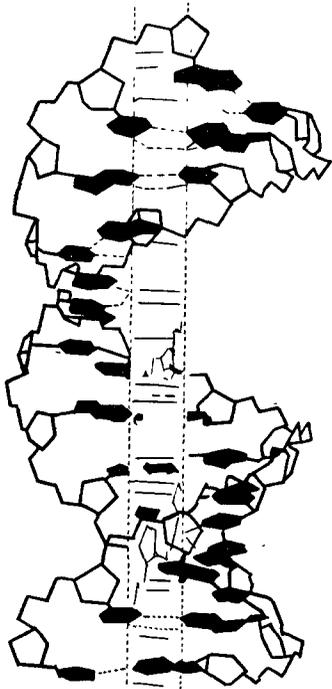


Рис. 1. Модель двойной спирали Уотсона — Крика.

Зачернены боковые группы пуриновых и пиримидиновых оснований. Незачернены пятичленные циклы дезоксирибозы. Центральный стержень — воображаемый

полимера — тот, с которого снимается копия и тот, который синтезируется, — гомологические. Однако и здесь мы сталкиваемся с тем же физическим принципом, которого не знала до сих пор синтетическая химия. Дело в том, что происходит синтез абсолютно упорядоченного сополимера с математически детерминированным порядком чередования нуклеотидов четырех типов вдоль цепи. Химия умеет строить сополимеры, однако это всегда статистические образования. Даже если имеется какая-то определенная закономерность в чередовании звеньев, например, звено *A* стремится иметь своим соседом звено *B*, то и такие простые правила могут быть сформулированы только как статистические. Средняя флуктуация в чередовании звеньев *A* и *B* может быть порядка 10^{-2} . В нуклеиновой кислоте положение каждого звена из тысячи детерминировано с колоссальной точностью. Копирование происходит с полной тождественностью. Это не означает, что не происходит никогда ошибок. С низкой вероятностью порядка 10^{-13} — 10^{-15} ошибка, т. е. неправильная вставка нуклеотидного звена, действительно происходит. Но это уже катастрофа — мутация. Такой полимер продолжает копироваться с ошибкой, он вызывает различные, чаще всего вредные, изредка полезные, модификации одного из белков клетки.

Каким же образом происходит буквальное точное копирование цепочек ДНК? Это синтез на линейной матрице, на форме, навязывающей свою структуру, т. е. определенный порядок чередования звеньев, второй, синтезируемой цепочке.

Матричный синтез является новым понятием, не имеющим precedентов в классической химии. Для синтеза нуклеиновых кислот, будь-то ДНК по ДНК, или РНК по ДНК, или РНК по РНК, принципы матричного синтеза определяются моделью пространственной структуры Уотсона и Крика (рис. 1). Принципы пространственной структуры нуклеиновых кислот хорошо известны и подробно освещались на страницах УФН¹.

Попарная комплементарность, т. е. дополнительность нуклеотидов, необходимая для образования водородных связей между основаниями, т. е. дополнительность тимина или урацила аденину (спаривание А — Т или А — У) и цитозина — гуанину (спаривание Г — Ц), определяет собой действие каждой отдельной цепочки как матрицы. Если данное основа-

ние требует всегда спаривания со строго комплементарным, А всегда с Т и Г всегда с Ц, то ясно, что чередование звеньев одной цепи точно детерминирует чередование второй комплементарной цепи, образующей с первой спираль Крика — Уотсона. Отсюда легко себе представить как происходит синтез нуклеиновых кислот на матрице.

Двойная спираль расходуется, пусть не полностью, а путем образования петель. Обнажившиеся одиночные цепи сорбируют мономеры из окружающей среды, и происходит синтез двух комплементарных цепей (рис. 2). В итоге из двух цепей образовалось четыре. Произошло то, что принято называть термином «полуконсервативная репликация».

Таков общий принцип удвоения ДНК, а также синтеза МРНК по ДНК. При синтезе МРНК по ДНК мономерами служат рибонуклеотиды, т. е. вторая цепочка химически отличается от первой, но это не изменяет принципа действия матрицы. Здесь следует подчеркнуть разницу в действии катализатора и матрицы. Все рассматриваемые реакции являются каталитическими, т. е. ферментативными. Катализатор определяет, какие химические связи рвутся и какие вновь образуются в каждом элементарном акте. Но порядок чередования звеньев в полимерной цепи катализатором отнюдь не определяется. Для катализатора любое из четырех возможных звеньев одинаково хорошо. И только наличие матрицы навязывает синтезируемому полимеру строго определенный порядок чередования.

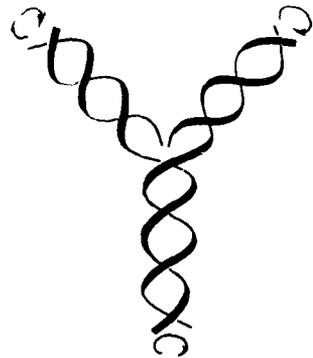


Рис. 3. Схема расплетания двойной спирали ДНК.

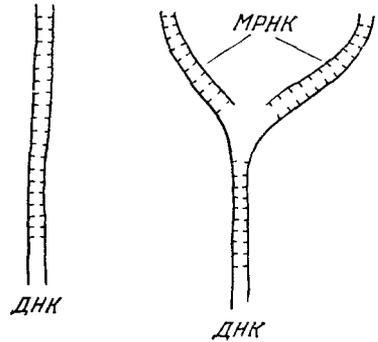


Рис. 2. Схема репликации ДНК или синтеза МРНК по ДНК.

Остановимся на некоторых любопытных деталях этого явления. Очень интересный вопрос, не имеющий еще полного решения, — это проблема расплетания двойной спирали ДНК при синтезе двух комплементарных сателлитных нитей. Двойная спираль должна разойтись при синтезе новых цепей, чтобы могли возникнуть водородные связи с мономерами. При этом расплетаясь, она должна вращаться с большой скоростью. По подсчетам Дельбрюка, исходя из известных скоростей синтеза ДНК, она вращается со скоростью 200—300 об/сек в бактериях и вирусах (рис. 3) ². Особенно странным казалось то обстоятельство, что, как показы-

вает опыт, ДНК бактерий, вирусов, фагов оказывается кольцевой, т. е. замкнутой на себя (рис. 4) ³. Расплетание при этом представляется вообще топологически невозможным. Проблема экспериментального изучения процесса вращения ДНК при ее удвоении до сих пор не решена, хотя и дискутируется весьма усиленно. Мы в своей лаборатории пытались понять как обстоит дело с замкнутостью хромосомы, казалось бы безнадежно препятствующей репликации. Был поставлен следующий эксперимент ⁴. Был выращен бактериофаг T₂, радиоактивный, с очень «горячей» ДНК (она была мечена P³² с удельной активностью 100 мкюри/Мг). Подобный вирус заражал клетки бактерий, вводя в них по одной молекуле ДНК с характерным молекулярным весом (130 миллионов). Заражение бактерий заключается в проникновении в клетки молекул ДНК

вируса. После этого в клетке начинается синтез сначала ряда белков, информация о которых содержится в вирусной ДНК, затем идет

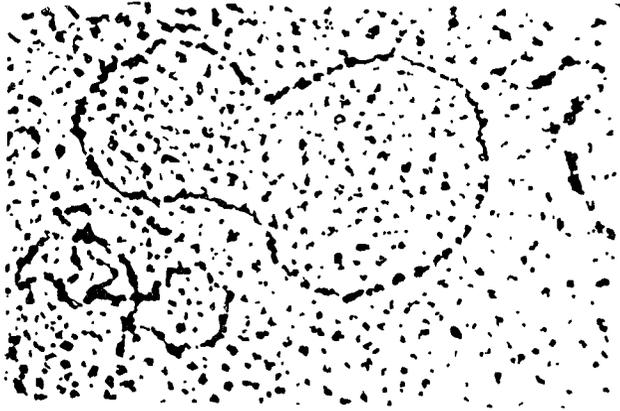


Рис. 4. Электронная микрофотография цепочки ДНК из вируса полиомы.

размножение самой ДНК, наконец, начиная с 12—15 мин, внутри

клетки собираются готовые фаги. Примерно на 20—25 мин клеточная оболочка разрывается и весь «урожай» фагов выходит наружу.

На разных этапах развития нового поколения фагов, через определенные промежутки времени после заражения, мы вскрывали клетки и измеряли молекулярные веса только радиоактивной, т. е. материнской ДНК, с помощью ультрацентрифуги. Вся вновь синтезированная ДНК не была видна, так как она содержала фосфор P^{31} , а мы следили за седиментацией радиоактивного полимера. Получился следующий результат. В первый момент после заражения молекулярный вес материнской ДНК был исходный, $130 \cdot 10^6$. Однако через короткое время она начала распадаться на определенные фрагменты около $35 \cdot 10^6$ (рис. 5). Спрашивается, происходит ли синтез

новой ДНК с использованием фрагментов в $35 \cdot 10^6$ или только исходных больших молекул. Для этого был поставлен обратный экспери-

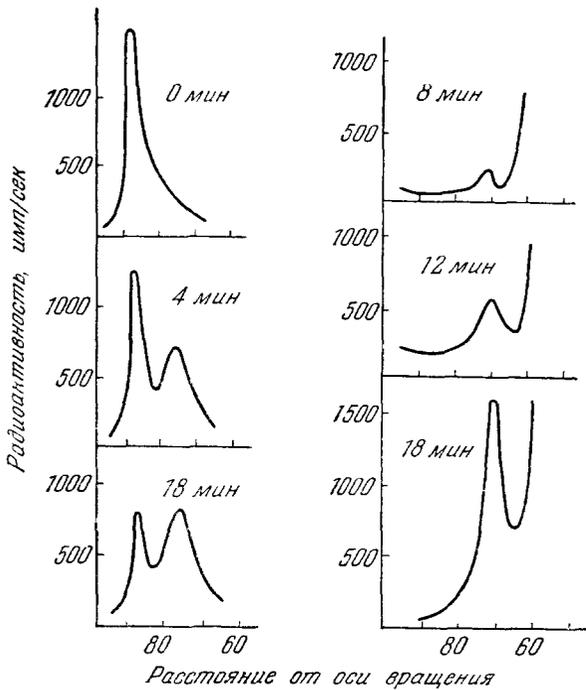


Рис. 5. Изучение ДНК бактериофага T_2 в процессе внутриклеточного развития фага.

Опыт ведется путем вскрытия зараженных клеток в определенный момент (0, 4 и 18 мин после заражения) и ультрацентрифугирования фаговой ДНК Слева — прямой опыт, в котором метилась P^{32} ДНК материнского фага Справа — обратный опыт, в котором метилась вновь синтезированная ДНК дочерних фагов

мент. Заражение производили нерадиоактивным фагом, а рост бактерий шел на среде, содержащей P^{32} . Опыт показал, что вновь образовавшаяся ДНК фага имеет молекулярный вес осколков, т. е. $35 \cdot 10^6$, и только в момент окончательной сборки готовых фаговых корпускул, в клетке появляется ДНК высокого молекулярного веса, собранная в среднем из четырех единиц, служивших матрицами для синтеза и воспроизведения (рис. 6). Тем самым репликации ДНК предшествует разрыв, и трудность с замкнутостью фаговой ДНК снята. Однако вопрос о том, что заставляет двойную цепь расплетаться путем быстрого вращения, остается нерешенным.

Другой любопытный вопрос, касающийся ДНК, это вопрос о возникновении мутационных повреждений. С помощью явления трансформации можно изучать химический мутагенез как обычную реакцию, отвлекаясь от всех осложнений.

В чем заключается трансформация бактерий (рис. 7)? Предположим, мы имеем штамм бактерий (например, сенной палочки), имеющей наследственное повреждение в ДНК, т. е. в хромосоме. Пусть, например, клетка не способна сама синтезировать аминокислоту триптофан. Это означает, что у нее нет полноценной информации о структуре какого-то одного из белков-ферментов, необходимого для синтеза триптофана. Такой штамм будет расти на среде, снабженной в обязательном порядке триптофаном. Мы можем изолировать ДНК из полноценных клеток, способных самостоятельно производить триптофан. Такую очищенную ДНК можно растворить и добавить к взвеси наших неполноценных клеток. Тогда опыт показывает, что она проникает через клеточную оболочку, входит в хромосому и сообщает клеткам способность делать триптофан, т. е. превращает их в более полноценные. Это явление — самый простой и элементарный пример передачи наследуемых признаков с помощью молекул чистого вещества — полимерной ДНК.

Теперь покажем, как можно использовать трансформацию для изучения мутаций. Изолируем ДНК из какого-либо штамма бактерий, очищаем ее до предела, затем действуем на нее каким-либо мутагенным агентом. Реально мы в лаборатории действовали на ДНК альтернативно азотистой кислотой, гидроксиламином или ультрафиолетовым светом⁵. Потом поврежденные молекулы ДНК вводили в клетки и смотрели, не возникнут ли в результате химических процессов новые свойства клеток. Оказывается, таким путем, т. е. воздействуя не на клетки, а на изолированную ДНК и проявляя потом новые свойства с помощью трансформации, можно в действительности получать мутанты.

Рассмотрим кинетику реакции ДНК с каким-либо мутагенным фактором. Докажем, что это реакция первого порядка, т. е. что мутация возникает при одном акте эффективного взаимодействия ДНК с HNO_2 или NH_2OH , или квантом света. Это было бы просто, если бы на

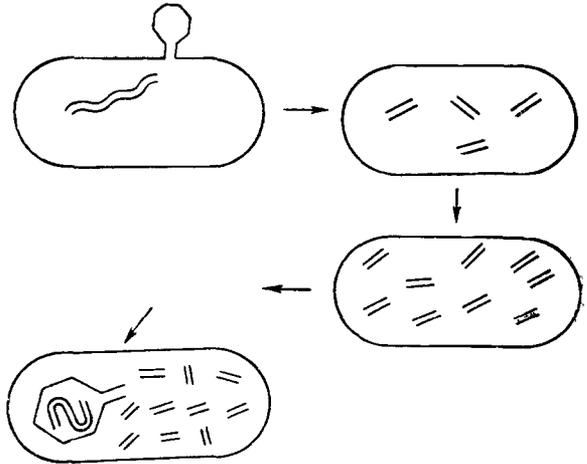


Рис. 6. Схема внутриклеточного развития фага.

реакцию мутагенеза не накладывался второй, гораздо более вероятный процесс инактивации ДНК под действием тех же факторов. Нельзя забывать, что имеется громадное разнообразие возможностей для реакций нуклеиновых кислот, и большая часть процессов будет попросту выводить из строя молекулу ДНК. Предположим, молекула ДНК испытала z химических повреждений, распределенных статистически вдоль ее цепи. Ясно, что ее застройка в хромосому может дать положительный эффект только, если застроится фрагмент, содержащий активный участок (например, несущий информацию о ферменте, синтезирующем триптофан) и не содержащий ни одного из z химических повреждений, испытанных частицей. Мы можем написать, что число трансформированных клеток под действием ДНК, испытавшей z «ударов», будет равняться

$$n = Af(z), \quad (1)$$

где A — коэффициент, содержащий вероятность молекуле ДНК войти в клетку, вступить во взаимодействие с хромосомой и т. д. $f(z)$ — функция числа повреждений z , зависящая от длины участка молекулы, сохранившегося неповрежденным. Число инактивирующих ударов z будет расти пропорционально времени, $z = k_1 t$. Для мутаций будем считать, что необходим один эффективный акт реакции внутри рассматриваемой области ДНК. Тогда число мутационных «повреждений» y будет нарастать линейно со временем, $y = k_2 t$. Для того чтобы мутационное «повреждение» проявилось при трансформации как новый организм — мутированная клетка, нужно чтобы молекула вошла в клетку и соответствующий участок ДНК застроился в хромосому. При этом мы должны учитывать, что наряду с мутационными «повреждениями» гораздо чаще происходят разнообразные инактивирующие «повреждения» молекулы ДНК. Ясно, что для числа мутантов мы получим формулу

$$n_M = Af(z) k_2 t, \quad (2)$$

где $f(z)$ и A — те же величины, что и в формуле (1).

Поделив n_M на n , получим

$$\frac{n_M}{n} = k_2 t = \frac{k_2}{k_1} z.$$

Следовательно, отношение числа мутантов, проявленных трансформацией к числу трансформантов, образовавшихся под действием ДНК, испытавшей инактивацию в тех же экспериментальных условиях, будет линейно нарастать со временем только, если мутагенез — одноударный процесс. Рис. 8 показывает, что результаты измерений полностью подтверждают это положение. Кроме того, из него видно, что эффективность мутагенного фактора, определяемая k_2/k_1 , т. е. отношением константы мутагенеза к константе инактивации, выше всего для гидроксилламина, в 2,5 раза ниже у азотистой кислоты и в 15 раз меньше для действия УФ излучения.

Независимо от нас Гирер показал, что мутагенез является реакцией первого порядка также при действии HNO_2 на РНК вируса табачной мозаики. Это значит, что химическое изменение одного звена полинуклеотидной цепи лежит в основе химического мутагенеза. Этот результат согласуется с тем, что мы знаем о структуре мутированных белков. В них было обнаружено анализом, что всегда повреждается только одно звено полипептидной цепи, т. е. происходит замена одного нормального звена на новое, несвойственное данному белку.

Теперь от рассмотрения ДНК перейдем ко второму этапу — образованию МРНК по ДНК, т. е. превращению потенциальной информации

в действующую. Основной вопрос здесь можно сформулировать следующим образом. Переносится ли информация для синтеза белка с обеих цепочек ДНК или только с одной? Иначе говоря, синтезируется ли МРНК с обеих комплементарных матриц ДНК? Вопрос этот весьма важный. Ведь обе комплементарные цепи ДНК не идентичны. С другой стороны, они определяют друг друга, т. е. содержат одну информацию, но структура белков в них зафиксирована различными кодами. Поэтому сначала казалось, что лишь одна из цепей несет генетическую информацию, т. е. практически копируется при образовании МРНК. В нашей лаборатории был поставлен довольно простой эксперимент для решения этого вопроса⁶. Было снова использовано явление трансформации бактерий. Предположим, мы имеем штамм бактерий (сенной палочки), имеющий два наследственных повреждения, например неспособный синтезировать две аминокислоты — триптофан и гистидин. Такой штамм будет расти на среде только при наличии в ней готовых аминокислот триптофана и гистидина. Мы можем взять ДНК от полноценного штамма бактерий, изолировать и очистить эту ДНК и трансформировать клетки сразу по обоим признакам. Было показано, что оба генетических маркера — триптофан и гистидин, т. е. обе области ДНК, несущие информацию о соответствующих ферментах, находятся рядом в пределах одной макромолекулы ДНК. Поэтому трансформация по обоим признакам происходит одновременно. Это очень важно, так как позволяет выполнить следующий опыт. Берем ДНК от двух «половинчатых» штаммов. Один способен синтезировать триптофан, но не гистидин, второй — гистидин, но не триптофан (рис. 9). Изолируем из каждого его ДНК, смешиваем ее в растворе, греем до расщепления двойных спиралей (90° С), тогда они расходятся на отдельные нити; затем медленно охлаждаем, как бы отжигаем смесь. Тогда мы получаем восстановление двойных спиралей ДНК⁷, и половина восстановленных спиралей будут гибриды, сделанные нами искусственно и несущие по одному активному маркеру на каждой из цепочек. Специальные опыты с изотопной меткой (с помощью N¹⁵) половины ДНК перед плавлением и отжигом показали, что такая «гибридизация молекул» действительно имеет место и вполне эффективна⁸. Спрашивается, можно ли трансформировать дважды неполноценные клетки подобными молекулярными гибридами, т. е. будут ли клетки жить и развиваться, получив молекулу ДНК, состоящую из двух неодинаковых нитей. Если так, то МРНК должна копироваться с обеих нитей ДНК, а не с одной. Опыт дал однозначно именно такой ответ. А так как двух кодов для прочтения комплементарных цепей не обнаружено, это означает, что в клетке должно идти еще одно комплементарное копирование, на этот раз РНК по РНК. Из двух первичных ниток МРНК одна является как бы позитивом, а вторая — негативом. Но в клеточной цитоплазме должен происходить второй процесс — образование позитива по негативу, т. е. еще одно комплементарное копирование РНК по РНК. Интересно, что в последний год в разнообразных клетках растений, животных и бактерий биохимики открыли подобные ферменты. Нашими опытами для этих ферментов предусмотрена целесообразная работа.

Остановлюсь теперь на деталях процесса синтеза белковой цепочки. В нем используется МРНК в качестве матрицы, детерминирующей порядок чередования аминокислот в белковой цепочке. Известно, что существует специальный код, связывающий последовательность нуклеотидов в нуклеиновой кислоте с последовательностью аминокислот в белке. Я не останавливаюсь здесь на проблеме изучения кода, так как этому вопросу уже была посвящена специальная статья в УФН¹. Напомню лишь, что тройка нуклеотидов в цепи МРНК кодирует одно звено белка.

В природе реализуется тем самым самый экономный код, так как цепь нуклеиновой кислоты состоит из мономеров 4-х типов, а белковая цепь из 20 типов (триплетов из 4-х букв можно составить $4^3 = 64$, т. е. вполне достаточное количество для изображения 20 аминокислот; число возможных дублетов было бы всего $4^2 = 16$, т. е. не удовлетворяет требованиям).

Однако физическое осуществление синтеза белка на матрице вводит не кибернетические, а чисто структурные осложнения. Казалось физически невыполнимым применить структурные требования к размерам белковой цепочки с трехзначным кодом. Ведь одно аминокислотное звено занимает 3,6 Å, а три нуклеотидных звена — по крайней мере 21 Å. Кроме того, непонятно, каким образом представить себе молекулярные силы, регулирующие эту наборную машину? Как может аминокислотное звено детерминироваться тремя столь непохожими на него нуклеотидными

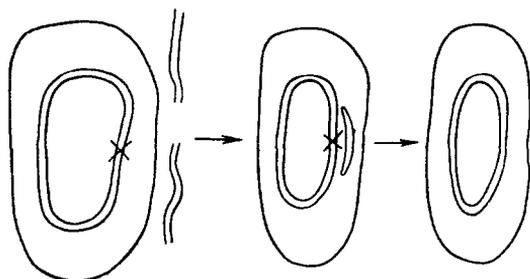


Рис. 7. Схема явления трансформации бактерий.

звеньями? Для решения этой загадки Криком была предложена гипотеза, которая заключалась в том, что должны существовать еще специальные маленькие молекулы — адаптеры, переносящие аминокислоты и прикрепляющие их к матрице, которой является мРНК. Сейчас выяснено, что аминокислоты сначала прикрепляются к специальной маленькой цепочке РНК-переносчика, состоящей всего из 70—80 нуклеотидных звеньев.

Таких РНК-переносчиков существует столько же, сколько существует аминокислот. Именно с помощью этого РНК-переносчика происходит набор аминокислот на полимерной цепи мРНК. Каждая тройка нуклеотидов на мРНК кодирует определенную аминокислоту — это кодон. К кодону с помощью водородных связей, используя принцип комплементарности, присоединяется тройка звеньев РНК-переносчика, так называемый антикодон. Тем самым каждая аминокислота находит свое место на матрице. В каждый данный момент времени к матрице, т. е. к мРНК, должна быть прикреплена уже синтезированная полипептидная цепь через концевую молекулу РНК-переносчика и еще одна аминокислота через свою РНК-переносчик. Это — момент образования очередной пептидной связи или образования очередного звена цепи. На рис. 10 изображена квинтэссенция наших знаний об этом процессе плюс некоторая доля воображения, так как точное положение антикодонов и структура РНК-переносчика еще не ясны. В последнее время показано, что в каждой рибосоме имеется одна-единственная точка, где присоединена полипептидная цепь через посредство РНК-переносчика. Следовательно, рибосома — это прибор, в котором одновременно синтезируется одна белковая цепочка.

Каково внутреннее строение рибосом, как оно связано с их функцией? Рибосомы — это универсальные мастерские по синтезу белков. Какой именно белок в них синтезируется, определяется тем, какая мРНК к ним прикрепляется. Специальным экспериментом показано, что у рибосом нет никакой специализации. Они синтезируют в каждый данный момент тот тип белка, который требуется клетке. А если клетка больна, если в ней паразитирует вирус, то рибосомы клетки вместо того, чтобы синтезировать собственные белки клетки, заняты тем, что синтезируют белки вируса (например, бактериофага). Такова информация или, если угодно, дезинформация, которую получают рибосомы в форме цепоч-

чек соответствующей МРНК. Сами по себе рибосомы состоят из двух неравных частей — более крупной с константой седиментации в 50 единиц Сведберга и меньшей с константой седиментации в 30 единиц. Обе субъединицы соединены в одно целое, но могут быть разъединены, если сделать концентрацию ионов магния в окружающей среде в 100 раз меньшей, чем в клетке (т. е. 10^{-4} М вместо 10^{-2} М).

Диссоциация рибосом на две субъединицы — процесс обратимый. При повышении концентрации магния они снова воссоединяются. По составу рибосомы состоят наполовину из белков и наполовину из РНК особых типов. В одну из субъединиц входит одна цепочка рибосомной РНК с молекулярным весом 1 200 000, в меньшую субъединицу входит цепочка РНК с молекулярным весом около 600 000. Оба типа рибосомной РНК синтезируются, как все другие типы РНК, путем комплементарного копирования особых областей ДНК в хромосоме. Какова функция рибосомной РНК? Это одна из загадок, пока неразрешенных. В рибосоме РНК и белок, как принято говорить, интегрированы в трехмерную структуру. Самые детальные сведения о внутреннем устройстве рибосом получены А. С. Спириным и Н. А. Киселевым с помощью электронной микроскопии рибосом и их частей⁹. На основании их опытов можно произвести с известной вероятностью реконструкцию рибосом (рис. 11), из которой видно, что обе субъединицы рибосомы образуют как бы сосуд с крышкой или оболочку, способную раскрываться при понижении концентрации магния в среде. Стенки рибосомы представляют собой мозаику из уложенной зигзагами цепи РНК и белковых глобулярных молекул. Можно провести аналогию между структурой рибосом и некоторых вирусов.

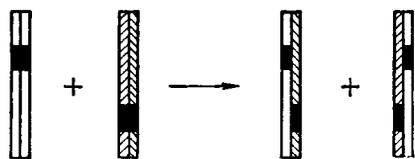


Рис. 9. Схема образования «гибридных» двойных цепей ДНК.

информация о ряде белковых цепей, и вот мы видим, что несколько (до 8—10) рибосом прикрепляются к цепочке МРНК на равных расстояниях и, по всей видимости, движутся вдоль нее, вступая на нее с одной стороны и скатываясь со второго конца. Так получается так называемая полисома (рис. 12)¹⁰. Оперировав изотопно мечеными рибосомами, эту картину можно было подтвердить экспериментально. Все это выглядит так, как будто рибосомы, двигаясь вдоль нити МРНК, прочитывают запасенную в ней информацию и претворяют ее в материальные полипептидные цепи белка. Полисомы сейчас выделяют во многих

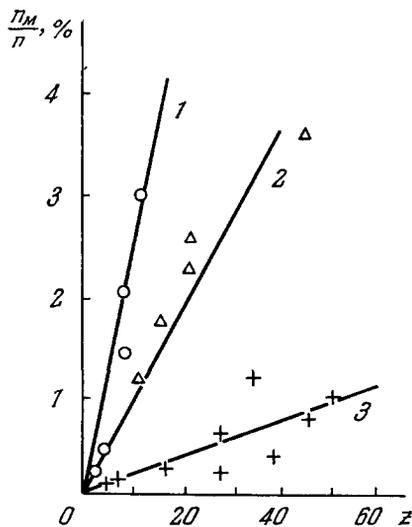


Рис. 8. Относительный выход числа мутантов как функция числа инактивирующих повреждений в молекуле ДНК.

Прямая 1 — для действия гидроксиламина, 2 — для действия азотистой кислоты; 3 — для действия ультрафиолетового света.

Имеется еще одна любопытная деталь в процессе синтеза белка. Цепь МРНК имеет большой молекулярный вес (до 10—15 миллионов), что вполне естественно, поскольку она копирует молекулу ДНК. Ее длина достигает 1 микрона, а диаметр рибосомы 170 Å. В одной молекуле МРНК содержится

лабораториях с помощью ультрацентрифуг и наблюдают в электронном микроскопе (рис. 13) ¹¹. Неясно, как осуществляется движение рибосом вдоль цепи мРНК. Кроме того, детали процесса сшивания аминокислот в единую цепочку, детали завершающего процесса синтеза пептидных связей, пока темны.

Для изучения этого этапа важно суметь выделить промежуточный продукт синтеза, т. е. белковую цепь, когда она еще не готова и прикреплена химической связью к РНК. В различных лабораториях мира охотились в течение последних лет за этим промежуточным соединением. В нашей лаборатории ¹² научились его получать и идентифицировать с помощью разработанного у нас

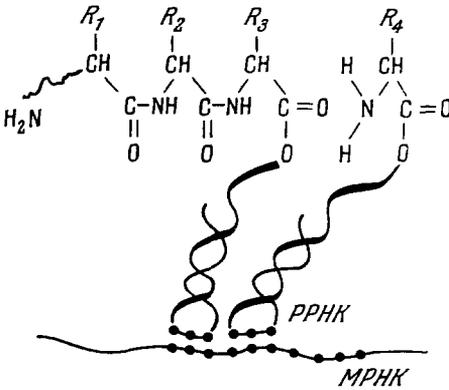


Рис. 10. Схема присоединения растущей полипептидной цепи к матрице.

метода зонного электрофореза в градиенте тяжелой воды. Представьте себе колонку, заполненную смесями легкой и тяжелой воды, в которой на дне чистая D₂O и далее линейно убывающая концентрация D₂O до самого мениска. В такой колонке имеется линейный градиент плотности, чрезвычайно стабилизирующий жидкость против любых конвекционных токов. В определенное место колонки (рис. 14) вводится тонкая зона продукта, в котором находится промежуточное соединение биосинтеза



Рис. 12. Схема образования полисом.

белка. При этом синтезированный полипептид мечен очень горячими аминокислотами (углеродом C¹⁴ высокой удельной активности). Выбираем условия электрофореза так (pH = 4,5), что белки практически оказываются незаряженными, а нуклеиновые кислоты несут по одному электрону на каждое звено цепи. В этих условиях белки не движутся в электрическом поле и их зона неподвижна, а нуклеиновые кислоты бегут очень быстро к аноду. Как же ведет себя промежуточный продукт синтеза? Он бежит к аноду лишь немного медленнее, чем РНК, но вместе с тем он мечен радиоактивными аминокислотами; мы измеряем его как полипептид (рис. 15).

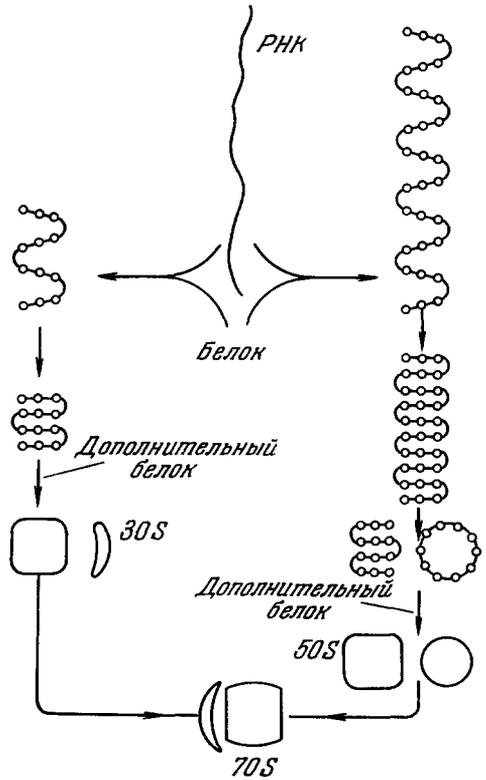


Рис. 11. Схема построения рибосом из РНК и белка.

На схеме передана конфигурация обеих субъединиц и топология укладки цепи РНК. Цифры 30S, 50S, 70S — константы седиментации.

Мы называем это вещество полинуклеотид-пептидом. Если порвать связь между двумя полимерами, для чего приходится брать довольно щелочную среду или специальный фермент, то радиоактивный белок останавливается. Поэтому метод зонного электрофореза очень хорошо дискриминирует между белком, нуклеиновой кислотой и полинуклеотид-пептидом.

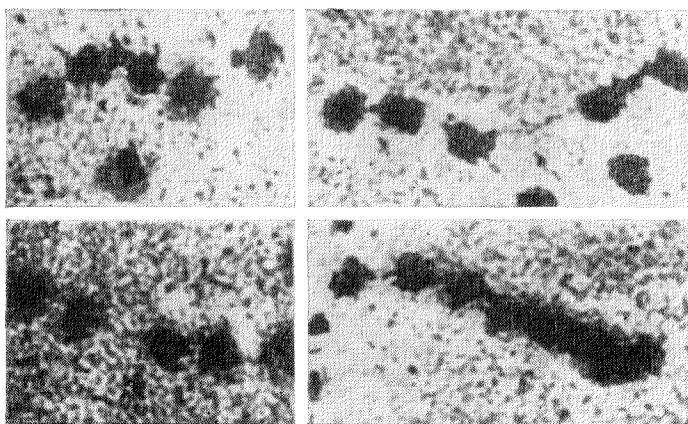


Рис. 13. Полисомы в электронном микроскопе.

Для изучения состава промежуточного продукта была введена двойная метка. Полипептид метился, как раньше, углеродом C^{14} , полинуклеотид метился фосфором P^{32} . Пользуясь различием энергий электронов C^{14} и P^{32} ,

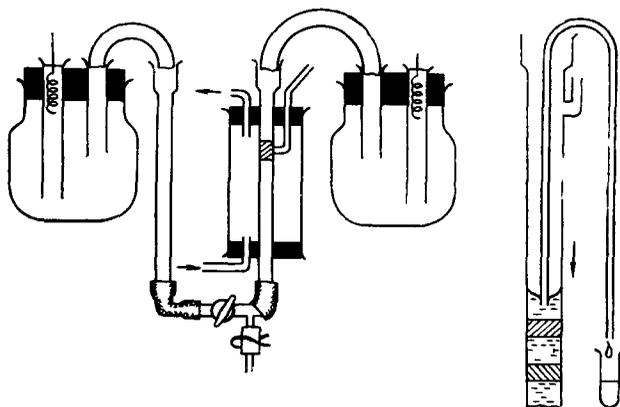


Рис. 14. Прибор для зонного электрофореза в градиенте плотности.

Справа показано, как происходит извлечение проб из электрофоретического сосуда

их нетрудно сосчитать раздельно. Что удалось установить относительно строения промежуточного комплекса? По-видимому, в него наряду с РНК-переносчиком входит также рибосомная РНК, т. е. вещество, из которого на 50% состоит тело рибосом. До сих пор было неизвестно, какую полезную функцию выполняет этот полимер в природе. Если он входит в промежуточный продукт синтеза белка, это означает, что рибосомная РНК запускает или инициирует процесс синтеза белковой цепи. С тем, что

имеется два типа РНК, связанных с рождающейся белковой цепью, находится в согласии второй факт. Имеется два типа связи между РНК и белком: один — более лабильный, разрушаемый $10^{-3}M$ -щелочью, второй — более стабильный, выдерживающий подобную щелочь в течение десятков часов. В настоящий момент идет интенсивная работа с целью окончательного подтверждения наиболее прямых путями подобной структуры промежуточного соединения. Тем самым можно будет понять, как происходит весь процесс полимеризации белка, так как понимание инициирования этого процесса может оказаться ключом к познанию всего механизма

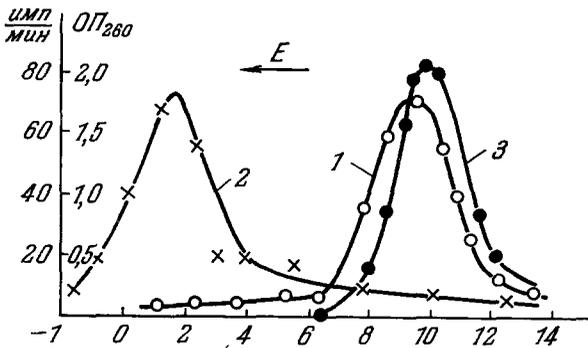


Рис. 15. Выделение полинуклеотид-пептида, меченого C^{14} , аминокислотами с помощью зонного электрофореза.

1 — зона полинуклеотид-пептида, 2 — результат контрольного опыта, когда связь между полипептидной и полинуклеотидной цепями разорвана (с помощью фермента), 3 — зона растворимой РНК, добавленной в качестве свидетеля. В ней концентрация измерялась не по радиоактивности, а по оптической плотности при 260 м μ . Нуль абсциссе соответствует месту введения пробы в электрофоретический сосуд.

заклЮчительной реакции в синтезе белка, т. е. сшивания аминокислот друг с другом пептидной связью.

С другой стороны, мы знаем по опыту образования обычных полимеров, что реакция инициирования связана с возможностью

целесообразного регулирования скорости синтеза полимерных цепей. Поэтому не исключено, что и в случае синтеза белков возможно регулирование количества синтезируемых белков на уровне рибосом.

Проблема автоматического регулирования синтеза ферментов является другой фундаментальной проблемой молекулярной биологии, которая заслуживает отдельного рассмотрения.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. В. Ю. Гаврилов, Ю. Н. Зограф, УФН 77, 597 (1962).
2. М. Дельбрюк и Г. Стент, Химические основы наследственности, М., ИЛ, 1960, стр. 562.
3. W. Fiers and R. Siksheimer, J. Mol. Biol. 5, 424 (1962).
4. С. Е. Бреслер, А. Е. Драбкина, М. И. Мосевичкий, А. А. Тимковский, ДАН СССР (1964).
5. С. Е. Бреслер, Д. А. Перумов, ДАН СССР (1964).
6. С. Е. Бреслер, Р. А. Кренева, В. В. Кушев, М. И. Мосевичкий, Биохимия 29, 477 (1964).
7. P. Doty, J. Marmur, J. Eigner, C. Schildkraut, Proc. Nat. Acad. Sci. 46, 461 (1960).
8. M. Meselson, F. Stahl, Proc. Nat. Acad. Sci. 44, 671 (1958).
9. А. С. Спирин, Н. А. Киселев, Р. С. Шакулов, А. А. Богданов, Биохимия 28, 920 (1963).
10. J. R. Warkner, P. Knopf, A. Rich, Proc. Nat. Acad. Sci. 49, 122 (1963).
11. H. Slayter, J. Warkner, A. Rich, C. Hall, J. Mol. Biol. 7, 652 (1963).
12. С. Е. Бреслер, Н. В. Васильева, Р. А. Граевская, С. В. Кириллов, Е. М. Соминский, Биохимия 29, 353 (1964).